

*ALTERAÇÕES NA PATOGENICIDADE, MORFOLOGIA E ATIVIDADE ISOESTERÁSICA DE Helminthosporium sativum DECORRENTES DE PASSAGENS SUCESSIVAS POR DUAS CULTIVARES HOSPEDEIRAS DE TRIGO.*

*ADRIANA REMIÃO LINDEN*

*Dissertação apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, em fase em Genética.*

*Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alice Kalisz de Oliveira*

*Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> M.Sc. Aida T.S. Matsumura*

*Porto Alegre*

*-1989-*

## AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Alice Kalisz de Oliveira, pela sua orientação, estímulo e sugestões na redação da Dissertação;

à Profª M.Sc. Aida Terezinha Santos Matsumura, de uma forma muito especial, pela sua amizade, compreensão, disponibilidade em orientar e presença constante no decorrer do trabalho;

ao Prof. Dr. Homero Dewes, pelo apoio e valiosa contribuição na minha formação científica;

aos meus pais, Arnaldo e Schirley Linden, por todo o estímulo, apoio, compreensão e carinho que sempre me deram;

ao Telmo, pela maioria das fotografias e por tudo mais.

Este trabalho foi subvencionado pelo CNPq, FAPERGS, PROPESP-UFRGS e CNPT-EMBRAPA.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1. Interação planta hospedeira-fitopatógeno: aspectos gerais e genéticos .....	01
1.2. <i>Helminthosporium sativum</i> Pamm., King & Bakke.....	08
1.2.1. Características taxonômicas e considerações gerais.....	08
1.2.2. Hospedeiros e patogenicidade.....	10
1.2.3. Variabilidade intra-específica:mecanismos e reflexos na virulência.....	12
1.3. Helminthosporiose em <i>Triticum aestivum</i> L.....	18
1.4. A técnica de eletroforese em gel aplicada ao estudo da variabilidade genética em populações de fungos fitopatogênicos.....	21
1.5. Objetivos.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1. Material.....	31
2.1.1. Isolados de <i>Helminthosporium sativum</i> .....	31
2.1.1.1. Origem e características dos isolados fúngicos.....	31
2.1.1.2. Obtenção e isolamento de culturas puras.....	37
2.1.2. Cultivares hospedeiras de <i>Triticum aestivum</i> .....	38
2.1.2.1. Características das cultivares IAC 5.MARINGÁ e BR 4...38	
2.1.2.2. Plantio e preparo das plantas para os testes de patogenicidade.....	40
2.2. Métodos.....	41
2.2.1. Análise de características fúngicas em meio artificial..43	
2.2.1.1. Análise de colônias em BDA.....	43
2.2.1.2. Análise de esporos em sementes de sorgo.....	44
2.2.2. Eletroforese.....	46
2.2.2.1. Sistema isoenzimático.....	46
2.2.2.2. Preparo dos géis.....	47
2.2.2.3. Preparo das amostras fúngicas.....	48

2.2.2.3.1. Colônias.....	49
2.2.2.3.2. Esporos.....	49
2.2.2.4. Aplicação das amostras no gel e migração.....	50
2.2.2.5. Revelação e fixação dos géis.....	51
2.2.2.6. Análise dos géis.....	53
2.2.3. Testes de patogenicidade diretos e cruzados.....	54
2.2.3.1. Preparo dos inóculos fúngicos.....	54
2.2.3.2. Inoculação nas cultivares hospedeiras.....	55
2.2.3.3. Determinação dos índices de infecção.....	60
3 - RESULTADOS.....	61
3.1. Características fúngicas em meio artificial.....	61
3.2. Testes de patogenicidade diretos e cruzados.....	75
3.3. Análises eletroforéticas.....	79
4 - DISCUSSÃO.....	87
5 - RESUMO E CONCLUSÕES.....	107
6 - BIBLIOGRAFIA.....	110

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - Interação Planta Hospedeira-Fitopatógeno: aspectos Gerais e Genéticos

As associações hospedeiro-patógeno resultam de uma complexa interação entre os organismos envolvidos, dependendo fundamentalmente dos genótipos, tanto do hospedeiro quanto do patógeno, e das condições ambientais.

Cada interação hospedeiro-parasita é uma luta por sobrevivência entre dois organismos. A planta hospedeira, que já compete com outras plantas por espaço, luz e nutrientes ainda precisa suportar um parasita que, além de apropriar-se de seus nutrientes, invade e destrói seus tecidos, impedindo o desenvolvimento normal da planta. As consequências para o hospedeiro são extremamente variáveis, desde insignificantes até bastante drásticas, como quando o hospedeiro morre antes de reproduzir-se, ameaçando a sobrevivência da espécie. O parasita deve produzir um grande número de descendentes, para que pelo menos um consiga encontrar um novo hospedeiro e desenvolver-se. Os parasitas mais

especialistas, que se reproduzem somente em poucas espécies hospedeiras, não podem ser destrutivos à ponto de eliminar o hospedeiro, pois desta maneira estariam eliminando a si próprios (DAY, 1974).

Organismos que se desenvolvem em um outro indivíduo do qual obtém nutrientes são ditos parasitas, mas estes só são chamados de patógenos quando produzem doença em seus hospedeiros. Neste contexto, entende-se por doença uma alteração no metabolismo normal que leve à redução da potencialidade de crescimento e reprodução do hospedeiro, causada pela presença de um patógeno.

Quando uma planta hospedeira exposta a um parasita é por ele invadida e torna-se doente, diz-se que a hospedeira é susceptível e o parasita, patogênico. Uma planta hospedeira que mesmo exposta não adocece é dita resistente e o parasita é não patogênico para o hospedeiro em questão.

Resistência e susceptibilidade não são atributos absolutos de nenhum hospedeiro. São, isto sim, expressões de interações específicas entre os metabolismos do hospedeiro e do patógeno e, fundamentalmente, de seus genótipos (HOOKER e SAXENA, 1971).

Segundo BELL (1981), resistência à doença é a habilidade de uma planta em prevenir, restringir, ou retardar o desenvolvimento da doença, e ocorre em níveis alto, moderado ou baixo. Em contraste, virulência é a habilidade (alta, moderada ou baixa) de um

agente infeccioso em vencer a resistência. Tanto resistência quanto virulência são, cada uma, o resultado combinado de múltiplos componentes bioquímicos. Cultivares de uma mesma espécie geralmente apresentam variações em seus níveis de resistência a um patógeno qualquer. Esta resistência pode ser dividida em duas categorias: resistência raça-específica, que é efetiva apenas contra alguns isolados do patógeno ; e resistência raça-não-específica , que é efetiva contra todos os isolados. Sendo o agente patogênico um fungo, altos níveis de resistência não-específica geralmente previnem a penetração do fungo na planta, enquanto que os de resistência raça-específica normalmente inibem os estágios de crescimento mais tardios do fungo.

BURDON (1987) agrupa os mecanismos de resistência em duas categorias que refletem o grau de interação que está ocorrendo entre hospedeiro e patógeno: mecanismos de resistência ativos, que são consequência de uma resposta ativa contínua de um hospedeiro a um patógeno invasor, e mecanismos de resistência passivos, resultantes de interações passadas entre hospedeiro e patógeno que levaram, através de seleção, à inibição do contato ou ao aumento da tolerância das plantas.

A herança da resistência à doenças em plantas pode ser classificada em três categorias gerais: oligogênica (Mendeliana), o tipo mais comum; poligênica, observada em muitos estudos; e extracromossomal, rara mas bastante importante nas plantas onde ocorre (HOOKER e SAXENA, 1971). Segundo DAY (1974), a resistência das variedades hospedeiras é, por definição, específica e, na maioria

das vezes, oligogênica.

Em geral, resistência é dominante sobre susceptibilidade, somente 10% dos genes para resistência são completamente recessivos em sua expressão. Dominância incompleta, expressa em indivíduos heterozigotos para genes de resistência particulares como uma resposta intermediária à doença, é pouco documentada mas existente em alguns sistemas hospedeiro-patógeno. Análises genéticas têm revelado a ocorrência de dois ou mais genes para resistência em um mesmo genótipo hospedeiro, como é o caso de cultivares agronomicamente importantes, onde uma estratégia de controle da doença é a incorporação de vários genes para resistência em algumas variedades (BURDON, 1987). Quando dois ou mais genes para resistência estão presentes na mesma planta, eles podem funcionar independentemente um do outro, ou podem interagir (DAY, 1974).

O melhoramento de plantas importantes economicamente visando aumentar a resistência destas à fitopatógenos é uma medida bastante utilizada na tentativa de proteger as cultivares dos danos causados pelos patógenos. O que se observa, no entanto, é a habilidade dos parasitas em reagir e adaptar-se também às variedades hospedeiras introduzidas como sendo resistentes. Este fato não significa a quebra da resistência da planta, pois esta resistência continua efetiva contra as formas originais do patógeno, mas não é efetiva contra novas formas. Estas novas formas diferem da forma original por se estenderem à outros hospedeiros, tendo sido

chamadas de raças fisiológicas.

As raças fisiológicas são, segundo DAY(1974), diferenciadas pelas suas reações em um grupo de variedades hospedeiras resistentes, sendo que estas variedades possuem os genes para resistência que estão sendo usados com o objetivo de controlar a doença.

BROWDER e cols. (1980) definem raça fisiológica como sendo um grupo de indivíduos, presentes em uma população de parasitas, com características de patogenicidade em comum. Os autores entendem ser este o melhor conceito em estudos sobre a especificidade hospedeiro-patógeno, ressaltando a ambigüidade gerada quando se usa o termo raça em diferentes situações.

Segundo NELSON e cols. (1970), patogenicidade é a capacidade de um organismo provocar doença em determinados membros de uma espécie hospedeira. Através do número e tamanho das lesões, pode-se avaliar a extensão com que os isolados patogênicos provocam doença, tendo-se, desta maneira, uma medida relativa de suas virulências em uma determinada linhagem hospedeira.

Os estudos sobre a herança da patogenicidade são limitados quando comparados com investigações sobre resistência à doenças. Em geral os caracteres do hospedeiro e do parasita têm sido considerados separadamente. Biologicamente, nem a especialização patogênica nem a reação específica do hospedeiro ocorrem sozinhas, pois

parasita e hospedeiro interagem para produzir uma terceira entidade: a associação hospedeiro-patógeno (BROWDER e cols., 1980).

Segundo BURDON (1987), resistência no hospedeiro e virulência no patógeno são praticamente indivisíveis. As flutuações que ocorrem na estrutura genética das populações, tanto do hospedeiro quanto do patógeno, são melhor interpretadas quando analisadas conjuntamente.

Os primeiros estudos sobre herança da patogenicidade foram feitos com a ferrugem, o que é surpreendente devido as dificuldades técnicas apresentadas por este fungo que é um parasita obrigatório com ciclo de vida complexo. O aumento na frequência de plantas resistentes à ferrugem foi muito importante para as culturas de trigo por volta de 1920. Posteriormente o aparecimento de raças fisiológicas deste fungo tiveram como consequência uma maior susceptibilidade das plantas hospedeiras, tornando necessários estudos no sentido de explicar a variação genética em ferrugem (DAY, 1974).

Desde então, foram analisados vários patógenos na tentativa de estabelecer um padrão de herança para patogenicidade e para virulência, mas os resultados foram, muitas vezes, conflitantes.

Os estudos iniciais, como os de WATERHOUSE (1929) e NELSON e cols. (1930), citados por DAY (1974), mostraram que patogenicidade estava, na maioria das vezes, sob controle de um único gene e que os genes para patogenicidade, em dicárions heterozigo-

tos, eram normalmente recessivos.

Por outro lado, WATSON (1970) sugere que os caracteres relacionados à patogenicidade, como taxa de crescimento do patógeno, tamanho da lesão provocada na planta e produção de esporos, sejam controlados por um sistema poligênico e que virulência/avirulência seja controlada por genes específicos no patógeno que interagem com genes correspondentes para resistência no hospedeiro.

Esta interação entre genes específicos do patógeno e do hospedeiro havia sido sugerida anteriormente por FLOR (1951) que, baseado em vários experimentos, propôs a hipótese "gene-for-gene". Segundo esta hipótese, para cada gene que determina resistência no hospedeiro há um gene correspondente no parasita com o qual ele interage especificamente. Estas relações gene-a-gene são conhecidas em mais de vinte e cinco sistemas planta hospedeira-patógeno (BURDON, 1987).

Segundo WEBSTER (1974), patogenicidade é a capacidade de um organismo atacar um determinado hospedeiro, sendo normalmente controlada por poucos genes em qualquer interação hospedeiro-parasita. Já virulência é a quantidade relativa de doença causada por um patógeno, resultando, geralmente, da ação de um grande número de genes.

Assim como a resistência às doenças em plantas hospedeiras deve ser dependente de poligenes, "background" genético e do ambi -

ente, o mesmo é válido para patogenicidade em parasitas. Patogenicidade e resistência no hospedeiro estão sujeitas à controles oligogênicos, poligênicos e citoplasmáticos (DAY, 1974).

As populações de patógenos são polimórficas, compostas por várias raças. Para que o polimorfismo para virulência possa ser mantido na população, é necessário um custo adaptativo, sem o qual os genótipos mais virulentos eventualmente excluiriam os de menor virulência. O resultado final de qualquer situação planta hospedeira-patógeno depende; portanto, do nível de seleção contra genes mais virulentos e do número de genótipos hospedeiros. Tal seleção deverá atuar no sentido de impedir a dominância de "super raças" - genótipos do patógeno que são virulentos para todos os componentes de uma mistura de genótipos hospedeiros (BURDON, 1987).

Em lavouras agrícolas para produção de alimento ou fibras, o balanço natural existente entre hospedeiros e patógenos vem sendo alterado como resultado do crescimento, em grande escala, de cultivares geneticamente uniformes. Estas culturas estão sujeitas à uma destruição por fitopatógenos devido à facilidade de adaptação e desenvolvimento dos parasitas nestas condições.

## 1.2. Helminthosporium sativum Pamm., King e Bakke

### 1.2.1. Características Taxonômicas e Considerações Gerais

O gênero *Helminthosporium* pertence à Sub-Divisão Deuteromycotina, Classe Deuteromycetes, Sub-Classe Hyphomycetidae, Ordem Moniales, Família Dematiaceae (ALEXOPOULOS e MINS, 1985). Os

fungos pertencentes a esta categoria taxonômica são chamados de anamórficos ou imperfeitos, pois possuem apenas a reprodução assexuada como forma de propagar a espécie.

A grande maioria das espécies pertencentes ao gênero *Helminthosporium*, inclusive *H. Sativum*, apresentam apenas a reprodução assexuada na natureza. Estas espécies não apresentam mais a reprodução sexuada em condições naturais possivelmente porque desenvolveram eficientes mecanismos próprios que lhes conferem grande variabilidade genética e garantem sua sobrevivência (DAY, 1974; MATSUMURA e cols., 1982; ALEXOPOULOS e MINS, 1985).

Em laboratório, onde o organismo é submetido às condições bastante desfavoráveis ao seu desenvolvimento, pode-se induzir a produção de frutificações férteis (ascos e ascóporos), obtendo-se a fase sexuada, também denominada teleomórfica, bastante útil para estudos genéticos desta espécie (TINLINE, 1960). Nesta fase, é usada a denominação *Cochliobolus Sativus*, pertencente à Sub-Divisão Ascomycotina, Classe Ascomycetes, Sub-Classe Loculoascomicetidae, Ordem Pleosporales, Família Pleosporaceae (ALEXOPOULOS e MINS, 1985).

Existem grandes controvérsias de nomenclatura com relação a este organismo, sendo utilizada a denominação *Helminthosporium sativum* na maioria dos trabalhos relacionados a fase anamórfica. *Cochliobolus sativus* é a denominação encontrada em trabalhos que utilizam a fase teleomórfica do fungo.

Esta espécie é denominada das seguintes maneiras:

Forma anamórfica (conidial): *Helminthosporium sativum* Pammel, King e Bakke (1890); *Helminthosporium sorokinianum* Sacc. in Sorok.; *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subran e Jaln (1930); *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoem (1959).

Forma teleomórfica (ascógena): *Cochliobolus sativus* (Ito e Kurybayasshi) Dreschl. ex. Dastur (1934).

#### 1.2.2. Hospedeiros e Patogenicidade

O gênero *Helminthosporium* inclui os estágios conidiais de patógenos causadores de importantes doenças em cereais, gramíneas, milho e arroz. *H. sativum* é encontrado comumente em trigo, cevada, centeio, triticale e aveia, podendo infectar vários órgãos da planta hospedeira. Desenvolve-se melhor em áreas quentes (20 a 30°C) e úmidas, podendo causar perdas elevadas nas culturas atingidas.

Segundo CHIOAMBARAM e cols. (1973), esta espécie tem um amplo e diversificado conjunto de hospedeiros: *Agropyron elongatum*, *Brachiaria cuziziensis*, *Bromo uniolioides*, *Calendula officinalis*, *Capsicum annum*, *Chrysanthemum cinerariifolium*, *Coriandrum sativum*, *Curcubita pepo*, *Cuminum cyminum*, *Daucus*, carota, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Oryza sativa*, *Pennisetum glaucum*, *Phascolus vulgaris*, *Ralphanus sativus*, *Sesamum indicum*, *Setaria italica*, *Sorghum vulgare*, *Vigna sinensis*, além dos hospedeiros mais comuns, como *Avena sativa*, *Hordeum*

*vulgare e Triticum aestivum.*

Segundo DAY (1974), muitos isolados de *Helminthosporium oriu* dos de gramíneas selvagens de diferentes partes do mundo, são indistingüíveis daqueles que causam doenças em cultivares economicamente importantes. Estes isolados que parasitam gramíneas selvagens são potencialmente perigosos à cultivares. A grande abrangência de hospedeiros para a maioria das espécies de *Helminthosporium* sugere que, apesar das barreiras de esterilidade que restringem o intercruzamento, a população pode ser considerada como uma continuidade de formas adaptadas a muitos diferentes membros das *Gramineae*. Algumas formas de *Helminthosporium* são particularmente bem adaptadas à variedades hospedeiras cultivadas em grande escala.

O fungo pode ser transportado de uma região à outra por fatores como ventos, chuvas e sementes infectadas. Os conídios podem permanecer no solo ou em restos de cultura, por vários meses ou até alguns anos, voltando a germinar na presença de hospedeiros susceptíveis e reiniciando o ciclo da doença. O plantio contínuo destes hospedeiros favorece a multiplicação do inóculo no solo e o desenvolvimento da doença (DIEHL, 1982).

REIS (1982) demonstrou que fungos patogênicos do sistema radicular de cereais de inverno, entre eles *H. sativum*, são mantidos durante os meses mais quentes em plantas cultivadas, nativas e

invasoras de verão que não evidenciam sintomas secundários da doença. Estes hospedeiros podem ser uma importante fonte de inóculo, oferecendo um meio adicional de sobrevivência do fungo durante a estação na qual o hospedeiro principal está ausente.

Estudos sobre a patogenicidade das espécies que compreendem o gênero *Helminthosporium* mostram que estas espécies não são específicas com relação ao hospedeiro, atacando um grande número de gramíneas. NELSON (1961) e NELSON e KLINE (1962) explicam este fato sugerindo que os fungos fitopatogênicos possuem "pools" gênicos que incluem, não só genes para patogenicidade à hospedeiros específicos, mas também genes adicionais para patogenicidade à outros hospedeiros. Segundo estes autores, a hibridização entre raças patogênicas oferece um veículo para recombinação entre genes presentes em cada raça. A incorporação de genes adicionais para resistência, bem como a introdução de novas cultivares, constituem pressões seletivas que influenciam a extensão e a frequência de recombinação nos reservatórios gênicos dos patógenos.

Através de cruzamentos com isolados de *Helminthosporium oryzae* de diferentes gramíneas, NELSON e KLINE (1969) concluíram que a patogenicidade para um hospedeiro é controlada por um ou dois genes, as propriedades da patogenicidade nos vários hospedeiros parecem ser herdadas independentemente.

### 1.2.3. Variabilidade Intra-Específica: Mecanismos e Reflexos na Virulência

*Helminthosporium sativum* é uma espécie bastante variável, tan-

to morfológica como fisiologicamente.

Em 1922 , CHRISTENSEN (1925) iniciou os estudos sobre a variabilidade em *H. sativum* analisando, em meio de cultura, a morfologia de 37 formas e encontrando grandes diferenças entre elas. Ao inocular tais formas no solo utilizado para o plantio dos hospedeiros (trigo e cevada), encontrou também variações marcantes em virulência. Estes resultados levaram o autor a sugerir que esta espécie é constituída por muitas formas fisiológicas que mutam facilmente e que é necessário cautela ao descrevê-la. Saliencia que este fungo é dinâmico, modificando-se continuamente, sendo; portanto, um problema constante para seus hospedeiros.

Estudando o efeito dos fatores ambientais sobre a mutação, CHRISTENSEN (1929) observou que a temperatura influenciava a frequência de mutação em *H. sativum*.

O surgimento de novas raças de *H. sativum*, na forma de setores em culturas mantidas em meio artificial, foi observada por CHRISTENSEN e DAVIES (1937). Ao tentar elucidar a natureza da variação constatada observaram que conídios, tubos germinativos e células de hifas eram multinucleados, ocorrendo anastomoses de hifas entre raças diferentes. Entretanto, não souberam dizer, com certeza, se havia mistura subsequente ou não de citoplasma e núcleos. Algumas variantes surgiam quando as culturas eram submetidas a certas condições ambientais. Com base nestas observações, concluíram que as variações em certas ra

ças de *H.sativum* podem ser induzidas por fatores ambientais, sendo mais provavelmente devidas à mutação do que à heterocariose.

Segundo BUXTON (1960) , a variabilidade dos fitopatógenos é decorrente de quatro mecanismos genéticos básicos: (1) mutação; (2) heterocariose; (3) várias formas de recombinação, com ou sem a intervenção de processos sexuais; (4) sistemas de adaptação que levam a mudanças na virulência e na tolerância à substâncias tóxicas.

TINLINE (1960) salienta a grande variabilidade observada em *Cochliobolus sativus* , trabalhando com este que é o estágio perfeito de *Helminthosporium sativum* , com relação à: cor dos esporos, resistência à irradiação com luz ultra-violeta, pigmentação do micélio, grau de compatibilidade sexual, virulência, esporulação e outras características em cultura. O autor sugere três mecanismos que colaborariam para aumentar a variação nesta espécie: mutação, heterocariose e hibridização. Entende-se por heterocariose a condição em que dois ou mais núcleos, geneticamente diferentes, coexistem em um citoplasma comum.

TINLINE (1962) demonstrou a ocorrência de heterocariose e de parassexualidade como mecanismos de variação em *C.sativus*. Segundo o autor , os heterocárions formam-se por mutação ou migração nuclear resultante de anastomose entre hifas. No ciclo parassexual, estabelece-se um núcleo diplóide que dará origem à variantes contínuas através de recombinação, segregação e associações subsequentes.

TINLINE E MAC NEILL(1969), em sua revisão sobre parassexualidade em fungos fitopatogênicos, salientam a mutação, heterocariose e recombinação somática como sendo os mecanismos que conferem variabilidade em fungos imperfeitos e, junto com reprodução sexual, em fungos de outras classes. Para que ocorra o ciclo parassexual é necessário heterocariose seguida pela fusão de dois núcleos, de modo a produzir um diplóide heterozigoto. Pode ocorrer, então, recombinação mitótica e arranjo ao acaso por haploidização. Em fungos que não apresentam o estágio sexual na natureza, o ciclo parassexual é bastante importante por ser o principal mecanismo de recombinação que leva a geração e armazenamento de variação (TINLINE,1962; DAY, 1974).

Os heterocárions balanceados e os diplóides, mesmo tendo genótipos idênticos, comportam-se de maneiras diferentes. Os heterocárions são mais flexíveis do que os diplóides na adaptação à novas e súbitas situações mas, a longo prazo, não oferecem os benefícios evolucionários conferidos pelos diplóides. Em muitos fungos, os diplóides são fenotipicamente distinguíveis dos heterocárions e aparecem em culturas heterocarióticas como setores de crescimento mais rápido (TINLINE e MAC NEILL, 1969).

DAY (1974) e AZEVEDO(1976) citam fatores citoplasmáticos como uma fonte adicional de variabilidade em fungos fitopatogênicos.

As plantas hospedeiras exercem um importante papel na varia

bilidade dos fungos fitopatogênicos atuando seletivamente na fixação ou eliminação de raças do patógeno (GUSEVA e cols., 1979).

TOLMSOFF (1983) sugere que a heteroploidia também é um importante mecanismo de variabilidade em fungos. Para ele a heteroploidia, quando aplicada aos fungos, é definida como uma alteração freqüente do número cromossômico de cada núcleo.

MATSUMURA e cols. (1988) estudaram as características morfológicas e fisiológicas de trinta isolados de *H. sativum* coletados de duas cultivares de trigo. A análise fenética, realizada com a utilização de métodos de taxonomia numérica, mostrou que os isolados estudados formavam dois grandes grupos, de acordo com as cultivares hospedeiras das quais foram coletados. Com base nestes dados, os autores concluem que a especificidade hospedeiro-patógeno é a característica que mais contribui para o agrupamento dos isolados deste fungo.

Todos estes estudos indicam que são vários os mecanismos envolvidos na variabilidade tão extensivamente observada e documentada em *H. sativum*. É claro que os hospedeiros têm uma influência profunda e constante sobre esta variabilidade, mas também sofrem suas conseqüências devido a capacidade do patógeno de desenvolver formas mais aptas à superar a resistência das plantas. A variação apresentada por esta espécie, em termos de patogenicidade e virulência, é de extrema importância, devendo ser considerada em detalhes pelos melhoristas que tentam desenvolver cultiva-

res resistentes a este fungo.

NELSON e KLINE (1962) estudaram as variações intra-específicas em patogenicidade de cinco espécies de *Helminthosporium* em vinte e cinco espécies de gramíneas, sugerindo a existência de um complexo gênico para patogenicidade com alguns genes presentes em todas as espécies do gênero *Helminthosporium* e outros genes exclusivos de cada espécie.

WOOD (1962), analisando isolados de *H.sativum* oriundos de hospedeiros e regiões geográficas diferentes, constatou que eles diferiam bastante com relação às suas capacidades de causar doença em trigo, cevada e aveia.

MISRA (1979) trabalhando com isolados coletados em diferentes variedades de trigo, observou que, além de diferirem em virulência, alguns podiam infectar um grande número de hospedeiros diferentes. O autor sugere a existência de distintas raças fisiológicas do patógeno na Índia.

HOSFORD e cols. (1975), estudando os mecanismos de herança para alguns caracteres de *Cochliobolus sativus*, concluíram que a virulência deste fungo em trigo é controlada por pelo menos dois genes, que estes genes estavam associados com a cor escura da colônia e que virulência é epistática sobre avirulência.

Utilizando seis isolados de *H.sativum* coletados de duas cultivares de trigo, LINDEN e cols. (1988) estudaram o comportamen-

to dos mesmos através de inoculações diretas (na cultivar de origem) e de inoculações cruzadas (na cultivar que não a de origem). Os isolados mostraram-se mais virulentos na cultivar de onde foram coletados (inoculações diretas), sugerindo a existência de especialização do patógeno ao seu hospedeiro original.

De modo a verificar as alterações no comportamento de diferentes isolados pertencentes à espécie do gênero *Helminthosporium* com relação à virulência, variabilidade intra e inter-isolados e características morfológicas em meio sintético, foram promovidas passagens sucessivas do fungo por plantas hospedeiras (CHRISTENSEN e SCHNEIDER, 1948; ROBERT e JENKINS, 1949; BROWN e MILLER, 1954; CHRISTENSEN e DEVAY, 1955; KINSEY e HOOKER, 1973; CASTRO, 1976). Na maioria dos trabalhos foram constatadas modificações nas características de colônia e na virulência dos isolados após passagens sucessivas pelo hospedeiro, indicando que a planta hospedeira exerce uma pressão seletiva sobre o patógeno.

### 1.3 - Helmintosporiose em *Triticum aestivum* L.

A doença causada por *Helminthosporium sativum* P.K. & B em trigo, foi primeiramente registrada por Sorokin, em 1890, no sul da região de Ussuria (Rússia) e seu agente descrito por Pammel,

King e Bakke, em 1910 (DICKSON, 1956).

A helmintosporiose está entre as doenças fúngicas da parte aérea do trigo que mais danos causa nas lavouras, contribuindo assim para o insucesso da produção de trigo no Brasil. Dependendo do órgão da planta atacada e dos sintomas produzidos, esta moléstia tem recebido várias denominações: mancha marrom, mancha borracha da folha, carvão do nó, ponta preta dos grãos e helmintosporiose. Ocorre em quase todas as áreas cultivadas com trigo, abrangendo os Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal (PRESTES e PICININI, 1984; LUZ, 1982).

*H. sativum* pode atacar raízes, coroa, colmo, folhas, espigas e sementes de trigo, sendo que a infecção pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento da planta. Nas folhas, as lesões se apresentam como manchas necróticas de coloração pardo escuro ou preta, normalmente rodeadas por um halo amarelo. Mais tarde as lesões coalescem e as folhas morrem. Nas espigas, as manchas são marrom-escuro e os grãos formados nestas espigas infectadas expõem o sintoma denominado "ponta preta". Os nós atacados adquirem cor marrom-escuro tornando-se pretos mais tarde pela presença dos conídios do fungo, quando recebem a denominação de "carvão do nó". O patógeno sobrevive em restos de culturas de trigo, cevada, centeio, triticales ou aveia, em gramíneas nativas e em sementes infectadas. Seus esporos, assim como restos de plantas infectadas, podem ser transportados à distância pelo vento,

chuva ou insetos. As sementes infectadas também são fatores importantes na disseminação do fungo (DIEHL,1982;LUZ,1982;PRESTES e PICININI,1984).

MEHTA (1986) calculou as perdas causadas por *H.sativum* em quatro cultivares de trigo, nas condições de campo, no Estado do Paraná. Para evitar a interferência de outras doenças, foram utilizados fungicidas específicos e a intensidade de helmintosporiose foi entre 60% e 95%, gerando perdas em rendimentos entre 31,1% e 79%. Os níveis elevados de perdas levaram o autor a sugerir o controle químico da doença como uma alternativa imediata e esforços maiores no sentido de desenvolver cultivares resistentes a esta moléstia.

LUZ(1982) indica como medidas de controle desta doença o cultivo de trigo em áreas limpas de gramíneas e a rotação de culturas de modo a limitar a persistência do fungo em hospedeiros alternativos; o uso de cultivares que sejam mais resistentes à doença; e o tratamento químico das sementes e da parte aérea das plantas visando a redução da severidade da moléstia.

Segundo DIEHL (1982), no Brasil não existem cultivares de trigo resistentes à doença causada por *H.sativum*. A ocorrência de numerosas raças ou biótipos deste patógeno na natureza dificulta o desenvolvimento e a manutenção de cultivares resistentes (WOOD,1962).

A resistência à mancha foliar em duas variedades de trigo foi determinada, por SRIVASTAVA e cols. (1971), como sendo devida a dois genes dominantes complementares. Já BABAYANTS e KLECHKOVSKAYA (1983) sugeriram que a resistência do trigo à *H.sativum*, seria controlada por poligenes e ADLAKHA e cols. (1984), por outro lado, descreveram a herança desta resistência como devida a um único gene dominante.

1.4. A Técnica de eletroforese em gel aplicada ao estudo da variabilidade genética em populações de fungos fitopatogênicos

Tradicionalmente, a classificação de fungos em gêneros, espécies e até linhagens é baseada em características morfológicas de estruturas vegetativas e reprodutivas. Estas características; entretanto, sofrem grande influência do ambiente e esta plasticidade ambiental é responsável por consideráveis confusões taxonômicas. Além disso, a dificuldade de muitos fungos em produzir estruturas reprodutivas em meio de cultura e a ausência de reprodução sexuada na natureza, como é o caso da maioria das espécies do gênero *Helminthosporium*, aliadas a uma grande variabilidade, dificultam bastante a classificação dos fungos fitopatogênicos.

A eletroforese é uma técnica bastante utilizada nos estu -

dos sobre variabilidade genética em população porque, além de fornecer resultados seguros, permite a análise de um grande número de amostras em tempo relativamente curto e para vários sistemas proteicos, enzimáticos ou não.

Isoenzimas (ou isozimas) são formas moleculares múltiplas de uma enzima que possuem a mesma especificidade de substrato. O termo foi introduzido primeiramente por MARKERT e MOLLER, em 1959, sendo atualmente encontrado com frequência na literatura bioquímica e genética (HARRIS, 1980; McMILLIN, 1983). As isoenzimas constituem-se em marcadores genéticos úteis para o estudo do desenvolvimento e variabilidade dos organismos, pois refletem as alterações que ocorrem a nível de DNA (SCANDALIOS, 1974; OTT e SCANDALIOS, 1978). Sendo assim, a análise das isoenzimas, por serem produtos quase direto dos genes, oferece maior segurança para a resolução de problemas taxonômicos do que a análise de traços morfológicos, que são bastante influenciados pelo ambiente.

A técnica de eletroforese, que depende essencialmente da carga elétrica, tamanho e forma das moléculas, baseia-se na migração diferencial destas moléculas quando submetidas a um campo elétrico. No estudo de sistemas isoenzimáticos, a detecção das regiões de atividade enzimática é feita diretamente no meio suporte de migração (gel de amido ou poliacrilamida) através de métodos histoquímicos de coloração. O padrão eletroforético, com a visualização das enzimas no gel, é denominado zimograma (HUNTER e MARKERT, 1957).

A eletroforese em gel pode ser utilizada para detectar sítios de atividade de várias isoenzimas, sendo de especial interesse para o presente estudo o sistema isoenzimático de esterases.

As esterases são classificadas como hidrolases (E.C. 3) no grupo 3.1 pela União Internacional de Bioquímica, uma vez que catalizam a hidrólise de ligações éster (Enzyme Nomenclature, 1979). O grupo 3.1 é dividido em sete subgrupos; entre eles, o das hidrolases de ésteres carboxílicos (E.C. 3.1.1), que compreende 41 classes relacionadas com o metabolismo das gorduras, originando ácidos graxos livres e glicerídeos parciais, essenciais por participarem de processos metabólicos como oxidações, transportes de ácidos, ressíntese de compostos alcóolicos e fosfóricos (LEMOS 1983).

As esterases são um grupo complexo e heterogêneo de enzimas com ampla especificidade à substratos artificiais. Estão entre as enzimas mais polimórficas dos organismos superiores. Devido ao seu polimorfismo, estabilidade e fácil detecção, estas enzimas caracterizam-se por serem boas marcadoras de mudanças na expressão gênica (COHEN e cols., 1977).

Atualmente, a técnica de eletroforese em gel tem sido aplicada com o objetivo de esclarecer aspectos relacionados à taxonomia de vários fungos fitopatogênicos. Entretanto, a maioria dos trabalhos procura obter padrões eletroforéticos que possam carac-

terizar espécies diferentes pertencentes a um gênero. São em bem menor número os estudos que se propõem a verificar variações entre isolados, dentro de uma determinada espécie de fitopatógenos, utilizando a técnica de eletroforese.

Segundo CLARE e cols. (1968), algumas isoenzimas são de valor taxonômico à nível sub-específico, outras são características de espécies e algumas mostram similaridades inter-específicas, o que indica que elas possam ser características de gêneros.

SNIDER (1973), em sua revisão sobre a aplicação da eletroforese na taxonomia de fungos fitopatogênicos, conclui que a quantidade de variação proteica e isoenzimática intra-específica, entre diferentes isolados, depende muito da espécie em estudo. O autor salienta que não devem ser feitas afirmações generalizadas, que considerem os fungos como um todo. Destaca também que muitos fungos apresentam diferenças em seus padrões proteicos conforme o estágio de desenvolvimento, sendo portanto necessário, para fins de comparação, analisar os indivíduos sempre em uma mesma idade fisiológica.

HENRY e GARBER (1967) submeteram filtrados de culturas de vinte e três cepas de *Colletotrichum lagenarium* à eletroforese em gel para detectar sítios de atividade de esterases. Observaram que cada cepa apresentava um padrão eletroforético característico para essa enzima, concluindo que os zimogra-

mas de esterase poderiam ser utilizados na identificação de cepas desta espécie.

MEYER e RENARD (1969), estudaram várias cepas pertencentes à duas "formae speciales" de *Fusarium oxysporum*, obtendo padrões eletroforéticos para proteínas e esterase diferentes entre as duas formas e também dentro de cada uma delas, entre as cepas. Os resultados mostraram que cepas de uma mesma forma, similares em fenótipo e patogenicidade, obtidas em uma mesma área, eram heterogêneas em sua constituição bioquímica, revelando grande variação intra-específica. Os autores concluíram que os zimogramas obtidos não permitiam a identificação de formas patogênicas, já que as diferenças entre cepas de uma mesma forma eram tão grandes quanto as diferenças entre as formas.

SNIDER (1973) cita o trabalho de MATSUYAMA e KOSAKA (1971), com o fungo do arroz, *Pyricularia oryzae*, como o único até então onde foi encontrada uma correlação entre os padrões de esterase, patogenicidade e distribuição geográfica do patógeno.

BURDON e ROELFS (1985) estudaram as variações intra-específicas quanto a virulência e padrões isoenzimáticos de duas espécies de *Puccinia*: *P. graminis* e *P. recondita*, encontrando muitos fenótipos de virulência para cada espécie. Em *P. recondita*; entretanto, esta diversidade em virulência contrastava com um baixo nível de diversidade isoenzimática, enquanto que em *P. graminis* foi detectado um fenótipo isoenzimático a mais do que o número de fenótipos de virulência. Os autores não encontraram correlação

entre os grupos principais de virulência e as diferenças isoenzimáticas entre grupos; embora dentro de cada grupo de virulência, com uma única exceção, todas as raças apresentavam o mesmo padrão isoenzimático. Diferenças isoenzimáticas marcantes foram encontradas entre as populações da Austrália e dos Estados Unidos, nestas espécies.

As variações em vinte e uma enzimas de setenta e seis isolados representando as três variedades taxonômicas de *Leptographium wageneri*, um fungo que causa doença em coníferas, foram analisadas por ZAMBINO e HARRINGTON (1989) utilizando eletroforese em gel. Estas variedades, diferenciadas até então por critérios morfológicos e fisiológicos, são específicas a diferentes espécies hospedeiras. As distâncias genéticas entre os isolados, calculadas de acordo com os padrões eletroforéticos, revelaram três grupos bem definidos que correspondiam exatamente às três variedades. A diversidade gênica observada foi alta entre as variedades e baixa dentro de cada variedade, levando os autores a concluir que, na verdade, as três variantes morfológicas hospedeiro-específicas eram variedades taxonômicas e que a recombinação genética entre elas, na natureza, é rara ou inexistente.

NIGAARD e cols. (1989) encontraram diversidade isoenzimática intra-específica entre isolados do fitopatógeno *Phytophthora megasperma* oriundos de dez espécies hospedeiras e de várias regiões geográficas. Estes isolados representavam muitos tipos morfológicos e incluíam as três "formae speciales"

desta espécie, tendo sido separados em seis grupos através de análise isoenzimática: três grupos referentes às três formas e outros três relacionados às espécies hospedeiras. Como estes grupos correspondiam àqueles identificados previamente com base em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, os autores salientam o grande valor da técnica de eletroforese de isoenzimas na diferenciação e agrupamento de isolados dentro de uma espécie.

Uma tentativa em diferenciar espécies do gênero *Helminthosporium* foi feita por BONTEA e GROU (1972). Além de analisar proteínas solúveis através de eletroforese em gel, estudaram também a composição de aminoácidos livres em conídios de nove espécies de *Helminthosporium*, inclusive *H.sativum*, não encontrando nenhuma diferença significativa entre as espécies e concluindo que estes parâmetros não são úteis como critério básico de diferenciação destas espécies.

Os três autores a seguir demonstraram histoquimicamente a presença de atividade esterásica, em fungos, próxima aos sítios de penetração fúngica no tecido hospedeiro.

NICHOLSON e cols.(1972) detectaram atividade de esterase em esporos e tubos germinativos de *Venturia inaequalis* durante um período de doze horas após inoculação em superfícies hospedeiras e não-hospedeiras. A atividade enzimática foi observada no vértice dos esporos, o que sugere uma função em degradar e rom-

per a célula, de modo a possibilitar a germinação. Foi encontrada também no apressório, o que indica uma função associada à penetração fúngica no tecido hospedeiro.

McKEEN (1974) detectou atividade esterásica no ápice dos tubos germinativos de *Botrytis cinera* sete horas após inoculação em *Vicia faba*, o que coincide com a época de penetração do parasita na cutícula foliar do hospedeiro. O autor sugeriu que no ápice do tubo germinativo onde o poro de infecção é formado, as esterases poderiam contribuir para tornar a parede fúngica mais plástica e assim dissolver a cutícula do hospedeiro.

KUNOH e cols. (1988) observaram que os esporos de *Erysiphe graminis*, quando em contato com a parede celular do hospedeiro, produzem um líquido que dissolve as ceras epicuticulares; este líquido é composto por várias enzimas, entre elas a esterase.

### 1.5. Objetivos

Apesar do grande número de publicações relacionadas à variabilidade em *Helminthosporium sativum*, detectada freqüentemente a nível morfológico e fisiológico, não foi localizado até o momento nenhum trabalho que objetivasse investigar esta variabilidade a nível isoenzimático, utilizando a técnica de eletroforese em gel. Estudos pioneiros nesta área foram iniciados em 1984, envolvendo os Departamentos de Genética e Fitotecnia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e o Centro Nacio-

nal de Pesquisas do Trigo (CNPT) - EMBRAPA. Alguns resultados preliminares já foram obtidos por MATSUMURA e cols. (1987 e 1988), LINDEM e cols. (1988) e FREITAS e MATSUMURA (1989). Estes resultados preliminares indicam a existência de variação nos padrões de esterase de *H.sativum*, bem como diferenças no comportamento dos isolados desta espécie quando inoculados em diferentes cultivares de trigo. Face a isto, o presente trabalho tem como objetivos:

- avaliar a virulência de diferentes isolados de *H.sativum* em duas cultivares de trigo portadoras de diferentes graus de resistência ao patógeno, analisando também as alterações em virulência decorrentes de passagens sucessivas dos isolados fúngicos pelas cultivares hospedeiras;

- verificar se as variações inter e intra-isolados, observadas à nível de virulência, são acompanhadas por alterações bioquímicas no sistema isoenzimático de esterases, que será analisado eletroforeticamente após cada passagem pelas cultivares hospedeiras;

- detectar possíveis diferenças nos padrões eletroforéticos de esterases em diferentes estágios de desenvolvimento do fungo (conídios e colônias);

- testar a especificidade dos isolados fúngicos às suas cultivares hospedeiras de origem através de testes de patogenicidade diretos e cruzados; analisar o potencial genético para patoge

nicidade e/ou virulência deste fungo, observando se os isolados são capazes de adaptarem-se à outra cultivar hospedeira, que não a sua original, ao longo das inoculações.

## 2 . MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no período de julho de 1988 a outubro de 1989, nos laboratórios e casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com a colaboração do Departamento de Genética desta Universidade e do Centro Nacional de Pesquisas do Trigo - EMBRAPA, de Passo Fundo, RS.

### 2.1 . Material

#### 2.1.1. Isolados de *Helminthosporium sativum*

##### 2.1.1.1. Origem e Características dos isolados fúngicos

*H. sativum* apresenta-se na natureza em sua forma infectiva, de reprodução assexuada, com as seguintes características (segundo LUZ, 1987): conidióforos solitários ou em pequenos grupos, retos ou flexuosos, marron-escuros, 60-240  $\mu\text{m}$  x 6-10mm; célula conidiógena politétrica, simpodial, cicatrizada; conídios curvados ou retos, fusóides a largamente elipsoidais, 3-12 septos, 40-120

x 17 -28  $\mu\text{m}$ , germinando de uma ou das duas células polares; tubo germinativo do tipo semiaxial.

As características taxonômicas desta espécie encontram-se no item 1.2.1.

Isolados de *H.sativum* foram obtidos a partir de cultivares hospedeiras de trigo cujas plantas apresentavam sintomatologia característica da doença, semelhante à descrita por DIEHL (1982), LUZ(1982) e PRESTES & PICININI(1984), que consta em 1.3. Esta coleta de material direto nas lavouras foi realizada por CNPT - EMBRAPA, entre os anos de 1982 e 1984, em diferentes regiões geográficas do Brasil. Os tecidos vegetais infectados foram colocados em sacos de papel, etiquetados, acondicionados em sacos plásticos e estocados a 4 °C para estudos posteriores.

Trinta destas amostras fúngicas, sendo sete oriundas da cultivar IAC 5.MARINGÁ e vinte e três da cultivar BR 4 foram isoladas, purificadas, analisadas e novamente inoculadas nas mesmas cultivares das quais foram obtidas, por MATSUMURA e cols(1988). A inoculação foi realizada em casa de vegetação no CNPT - EMBRAPA, Passo Fundo, em plantas jovens (3 folhas) por aspersão da parte aérea com os inóculos dos isolados fúngicos purificados. Após a avaliação da infecção, as folhas infectadas foram acondicionadas e estocadas a 4°C, tendo sido mantidas desde então no laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

Os isolados utilizados nas ETAPAS nºs 1,2 e 3 deste estudo têm sua origem descrita a seguir.

O material fúngico utilizado na ETAPA 1 foi isolado das folhas de cultivares inoculadas por MATSUMURA e cols (1988), sendo três oriundos da cultivar IAC 5. MARINGÁ (isolados nºs 44, 74 e 222) e três oriundos da cultivar BR 4 (isolados nºs 18,21 e 49<sub>4</sub>). Estes seis isolados foram escolhidos, entre os trinta disponíveis, com base nos seus índices de infecção na cultivar hospedeira original. Os isolados selecionados foram o mais virulento, o menos virulento e o intermediário em virulência, de cada cultivar. Este critério foi adotado para a seleção das amostras tendo em vista a obtenção de isolados distinguíveis em virulência; deste modo pode-se verificar se estas diferenças em virulência são mantidas ou não, ao longo das inoculações. O ano de coleta das amostras na natureza, bem como sua cultivar hospedeira e local de origem, estão na Tabela 1.

TABELA 1. Ano de coleta, cultivar hospedeira e local de origem dos isolados de *H.sativum* utilizados na ETAPA 1.

Isolado	Ano	Hospedeiro	Local
44	1984	IAC 5.MARINGÁ	São Gotardo - MG
74	1982	IAC 5.MARINGÁ	Ubiratã - PR
222	1984	IAC 5.MARINGÃ	Três de Maio - RS
18	1984	BR 4	Ibirubá - RS
21	1984	BR 4	Cruz Alta - RS
494	1984	BR 4	Passo Fundo - RS

Após serem purificados, conforme descrito em 2.1.1.2., e analisados quanto a morfologia e atividade esterásica, segundo metodologia detalhada em 2.2., estes seis isolados foram inoculados, cada um, sobre sua cultivar hospedeira de origem (inoculação direta) e sobre a outra cultivar (inoculação cruzada), conforme descrito em 2.2.3. A infecção de cada cultivar por cada isolado, deu origem a uma fonte de amostra, obtendo-se; portanto, doze novas fontes de amostras fúngicas. Destas doze amostras resultantes da inoculação realizada na ETAPA 1, oito foram utilizadas nas ETAPAS 2 e 3. Não foram utilizadas as doze amostras porque não havia espaço disponível para plantar e manter as cultivares hospedeiras, nem material de consumo na quantidade que seria necessário. As oito amostras foram escolhidas com base na especificidade dos isolados a cultivar hospedeira de origem, o que pode ser verificado pelos índices de infecção dos isolados na ETAPA 1. Os isolados menos específicos (22 e 21) apresentam as menores diferenças em infectividade entre as cultivares (item 3.3). Este critério foi adotado tendo em vista que um dos objetivos deste estudo era avaliar a especificidade do patógeno a sua cultivar original e a capacidade deste adaptar-se à outra cultivar. Cada um dos quatro isolados originais, que se mostraram mais específicos, deu origem a dois isolados diferenciados pela cultivar de onde foram obtidos.

Deste processo resultaram oito isolados, que foram utilizados nas ETAPAS 2 e 3; cada um teve o código da cultivar de onde foi recuperado adicionado ao seu número original. A Tabela 2 contém os

códigos dados a estes isolados e a Figura 1 mostra como foram ob-  
tidos.

TABELA 2 - Isolados de *H.sativum* utilizados nas ETAPAS 2 e 3.

Isolado	Hospedeiro
44 - MAR	IAC 5.MARINGÁ
44 - BR <sub>4</sub>	BR 4
74 - MAR	IAC 5.MARINGÁ
74 - BR <sub>4</sub>	BR4
18 - MAR	IAC 5.MARINGÁ
18 - BR <sub>4</sub>	BR4
49 <sub>4</sub> - MAR	INC 5.MARINGÁ
49 <sub>4</sub> - BR <sub>4</sub>	BR4

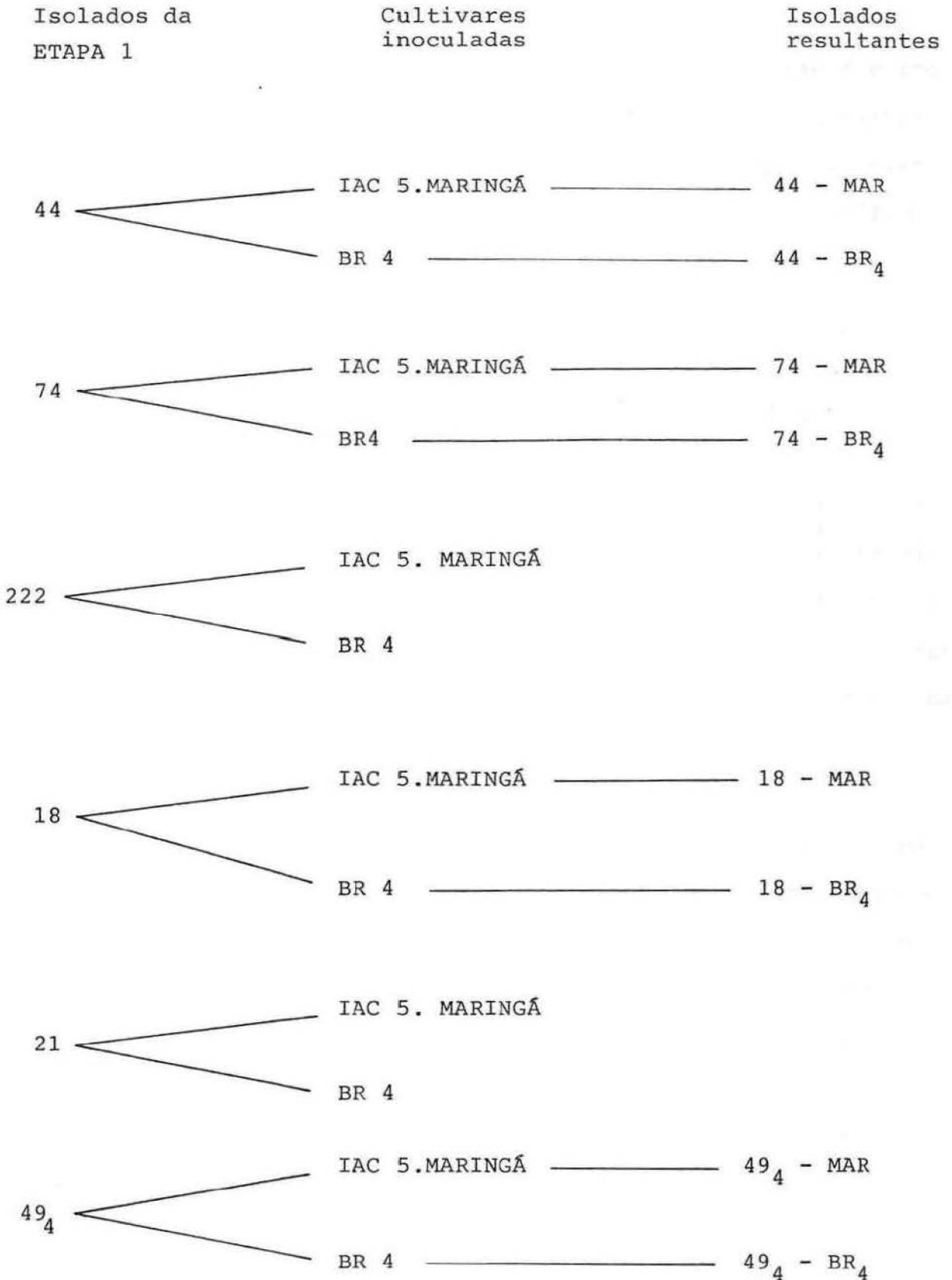


FIGURA 1 : LEGENDA NA PÁGINA SEGUINTE

FIGURA 1 - Esquema simplificado do processo de obtenção dos isolados fúngicos utilizados nas ETAPAS 2 e 3 a partir dos isolados da ETAPA 1. Os isolados 222 e 21 foram excluídos destas etapas por serem os menos específicos a cultivar original.

#### 2.1.1.2. - Obtenção e Isolamento de Culturas Puras

As culturas de *H. sativum* foram obtidas a partir das plantas infectadas pelo fungo, sendo as culturas da ETAPA 1 obtidas das plantas inoculadas por MATSUMURA e cols. (1988); as culturas da ETAPA 2 obtidas das plantas inoculadas na ETAPA 1 deste estudo; e as culturas da ETAPA 3 obtidas das plantas inoculadas na ETAPA 2 deste estudo (Figura 2).

Os segmentos das plantas contendo as lesões causadas pelo fungo foram retirados do tecido vegetal hospedeiro, deixando-se uma margem de tecido sadio junto à lesão. Estes segmentos passavam, então, por uma desinfestação superficial em água corrente, álcool 50% durante 1 minuto e solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% durante 2 minutos. Após eram lavados várias vezes em água destilada e transferidos para papel absorvente a fim de retirar o excesso de água. Em seguida, 5 segmentos eram colocados em cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro, esterilizada, contendo 25 ml de meio de cultura sólido BDA (Batata Dextrose Agar-Mer

ck: 39 g de meio desidratado para 1000 ml de água destilada, esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121° C e 1 atm), em capela de fluxo laminar para melhorar as condições de assepsia. Foram preparadas 3 placas para cada isolado, sendo estas placas colocadas em estufa incubadora para B.O.D. Modelo 347.FG da FANEM, a 24°C, com umidade em torno de 80% e regime de 12 horas luz/12 horas escuro.

Após sete dias de incubação as colônias eram analisadas, fazendo-se a identificação das estruturas vegetativas de *H.sativum* para comprovar serem as colônias desta espécie. De modo a obter colônias puras deste fungo, foram realizados repiques (transporte de partes da colônia) das placas para tubos de ensaio com BDA sólido inclinado e rolha de algodão, sendo o conjunto esterilizado em autoclave antes do repique. Estes tubos foram incubados nas mesmas condições das placas até o completo desenvolvimento das colônias, depois, devidamente identificados e acondicionados em sacos plásticos, foram transferidos para o refrigerador onde ficaram estocados a aproximadamente 4°C. Para cada isolado foram estocados 15 tubos, em cada etapa, que serviriam de fonte primária de amostra para as análises a serem realizadas.

#### 2.1.2. Cultivares hospedeiras de *Triticum aestivum*

##### 2.1.2.1 - Características das cultivares IAC 5.Maringá e BR 4.

*Triticum aestivum* (L) Thell é classificada botanicamente co-

mo pertencendo à Família Gramineae, Tribo Triticeae Dumont (= Hordeae), Sub-tribo Triticinae, Gênero *Triticum* (LINEU, 1753) e espécie *aestivum*.

Esta espécie é alopoliplóide ( $2n = 6X=42$ ), resultante de hibridização natural entre uma espécie tetraplóide (*Triticum turgidum* :  $2n=28$ ) e uma diplóide selvagem (*Aegilops squarosa* :  $2n=14$ ) (SCHEEREN, 1986).

Neste estudo foram utilizadas, como hospedeiras, plantas das cultivares de trigo IAC 5.MARINGÁ e BR 4, cujas sementes foram cedidas pelo CNPT-EMBRAPA (Passo Fundo, RS). Pertencem ao grupo de cultivares preferenciais precoces, do qual participam cultivares que, experimentalmente, têm demonstrado bom comportamento agrônomico.

A cultivar IAC 5.MARINGÁ foi criada pelo melhorista ALCOVER, em 1966, na Estação Experimental de Capão Bonito, no Sul de São Paulo. Foi lançada comercialmente em 1972 e, desde então, tem sido bastante utilizada nos Estados do RS e PR devido ao seu excelente comportamento e amplitude de adaptação. Esta cultivar tem sido empregada em programas de melhoramento no Brasil e em outros países, como México (LAGOS, 1983). É considerada susceptível à infecção por *H.sativum*.

Conforme informações do CNPT - EMBRAPA, de Passo Fundo, a cultivar BR 4 foi criada, em 1968, em Pelotas - RS pelo IPEAS Pe

lotas, CNPT - EMBRAPA - Passo Fundo e UFPEL - Pelotas. Foi lançada comercialmente em 1979, sendo recomendada para todas as regiões tritícolas do RS. Apresenta uma reação de resistência moderada à infecção por *H.sativum*.

#### 2.1.2.2. Plantio e Preparo das plantas para os testes de patogenicidade

O plantio das cultivares utilizadas como hospedeiras nos testes de patogenicidade foi realizado em vasos de plástico com 8,5 cm de diâmetro na boca, 5,2 cm de diâmetro na base e 10 cm de altura. Os vasos continham solo preparado (terra preta, material orgânico fermentado, calcáreo, uréia e adubo químico) corrigido para acidez e adubado com sulfato de amônio, superfosfato triplo e cloreto de potássio; segundo recomendação feita pelo Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS. O solo era esterilizado em forno, a 180°C durante 3 horas, 15 dias antes de cada plantio (o solo deve repousar por duas semanas após a esterilização). Em cada vaso, etiquetado de acordo com a cultivar que recebia, foram colocadas seis sementes de trigo.

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com temperatura em torno de 20°C desde o plantio até 24 horas antes das inoculações com o fungo, quando eram transferidos para câmara úmida. As plantas eram inoculadas quando estavam com a terceira folha bem desenvolvida. O número de plantas envolvidas em cada etapa, bem como a metodologia utilizada nas inoculações, estão descritos em 2.2.3.2.

## 2.2. Métodos

Este trabalho foi dividido em três etapas, sendo que cada etapa inicia com a obtenção de colônias a partir de plantas inoculadas com os isolados de *H.sativum* da etapa anterior (conforme 2.1.1.2.) e termina com a inoculação dos esporos obtidos a partir destas colônias em novas plantas. A Figura 2 representa a seqüência em que foi realizado este estudo, bem como as análises que foram feitas em cada etapa.

Esta metodologia de inoculação, recuperação dos isolados, análises e nova inoculação, reiniciando o ciclo, foi utilizada porque possibilita um acompanhamento detalhado e progressivo do comportamento dos isolados em plantas hospedeiras e meios de cultura.

Os métodos utilizados nas análises, descritos a seguir, foram sempre os mesmos em todas as etapas. Após a ETAPA 3 foi feita uma análise adicional, em colônias que foram obtidas a partir dos esporos E3 (ver Figura 2).

Plantas inoculadas  
por MATSUMURA e cols. (1988)



Figura 2 . Metodologia utilizada na obtenção de inóculos para as três etapas sucessivas deste trabalho, bem como as análises realizadas em cada uma delas.

### 2.2.1. Análise de Características Fúngicas em Meio Artificial

Em meio artificial analisou-se essencialmente a coloração pre dominante da massa miceliana (nas colônias) e dos esporos porque alguns trabalhos realizados com *H.sativum* relacionam esta característica com a virulência dos isolados. A coloração foi observada em cada etapa a fim de verificar-se possíveis alterações e seus reflexos na virulência.

#### 2.2.1.1. Análise de Colônias em BDA

As colônias de cada isolado foram analisadas quanto à coloração predominante da massa miceliana e também quanto a presença de setores (formação, na colônia, de zonas diferenciadas em cor e textura).

As observações foram feitas nas colônias purificadas em tubos de ensaio (conforme descrito em 2.1.1.2) e também em placas de Petri, com BDA sólido (Batata Dextrose Agar - Merck) como meio de cultura. Para cada isolado, em cada etapa, foram preparadas 5 placas de Petri, através de repiques. Estes repiques foram feitos a partir dos tubos de ensaio, que continham as colônias purificadas do estoque inicial dos isolados, para as placas de Petri, utilizando-se uma agulha histológica que era introduzida no tubo e depois bem no centro da placa. As placas assim preparadas foram incubadas em estufa B.O.D. à 24°C e 12h luz/12h escuro. Todo o procedimento foi realizado em ambiente asséptico, sendo a agulha es-

terilizada antes de ser introduzida em cada tubo.

As análises foram sempre realizadas em colônias com 8 dias. As colônias em placas de Petri analisadas quanto à cor e formação de setores foram as mesmas analisadas por eletroforese, conforme descrito em 2.2.2. As colônias em tubos de ensaio analisadas foram as mesmas que deram origem aos esporos, como é descrito em 2.2.1.2.

Todas as colônias analisadas nas etapas 1,2 e 3 foram obtidas a partir de folhas infectadas com o fungo. Após a etapa 3 foi feita uma análise adicional, em colônias obtidas a partir de esporos. Em cada placa de Petri com BDA sólido foram colocadas quatro sementes de sorgo repletas de esporos da ETAPA 3, com o auxílio de uma pinça esterilizada (sementes de sorgo é o meio utilizado para esporulação, conforme 2.2.1.2.) As placas foram então incubadas nas condições habituais tendo sido repicadas para mais 5 placas de cada isolado após o desenvolvimento completo das colônias.

As colônias oriundas do repique foram analisadas, após 8 dias, quanto à cor, formação de setores e também por eletroforese.

#### 2.2.1.2. Análise de Esporos em Sementes de Sorgo

O meio de sementes de sorgo autoclavadas (60 g. de sementes

de sorgo sadias e sem tratamento químico, 60 ml de água destilada) é utilizado para a obtenção de esporos (conídios) sem que haja crescimento de massa miceliana (JOSHI e cols., 1969).

As sementes foram lavadas várias vezes com água corrente, escurridas, colocadas em frascos de 500 ml e embebidas com água destilada. Os frascos eram tampados com rolha de algodão. Foi preparado, em cada etapa, um frasco para cada isolado e um frasco controle adicional, que não recebia o inóculo fúngico e era preparado a fim de verificar se realmente nenhum outro fungo estaria crescendo nas sementes. Os conjuntos permaneciam em repouso, à temperatura ambiente, por 24 horas. Após este período, retirado o excesso de água, eram autoclavados duas vezes por 30 minutos, à 121°C e 1atm. Imediatamente após a retirada da autoclave, os frascos eram agitados até as sementes se separarem completamente.

Os repiques foram feitos a partir das colônias do estoque inicial, raspando-se todo o material fúngico de três tubos de ensaio para cada frasco com sementes de sorgo, após as sementes atingirem a temperatura ambiente e em condições de esterilidade. A partir do terceiro dia, contando como primeiro o dia da inoculação das sementes, os frascos eram agitados diariamente para facilitar a dispersão dos esporos entre as sementes de sorgo.

Os conjuntos assim preparados ficavam incubados do dia da inoculação até a completa esporulação do fundo (cerca de 20 dias) à 24°C, em regime de 12h luz/12 h escuro. Após este período, eram

utilizados no preparo dos inóculos fúngicos para os testes de patogenicidade e na análise eletroforética dos esporos.

Antes do preparo do inóculo com este material, era analisada a coloração dos esporos, visível nas paredes do frasco e também pela cor das sementes que estavam com a superfície cheia de esporos, e a porcentagem de esporulação. Esta porcentagem foi estimada com base no percentual de sementes que estavam totalmente cobertas por esporos em relação ao total de sementes no frasco.

Ao preparar os inóculos, conforme descrito em 2.2.3.1., foi observado se a produção de conídios atingia  $1 \times 10^5$  conídios por ml de suspensão (concentração fixada para os inóculos), bem como a presença de hifas ou de outros tipos de estruturas. Estas análises foram realizadas ao microscópio, com a suspensão de conídios em câmara de Neubauer.

## 2.2.2. Eletroforese

### 2.2.2.1. Sistema Isoenzimático

O sistema isoenzimático utilizado nas análises deste trabalho foi o de alfa e beta-esterases (EST). Entre os vários sistemas isoenzimáticos testados por MATSUMURA (comunicação pessoal) para a análise eletroforética de amostras fúngicas, o de alfa e beta-esterases foi o que apresentou melhores resultados por ter um padrão de bandas bem definidas, ser de fácil visualização, e por ser o mais polimórfico, apresentando variações entre

os isolados estudados; por estas razões foi o escolhido para este trabalho.

#### 2.2.2.2. Preparo dos géis

Foram utilizados géis de poliacrilamida na concentração de 8%, com 0,1 cm de espessura. No preparo dos géis foram utilizados os tampões A e B de SCANDALIOS (1969), na proporção de 1A:9B, em seu pH original de 8,3. Este tampão foi também utilizado na homogeneização do material.

#### Tampões Scandalios:

Tampão A : borato de lítio pH 8,3 0,24 M

hidróxido de lítio.....1,20g  
ácido bórico (anidro).....11,89g  
água destilada.....até 1000 ml

Tampão B: tris citrato pH 8,3 0,0595 M

tris.....6,20g  
ácido cítrico.....1,60g  
água destilada.....até 1000 ml

Cada gel foi preparado com 60 ml de tampão, ao qual adicionava-se 4,56 g de acrilamida, 0,24g de bisacrilamida, 0,06 ml de N,N,N',N' tetrametiletlenodiamina (TEMED) e 0,6 ml de per - sulfato de amônia a 10%.

A solução dos géis era colocada em canaletas de vidro com di mensões internas de 17,0 cm x 15,0 cm e 0,1 cm de altura. Após co locada a solução, esta canaleta era coberta com uma placa de vi - dro previamente untada em sua superfície interna com óleo de sili cone, para evitar que o gel ficasse aderido á tampa. Mantinha-se o conjunto a temperatura ambiente por cerca de 20 minutos para per mitir a polimerização e, após, transferia-se para uma câmara fria a 4°C, onde permanecia até a aplicação das amostras.

#### 2.2.2.3. Preparo das amostras fúngicas

As análises foram realizadas em colônias (2.2.2.3.1.) e em esporos (2.2.2.3.2.) de todos os isolados fúngicos, em cada uma das três etapas deste trabalho.

A homogeneização das amostras era feita em uma placa acrí - lica, com escavações arredondadas, sobre gelo picado. Em ca - da sulco da placa era colocada a amostra correspondente a um iso lado e 0,1 ml de tampão para homogeneização. O tampão foi o mes - mo utilizado no preparo do gel; SCANDALIOS 1A:9B. As amostras e - ram homogeneizadas com um bastão de vidro de extremidade esmeri - lada.

Sobre cada homogenado foi colocado um disco de papel "Pluma - tex" branco, com 0,65 cm de diâmetro, para fazer uma filtragem e evitar que resíduos não homogeneizados fossem carregados junto ' com os papéis porta-amostra. Em cada amostra, sobre o papel "Plu

matex", foram colocados três retângulos de papel Whatman 3MM (papeis porta-amostra) medindo 4,0mm X 1,0 mm, para absorver o homogenado. Estes três papéis eram usados na aplicação das três repetições de cada isolado no gel.

As amostras de colônias e esporos foram obtidas conforme descrito a seguir.

#### 2.2.2.3.1. Colônias

As colônias utilizadas para eletroforese em cada etapa deste trabalho, foram as mesmas que foram analisadas quanto a coloração e formação de setores, cujo processo de obtenção está descrito em 2.2.1.1.

As amostras para análise eletroforética foram obtidas de colônias com oito dias de crescimento. Para cada isolado foram utilizadas colônias de duas placas de Petri, retirando-se todo o material fúngico que estava acima do meio de cultura (BDA) com o auxílio de uma alça metálica. Este material (colônias) contendo micélio, conidióforos e conídios, era então colocado nos sulcos da placa de homogeneização, sendo cada sulco correspondente a um isolado.

#### 2.2.2.3.2. Esporos

Os esporos utilizados nas análises eletroforéticas, em cada etapa, foram produzidos em meio de sementes de sorgo, conforme descrito em 2.2.1.2. Estes esporos foram analisados também

quanto à coloração, calculando-se ainda a porcentagem de esporulação.

Após cerca de 20 dias da inoculação das sementes de sorgo com os isolados fúngicos, os esporos eram utilizados no preparo dos inóculos para os testes de patogenicidade. Porém, antes de adicionar água para fazer a suspensão de esporos (conforme descrito em 2.2.3.1.), uma porção de sementes de sorgo repletas de esporos era retirada de cada frasco e colocada em frascos menores, com tampa de algodão, autoclavados, em condições de esterilidade. Estes frascos, um de cada isolado, eram colocados na incubadora por mais 15 dias, sempre mantidos à 24°C e 12h luz/12h escuro, para que a esporulação atingisse o máximo neste meio de sementes de sorgo.

As amostras para eletroforese foram obtidas após 35 dias de esporulação, raspando-se com uma espátula os esporos das paredes e fundo dos frascos e das sementes. Estes esporos eram colocados na placa de homogeneização até encher a metade dos sulcos, sendo cada sulco correspondente a um isolado.

#### 2.2.2.4. Aplicação das amostras no gel e migração

Para aplicar as amostras, retirava-se a placa de vidro que cobria o gel, envolvendo-o com um Zapp. Com o auxílio de um pente de aço, eram abertas 24 fendas de 4 mm de comprimento cada, onde eram inseridos os papéis porta-amostras. Estas fendas eram abertas a 3 cm de uma das extremidades do gel.

Para fins comparativos, cada amostra foi repetida três vezes no gel, sendo as repetições de todas as amostras colocadas duas a duas, lado a lado no gel, e depois mais uma repetição de cada amostra em seqüência. As amostras de esporos foram aplicadas em dois géis e as de colônias em três géis (devido a coloração diferencial - item 2.2.2.5.), para que fosse possível detectar qualquer problema ou distorção devido a migração. Sendo assim, cada amostra de esporos migrou seis vezes e de colônia, nove vezes.

Após terem sido introduzidas nas fendas do gel, três das amostras eram coradas com azul de bromofenol para delimitar a linha de frente durante a migração.

Os géis assim preparados, cobertos com Zapp para evitar a evaporação, eram colocados em cubas eletroforéticas horizontais, mantidas a 4°C, contendo tampão A de SCANDALIOS (1969) em seu pH original de 8,3. As pontes catódica e anódica eram mantidas a uma distância de 12 cm entre si e as migrações ocorreram com uma diferença de potencial de 10V/cm (corrente contínua). Quando a linha de frente atingia 8 cm de distância do ponto de aplicação, a migração era interrompida.

#### 2.2.2.5. Revelação e fixação dos géis

Após a migração, retirava-se os géis das canaletas, removiam-se os papéis porta-amostra e colocava-os na solução reveladora para alfa e beta-esterases. No caso dos géis contendo as amostras

de colônias, além da revelação para alfa e beta-esterases juntas, foram feitos mais dois géis: um revelado somente para  $\alpha$ -esterase e outro somente para  $\beta$ -esterase. Neste caso, a solução de revelação era a mesma, mas ao invés de colocar os dois substratos, colocava-se somente  $\alpha$ -naftil acetato ou somente  $\beta$ -naftil acetato, conforme fosse revelar para  $\alpha$  ou  $\beta$ -esterase.

Esta revelação separada foi feita com o objetivo de verificar se as bandas que apareciam nos géis revelados para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases juntas eram bandas  $\alpha$  ou  $\beta$  puras, ou eram mistas mas com mais afinidade por um ou outro substrato.

A revelação para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases foi realizada segundo a técnica descrita por SCANDALIOS (1969), com algumas modificações:

$\alpha$ - naftil acetato (1%).....	2 ml
$\beta$ - naftil acetato (1%).....	3 ml
Fast Blue RR(Sal).....	50,0 mg
Tampão C.....	50 ml
Tampão D.....	10 ml
Água destilada.....	40 ml

Tampão C: Fosfato pH 4,3 0,2 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .....	27,8 g
água destilada.....	completar 1000ml

Tampão D : Fosfato pH 9,2 0,2M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....53,63 g

Água destilada.....completar 1000 ml

$\alpha$ -naftil acetato e  $\beta$ -naftil acetato foram dissolvidos, separadamente, em acetona e água na proporção de 1g sal: 50ml acetona: 50 ml água destilada.

Os géis foram mantidos na solução de revelação por uma hora e trinta minutos a 37°C. Depois eram lavados em água destilada e fixados em solução de água, álcool metílico e ácido acético na proporção de 5:5:1, durante 15 minutos. Após este período os géis eram envoltos em Zapp, analisados e colocados dentro de uma caixa plástica com tampa, permanecendo a 4°C.

#### 2.2.2.6. Análise dos géis

Os géis foram analisados logo após sua fixação. Em papel milimetrado foram feitos esquemas dos padrões obtidos nos géis, registrando-se a distância de cada banda com relação ao ponto de aplicação, a intensidade da banda (forte, média, fraca e fraquíssima) e a distância migrada pela linha de frente.

A partir destes dados foram elaborados zimogramas contendo os RM (mobilidade relativa) das bandas. O RM de cada banda foi calculado dividindo-se a distância migrada no pon -

to médio da banda pela distância migrada pela linha de frente.

### 2.2.3. Testes de Patogenicidade Diretos e Cruzados

No final de cada uma das três etapas, após os isolados fúngicos terem sido analisados quanto às características em meio de cultura e também por eletroforese, eram realizados testes de patogenicidade para verificar a virulência dos isolados em cada uma das cultivares hospedeiras de trigo: IAC 5.MARINGÁ e BR 4.

Nos testes de patogenicidade diretos, os isolados eram inoculados sobre a cultivar de onde foram coletados na natureza, ou seja, sobre a sua cultivar hospedeira original. Já nos testes de patogenicidade cruzados, os isolados eram inoculados sobre a outra cultivar, que não a sua original. Em cada etapa, cada um dos isolados foi submetido a um teste de patogenicidade direto e um cruzado.

#### 2.2.3.1. Preparo dos Inóculos Fúngicos

Os inóculos foram preparados com os esporos (conídios) produzidos em meio de sementes de sorgo, conforme foi descrito em 2.2.1.2.

Para o preparo das suspensões de conídios que serviram de inóculo nos testes de patogenicidade, adicionava-se inicialmente 1000 ml de água esterilizada em cada frasco contendo conídios em sementes de sorgo. Agitava-se fortemente para separar bem os conídios

das sementes e filtrava-se a suspensão com auxílio de um funil e gaze, de modo a deixar as sementes de sorgo fora do inóculo. A seguir, retirava-se uma alíquota da suspensão, para contagem de conídios em Câmara de Neubauer, sendo adicionada água esterilizada até o inóculo atingir a concentração de  $10^5$  conídios por ml de suspensão aquosa.

#### 2.2.3.2. Inoculação nas cultivares hospedeiras

As cultivares de trigo IAC 5.MARINGÁ e BR 4, utilizadas como hospedeiras nos testes de patogenicidade, foram preparadas para receber os inóculos conforme foi descrito em 2.1.2.2. Quando as plantas estavam com a terceira folha bem desenvolvida, 24 horas antes das inoculações eram transferidas da casa de vegetação para uma câmara úmida com temperatura de 20°C e 100% de umidade. Nesta câmara úmida recebiam os inóculos fúngicos e permaneciam mais 24 horas após a inoculação, voltando então para a casa de vegetação e ficando a 20°C e 70% de umidade relativa durante seis dias, quando era feita a avaliação da infecção.

As plantas foram inoculadas utilizando-se pulverizadores com capacidade para 500 ml. Cada inóculo, correspondente a um isolado, tinha seu próprio pulverizador para evitar contaminação de um inóculo para outro. As inoculações foram feitas pulverizando as plantas, com o inóculo, dentro de "caixas" plásticas, sendo que cada isolado tinha sua própria "caixa", dentro da qual eram colocadas as plantas que receberiam o inóculo daquele isola-

do. Como cada isolado tinha um pulverizador e uma "caixa" próprios, pode-se garantir que cada grupo de plantas (colocado em uma "caixa") recebeu esporos somente do isolado que estava sendo inoculado no grupo. Estas "caixas" foram confeccionadas com plástico resistente e tinham uma abertura frontal por onde era feita a inoculação. A Figura 3 mostra a "caixa" e o pulverizador de um dos isolados, bem como a abertura frontal e a maneira como era feita a inoculação. As testemunhas também eram colocadas dentro de uma "caixa", sendo pulverizadas com água esterilizada.

Na ETAPA 1 tinha-se seis isolados que haviam sido obtidos das suas cultivares originais. A inoculação da ETAPA 1 foi; portanto, a primeira inoculação cruzada (uma inoculação direta já havia sido feita por MATSUMURA e cols., 1988). Cada um dos seis isolados foi inoculado sobre quatro vasos de cada cultivar, sendo que cada vaso continha seis plantas. Foram utilizados 24 vasos com plantas da cultivar IAC 5.MARINGÁ e 24 vasos da cultivar BR 4, para serem inoculados com os isolados, e mais 4 vasos de cada cultivar para testemunha. No total, foram utilizados 28 vasos da cultivar IAC 5.MARINGÁ, com 168 plantas ao todo (28 x 6) e 28 vasos da cultivar BR 4, também com 168 plantas ao todo. Como se tinha seis isolados, foram utilizadas seis "caixas" plásticas para pulverizar os isolados e uma "caixa" para as testemunhas, pulverizadas com água esterilizada. Dentro de cada caixa foram colocados quatro vasos da cultivar IAC 5.MARINGÁ e quatro da cultivar BR 4, desta maneira cada isolado foi pulverizado sobre sua cultivar hospedeira original e sobre a outra

cultivar. Cada vaso recebeu 25 ml do inóculo, com concentração de  $10^5$  conídios por ml de suspensão.

Nas ETAPAS 2 e 3 tinha-se oito isolados, resultantes de quatro isolados da ETAPA 1 inoculados, cada um, sobre as duas cultivares. A origem destes isolados está descrita em 2.1.1.1. e esquematizada na Figura 1. Os isolados obtidos a partir da cultivar IAC 5.MARINGÁ receberam o código MAR adicionado ao seu número original, sendo inoculados nas ETAPAS 2 e 3 sobre esta cultivar. O mesmo ocorreu com os isolados obtidos a partir de BR 4, que receberam o código BR<sub>4</sub> adicionado ao seu número e foram inoculados sobre esta cultivar. Desta maneira, o que era um isolado na ETAPA 1 desdobrou-se em dois isolados nas ETAPAS 2 e 3. A Figura 4 mostra um destes "pares" de isolados, no caso o par oriundo do isolado 49<sub>4</sub> da ETAPA 1: 49<sub>4</sub> - BR<sub>4</sub> e 49<sub>4</sub>-MAR, cada um com sua "caixa" e pulverizador próprios.

Cada um dos oito isolados foi inoculado sobre a cultivar de onde havia sido obtido, conforme seu código. Sendo assim, em cada uma das oito "caixas" foram colocados quatro vasos, com 6 plantas cada, da cultivar IAC 5.MARINGÁ ou BR 4, conforme o código do isolado. Na nona caixa foram colocadas as testemunhas. No total foram utilizados 32 vasos para receberem os inóculos fúngicos, mais 8 para testemunha, sendo 20 vasos com 120 plantas, para cada cultivar. Assim como na ETAPA 1, nas ETAPAS 2 e 3 cada vaso recebeu 25 ml do inóculo, com concentração de  $10^5$  conídios por ml de suspensão.

Esta metodologia de passagens seriadas dos isolados por cultivares hospedeiras foi desenvolvida de modo a submeter isolados coletados em uma ou outra cultivar à quatro testes de patogenicidade diretos (incluindo o primeiro, realizado por MATSUMURA e cols, 1988) e à três testes de patogenicidade cruzados.



Figura 3 - "Caixa" plástica e pulverizador utilizados na inoculação de um isolado (49<sub>4</sub>-MAR).



Figura 4 - "Caixa" e pulverizador pertencentes à cada isolado de um par de isolados (Par: 49<sub>4</sub>, isolados 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> e 49<sub>4</sub>-MAR).

### 2.2.3.3. Determinação dos índices de infecção

Os índices de infecção foram determinados sete dias após a inoculação das plantas, nas ETAPAS 1, 2 e 3. Foi feita a leitura avaliativa das lesões tipicamente causadas por *H. sativum* na terceira folha das plantas, segundo escala proposta por JAMES (1971) modificada por FERNANDES e PICININI (1984). Foram analisadas quatro plantas por vaso e quatro vasos de cada cultivar, tendo-se dezesseis leituras para cada um dos isolados, em cada cultivar. Os resultados, em porcentagem, foram registrados em ficha própria.

Em cada grupo de dezesseis leituras foi calculado a média, que significa o índice de infecção médio de cada isolado em cada cultivar e em cada uma das três etapas, e o desvio padrão de cada uma delas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Características Fúngicas em Meio Artificial

A coloração predominante das colônias fúngicas em meio de cultura sólido BDA e a presença e coloração de setores nestas colônias, bem como a coloração preponderante dos esporos e porcentagem de esporulação em meio de sementes de sorgo, estão nas Tabelas 3 (isolados da ETAPA 1), 4 (isolados da ETAPA 2) e 5 (isolados da ETAPA 3). A Tabela 6 contém as características das colônias oriundas de esporos da ETAPA 3. As Figuras 5 a 14 ilustram os dados contidos nestas tabelas.

As características dos inóculos fúngicos (suspensões de conídios) analisadas microscopicamente em câmara de Neubauer nos 100 ml de suspensão iniciais, antes da diluição para corrigir a concentração de conídios, estão nas Tabelas 7 (isolados da ETAPA 1), 8 (isolados da ETAPA 2) e 9 (isolados da ETAPA 3). Os conídios típicos de *H. sativum* sempre estavam presentes nos inóculos, embora em alguns casos não atingiam a concentração esti-

pulada ( $1 \times 10^5$  conídios/ml) em um volume mínimo de 100 ml (volume de cada inóculo necessário para pulverizar as plantas). Na maioria dos casos a concentração era maior do que  $1 \times 10^5$  conídios / ml, nos 100 ml iniciais dos inóculos; as suspensões eram então diluídas até esta concentração.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS, EM BDA, E DOS ESPOROS, EM SEMENTES DE SORGO, DOS ISOLADOS FÚNGICOS PERTENCENTES A ETAPA 1.

ISOLADOS -ETAPA 1 -	COLÔNIAS (em BDA)		ESPOROS (em sementes de sorgo)	
	Coloração Pre- dominante	Setores: presença e cora- ção	Coloração Pre- dominante	% esporulação
44	Cinza-escuro	Sim, rosa	Preto	100%
74	Cinza-escuro	Sim, rosa	Preto	100%
222	Cinza-escuro	Sim, rosa	Preto	100%
18	Cinza-escuro	Não	Preto	100%
21	Cinza-escuro	Não	Preto	100%
49 <sub>4</sub>	Cinza-escuro	Sim, rosa	Preto	100%

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS, EM BDA, E DOS ESPOROS, EM SEMENTES DE SORGO, DOS ISOLADOS FÚNGICOS PERTENCENTES A ETAPA 2.

ISOLADOS - ETAPA 2 -	COLÔNIAS (em BDA)		ESPOROS (em sementes de sorgo)	
	Coloração Predominante	Setores: pre- sença e colo- ração	Coloração predominante	% esporulação
44 - MAR	Cinza-escuro	não	preto	100%
44 -BR <sub>4</sub>	Cinza-escuro	não	preto	100%
74 -MAR	Cinza-escuro	não	preto	100%
74 -BR <sub>4</sub>	Cinza-escuro	não	preto	100%
18 -MAR	Cinza-escuro	não	preto	100%
18 -BR <sub>4</sub>	Cinza-escuro	não	preto	100%
49 <sub>4</sub> -MAR	Cinza-claro	não	preto	100%
49 <sub>4</sub> -BR <sub>4</sub>	Cinza-claro	Sim, rosa	rosa	70%

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS, EM BDA, E DOS ESPOROS, EM SEMENTES DE SORGO, DOS ISO - LADOS FÚNGICOS PERTENCENTES A ETAPA 3.

ISOLADOS -ETAPA 3-	COLÔNIAS (em BDA)		ESPOROS (em sementes de sorgo)	
	Coloração Pre- dominante	Setores: Presença e colora ção	Coloração Predominante	% esporulação
44 - MAR	Cinza-escuro	Sim, rosa	Preto	50%
44 - BR <sub>4</sub>	Cinza-escuro	Sim, rosa	Preto	50%
74 - MAR	Cinza-claro	Sim, rosa	Rosa	90%
74 - BR <sub>4</sub>	Cinza-claro	Sim, rosa	Rosa	70%
18 - MAR	Cinza-escuro	Sim, rosa	Rosa	60%
18 - BR <sub>4</sub>	Cinza-escuro	Sim, rosa	Rosa	50%
49 <sub>4</sub> - MAR	Cinza-claro	Sim, rosa	Rosa	60%

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS, EM BDA, ORIUNDAS DE ESPOROS DA ETAPA 3.

ISOLADOS -E3-esp-*	COLÔNIAS (em BDA)	
	Coloração predominante	Setores: presença e coloração
44 - MAR	Cinza-escuro	Sim, rosa
44 - BR <sub>4</sub>	Cinza-escuro	Sim, rosa
74 - MAR	Rosa	Não
74 - BR <sub>4</sub>	Rosa	Não
18 - MAR	Rosa	Sim, cinza
18 - BR <sub>4</sub>	Rosa	Sim, cinza
49 <sub>4</sub> - MAR	Rosa	Sim, cinza

\* colônias obtidas de esporos (esp.) da ETAPA 3.

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DOS INÓCULOS (SUSPENSÕES DE CONÍDIOS)  
DA ETAPA 1, OBSERVADAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

ISOLADOS -ETAPA 1-	INÓCULO (para 100 ml de suspensão)		
	Concentração maior/menor do que $1 \times 10^5$ conídios*/ml	hifas	Outro tipo de esporo**
44	maior	não	não
74	maior	não	não
222	maior	não	não
18	maior	não	não
21	maior	não	não
49 <sub>4</sub>	maior	não	não

\* conídios típicos de *H.sativum*

\*\* esporos que não o típico de *H.sativum*

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS DOS INÓCULOS (SUSPENSÕES DE CONÍDIOS) DA ETAPA 2, OBSERVADAS EM CÂMARA DE NEUBAUER.

ISOLADOS -ETAPA 2 -	INÓCULO (para 100 ml de suspensão)		
	Concentração maior/menor do que $1 \times 10^5$ <u>co</u> nídios*/ml	hifas	outro tipo de esporo **
44 - MAR	maior	não	não
44 - BR <sub>4</sub>	maior	não	não
74 - MAR	maior	não	não
74 - BR <sub>4</sub>	maior	não	não
18 - MAR	maior	não	não
18 - BR <sub>4</sub>	maior	não	não
49 <sub>4</sub> - MAR	maior	não	não
49 <sub>4</sub> - BR <sub>4</sub>	menor	sim	sim

\* conídios típicos de *H.sativum*

\*\* esporos que não o típico de *H.sativum*

TABELA 9. CARACTERÍSTICAS DOS INÓCULOS (SUSPENSÕES DE CONÍDIOS) DA ETAPA 3, OBSERVADAS EM CÂMARA DE NEUBAUER.

ISOLADOS -ETAPA 3 -	INÓCULO (para 100 ml de suspensão)		
	Concentração maior/menor do que $1 \times 10^5$ conídios*/ml	hifas	outro tipo de esporo **
44 - MAR	menor	não	não
44 - BR <sub>4</sub>	menor	não	não
74 - MAR	menor	sim	sim
74 - BR <sub>4</sub>	menor	sim	sim
18 - MAR	menor	sim	sim
18 - BR <sub>4</sub>	menor	sim	sim
49 <sub>4</sub> - MAR	menor	sim	sim

\* conídios típicos de *H.sativum*

\*\* esporos que não o típico de *H.sativum*

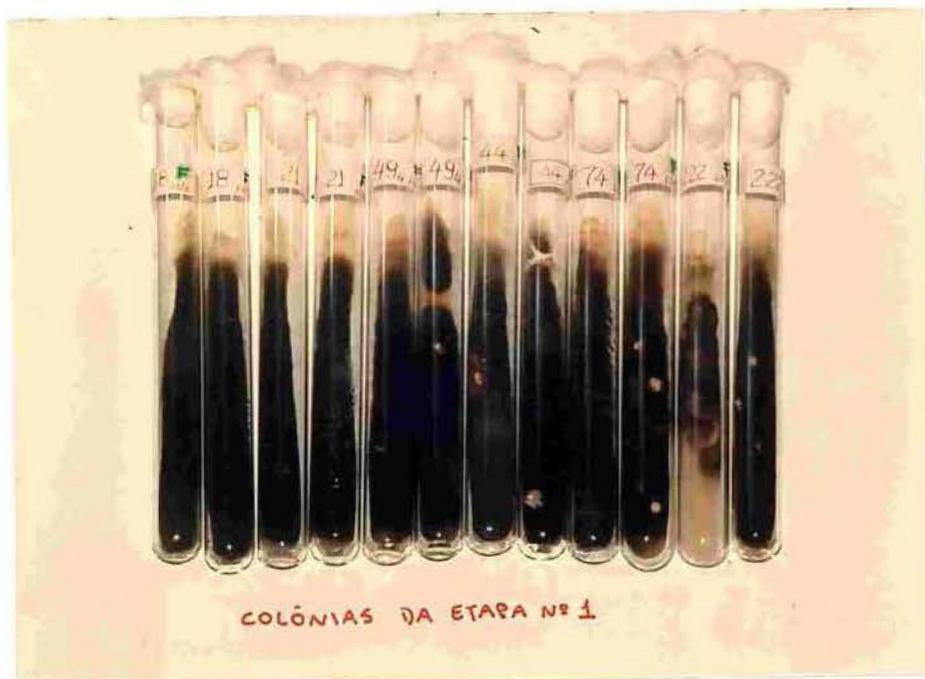


Figura 5. Colônias dos isolados pertencentes a ETAPA 1. Observar os setores de coloração rosa.



Fig.6. Colônias dos isolados pertencentes a ETAPA 2. Observar a coloração mais clara das colônias do par 49<sub>4</sub> - (49<sub>4</sub>-MAR e 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>) e a presença de setores apenas em 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>.



Figura 7 - Esporos de isolados pertencentes a ETAPA 2. Observar a coloração dos esporos de 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> em comparação com a coloração preta dos demais isolados.



Figura 8. Colônias dos isolados pertencentes a ETAPA 3. Observar a presença abundante de setores com coloração mais clara do que a colocação predominante das colônias.



Figura 9.



Figura 10

Figuras 9 e 10 - Esporos de isolados pertencentes a ETAPA 3. Observar a coloração preta apenas nos esporos do par 44 (44.MAR e 44.BR<sub>4</sub>) em comparação com a coloração rosa nos demais isolados.

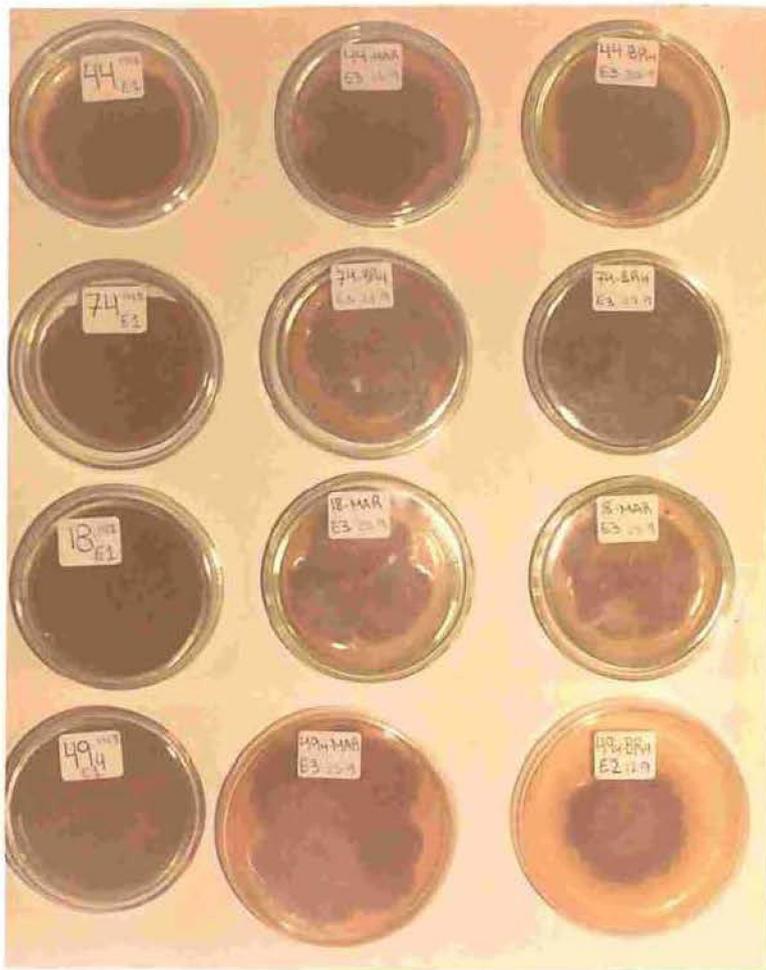


Figura 11. Aspecto de colônias de *H. sativum* em placas de Petri contendo BDA sólido.



Figura 12. Esporos de isolados pertencentes a ETAPA 3 e colônias obtidas a partir destes esporos. Observar a coloração escura da colônia 44-MAR, a coloração rosa com setores escuros da colônia 18-MAR e a coloração totalmente rosa da colônia 74-MAR.

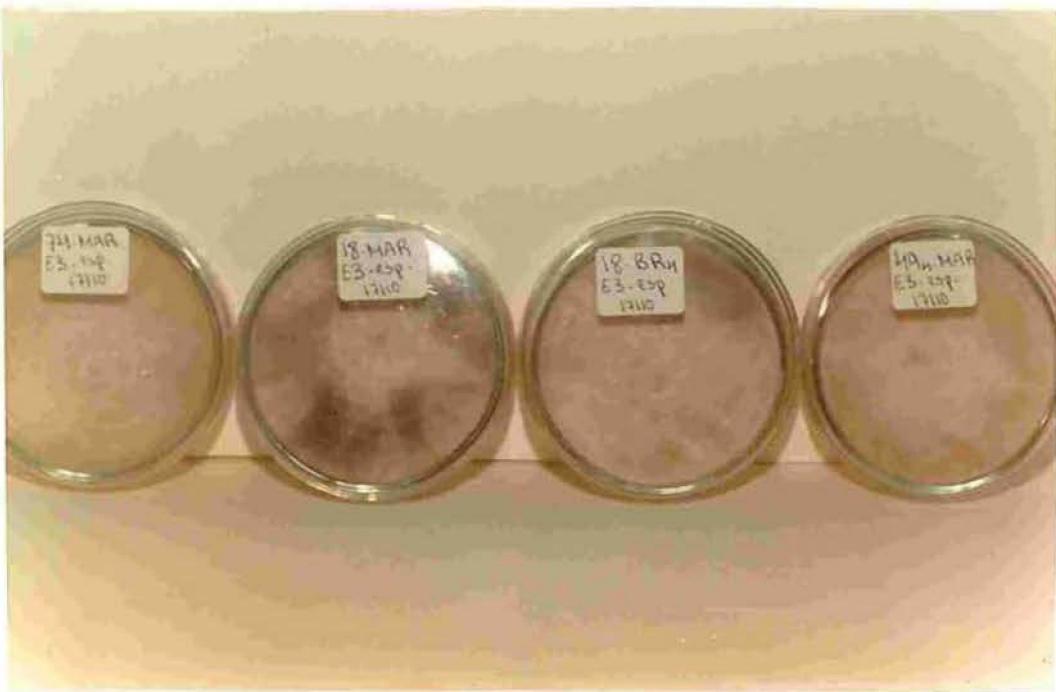


Figura 13. Colônias oriundas de esporos da ETAPA 3. Observar a coloração rosa e os setores mais escuros.



Figura 14. Detalhe de uma colônia de coloração escura com um setor de coloração rosa bem definido.

TABELA 10 - ÍNDICES DE INFECÇÃO DOS ISOLADOS EM IAC 5.MARINGÁ E BR4, RESULTANTES DA PRIMEIRA INOCULAÇÃO CRUZADA E DIRETA (ETAPA 1)

ISOLADOS -ETAPA 1-	ÍNDICES DE INFECÇÃO MÊDIOS* (%)		DIFERENÇAS
	IAC 5.MARINGÁ	BR 4	
44	35,00 <sup>±</sup> 5,48	26,25 <sup>±</sup> 3,87	8,75
74	32,19 <sup>±</sup> 5,15	22,50 <sup>±</sup> 4,08	9,69
222	12,50 <sup>±</sup> 3,65	9,69 <sup>±</sup> 2,87	2,81
18	23,12 <sup>±</sup> 3,59	29,69 <sup>±</sup> 4,64	6,57
21	29,37 <sup>±</sup> 6,80	30,94 <sup>±</sup> 5,54	1,57
49 <sub>4</sub>	12,81 <sup>±</sup> 3,14	30,00 <sup>±</sup> 5,16	17,19

\* Média e desvio padrão de 16 leituras, cada leitura feita na terceira folha de uma planta.

TABELA 11 - ÍNDICES DE INFECCÃO DOS ISOLADOS EM IAC 5.MARINGÁ E BR 4, RESULTANTES DA SEGUNDA INOCULAÇÃO CRUZADA E DIRETA (ETA - PA 2)

ISOLADOS -ETAPA 2 -	ÍNDICES DE INFECCÃO MÉDIOS* (%)		DIFERENÇAS
	IAC 5.MARINGÁ	BR 4	
44 - MAR	45,62 $\pm$ 6,29	-	3,75
44 - BR <sub>4</sub>	-	41,87 $\pm$ 9,10	
74 - MAR	42,50 $\pm$ 6,83	-	10,63
74 - BR <sub>4</sub>	-	31,87 $\pm$ 7,50	
18 - MAR	40,62 $\pm$ 7,71	-	2,50
18 - BR <sub>4</sub>	-	43,12 $\pm$ 10,14	
49 <sub>4</sub> -MAR	28,75 $\pm$ 6,19	-	20,94
49 <sub>4</sub> -BR <sub>4</sub>	-	7,81 $\pm$ 2,56	

\* Média e desvio padrão de 16 leituras, cada leitura feita na terceira folha de uma planta

TABELA 12 - ÍNDICES DE INFECÇÃO DOS ISOLADOS EM IAC 5.MARINGÁ E BR 4, RESULTANTES DA TERCEIRA INOCULAÇÃO CRUZADA E DIRETA (ETAPA 3)

ISOLADOS -ETAPA 3 -	ÍNDICES DE INFECÇÃO MÊDIOS*(%)		DIFERENÇAS
	IAC 5. MARINGÁ	BR 4	
44 - MAR	11,56 $\pm$ 5,39	-	1,87
44 - BR <sub>4</sub>	-	9,69 $\pm$ 3,86	
74 - MAR	2,94 $\pm$ 1,44	-	2,57
74 - BR <sub>4</sub>	-	0,37 $\pm$ 0,50	
18 - MAR	2,56 $\pm$ 1,21	-	0,56
18 - BR <sub>4</sub>	-	3,12 $\pm$ 1,50	
49 <sub>4</sub> -MAR	5,94 $\pm$ 2,01	-	-

\* Média e desvio padrão de 16 leituras, cada leitura feita na terceira folha de uma planta.

### 3.3. Análises Eletroforéticas

Os padrões eletroforéticos para alfa e beta-esterases de colônias e esporos, obtidos em cada etapa deste estudo, estão representados nos zimogramas das Figuras 15 a 21. O zimograma de cada gel contém as bandas correspondentes a cada um dos isolados, suas intensidades (forte, média, fraca ou fraquíssima) e suas mobilidades relativas (RM). Junto ao RM de cada banda, no eixo das ordenadas, está indicado  $\alpha$  ou  $\beta$ , dependendo se a banda corresponde a atividade de alfa-esterase ou de beta-esterase. A coloração das bandas no gel permite distinguir entre alfa (esverdeada) ou beta (rosada) esterases.

Todas as repetições dos isolados (nove repetições em colônias e seis em esporos) apresentaram sempre o mesmo padrão de bandas, com igual intensidade e RM. As mobilidades relativas das bandas foram calculadas tomando-se como referência a linha de frente, conforme explicado em 2.2.2.6.

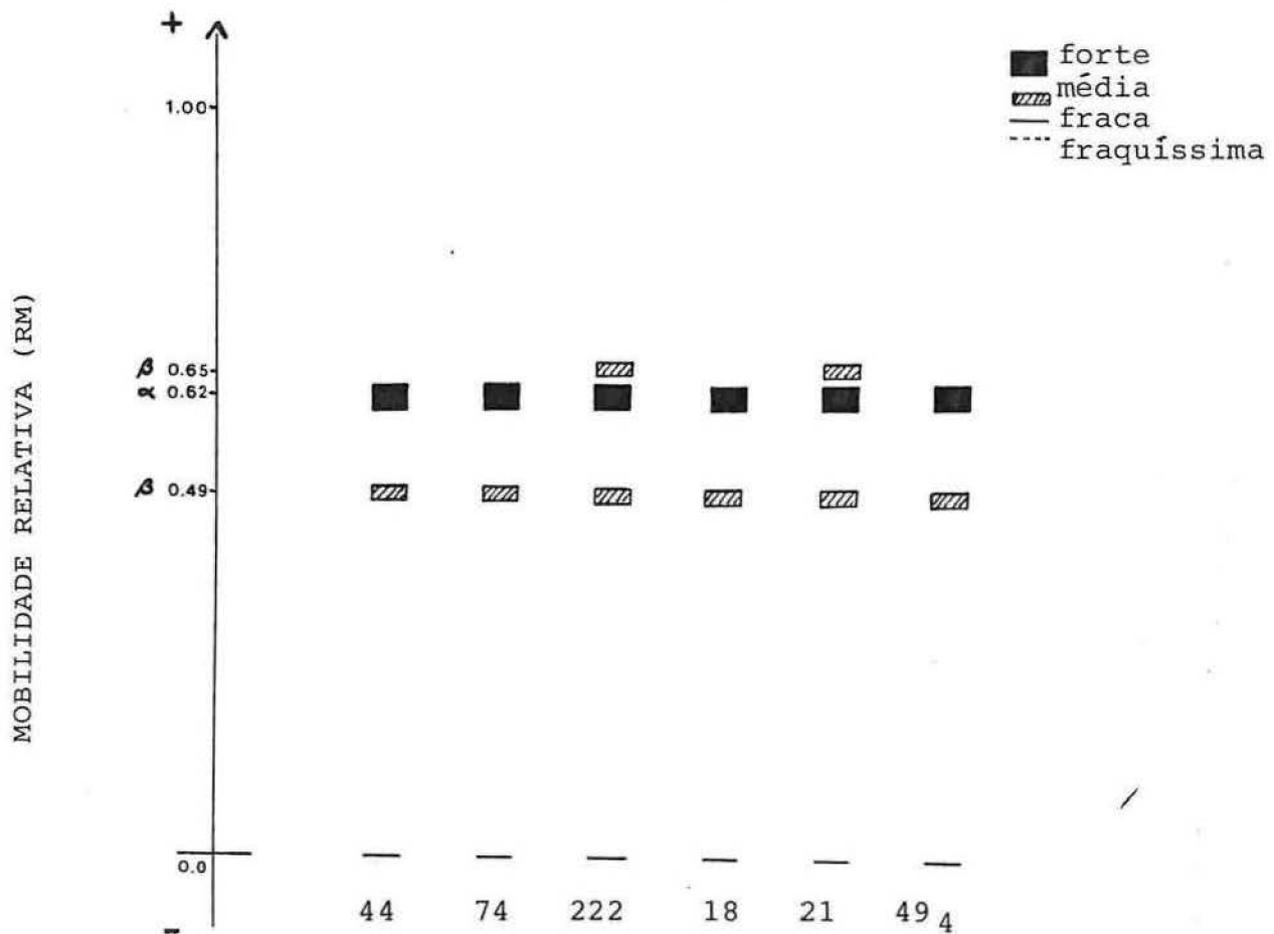
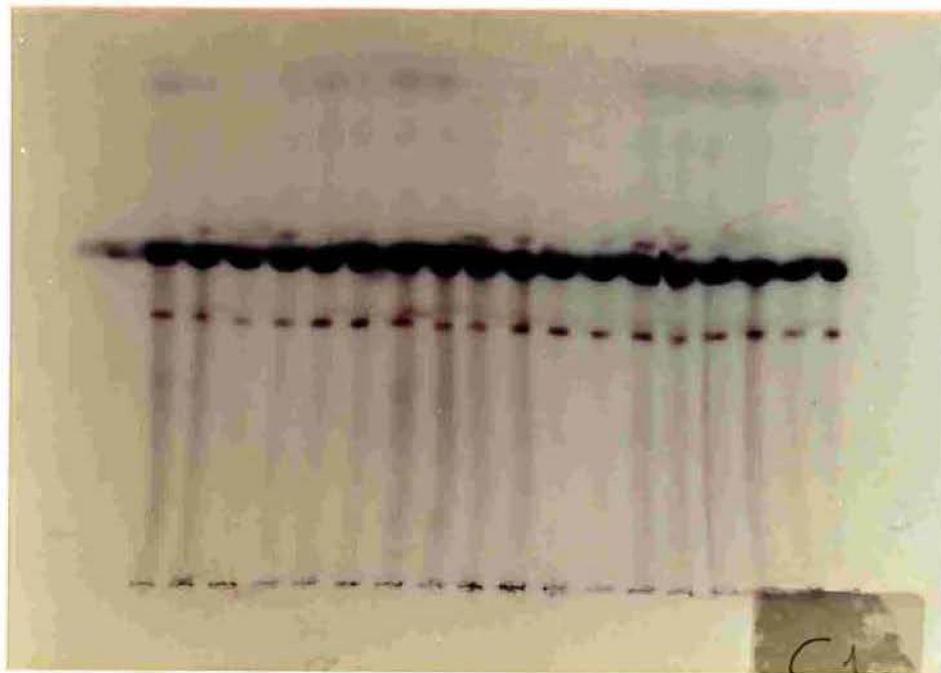


Figura 15 - Diagrama dos padrões eletroforéticos para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de colônias dos isolados pertencentes à ETAPA 1.



6 5 4 3 2 1 6 6 5 5 4 4 3 3 2 2 1 1

Figura 16 - Zimograma para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de colônias dos isolados pertencentes à ETAPA 1. Aplicações nº 1=isolado 44; 2=74; 3=222; 4=18; 5=21 e 6=49<sub>4</sub>. A ordem das aplicações ficou invertida porque a foto foi batida, acidentalmente, com o gel virado.

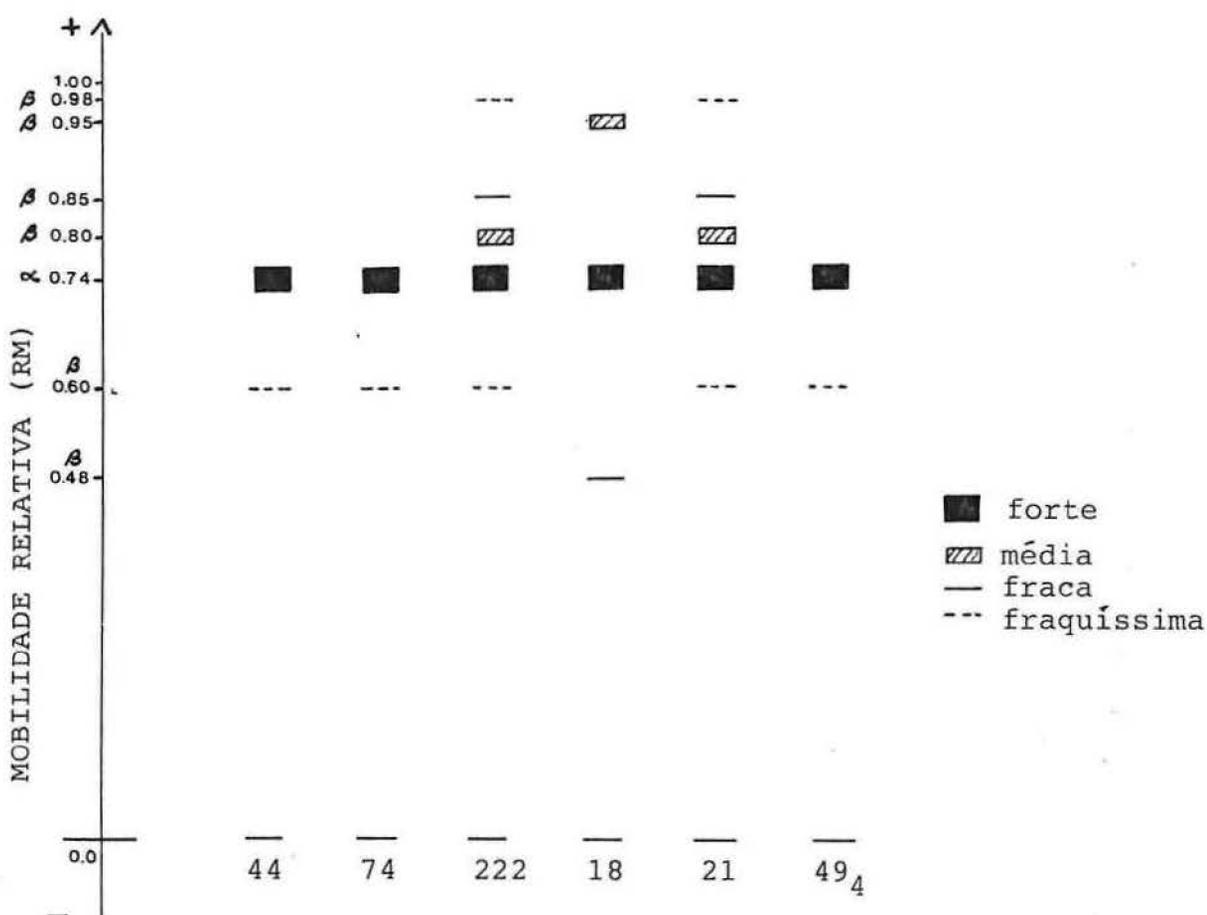


Figura 17 - Diagrama dos padrões eletroforéticos para  $\alpha$  e  $\beta$  -esterases de esporos dos isolados pertencentes à ETAPA 1.

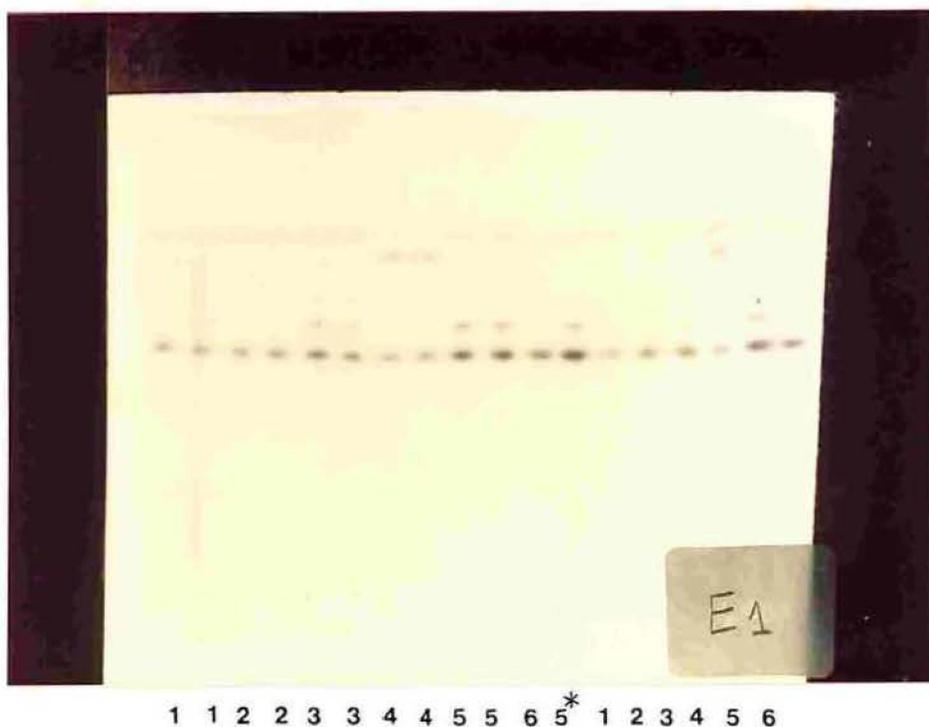


Figura 18 - Zimograma para  $\alpha$  e  $\beta$  -esterases de esporos dos isolados pertencentes à ETAPA 1. Aplicações nº1=isolado 44; 2=74; 3=222; 4=18; 5=21 e 6=49<sub>4</sub>.

\* erro na aplicação , deveria ter sido aplicada a segunda repetição do nº 6.

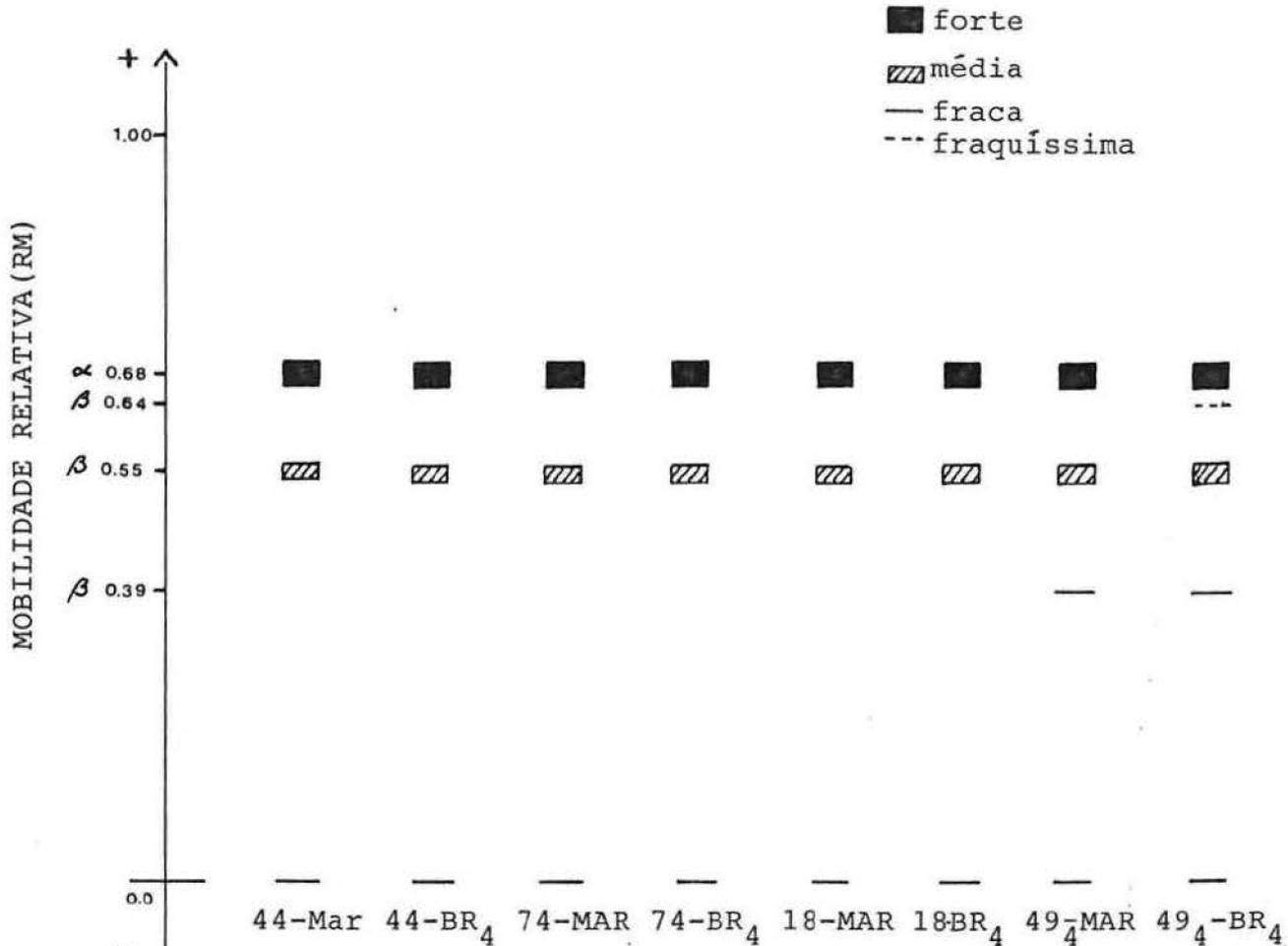


Figura 19 - Diagrama dos padrões eletroforéticos para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de colônias dos isolados pertencentes à ETAPA 2.

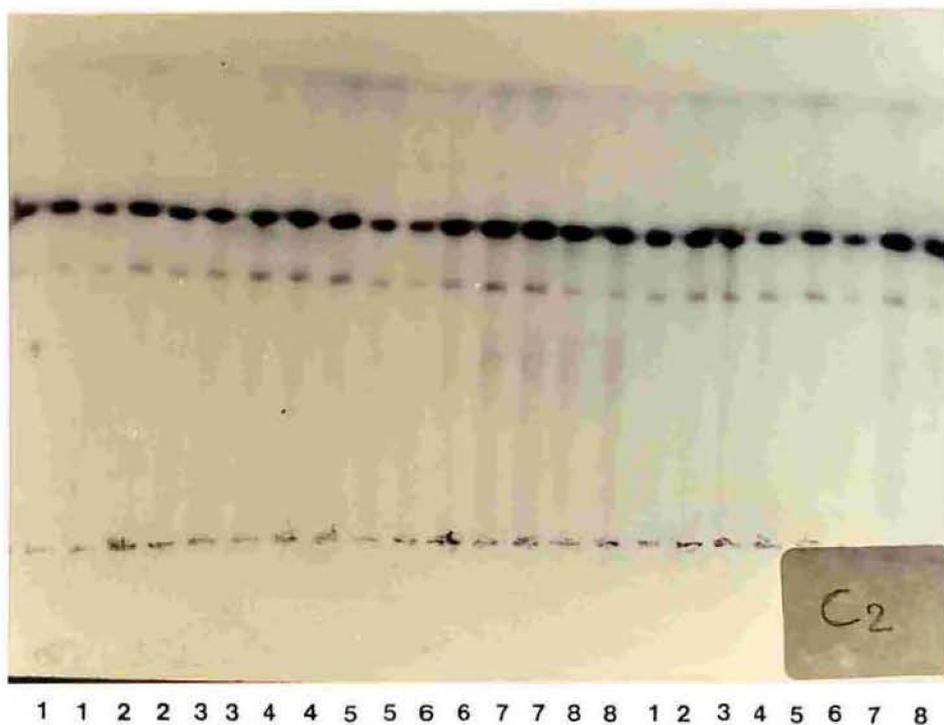


Figura 20 - Zimograma para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de colônias dos isolados pertencentes à ETAPA 2. Aplicações nº 1=isolado 44-MAR; 2=44-BR<sub>4</sub>; 3=74-MAR; 4=74-BR<sub>4</sub>; 5=18-MAR; 6=18-BR<sub>4</sub>; 7=49<sub>4</sub>-MAR e 8=49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>

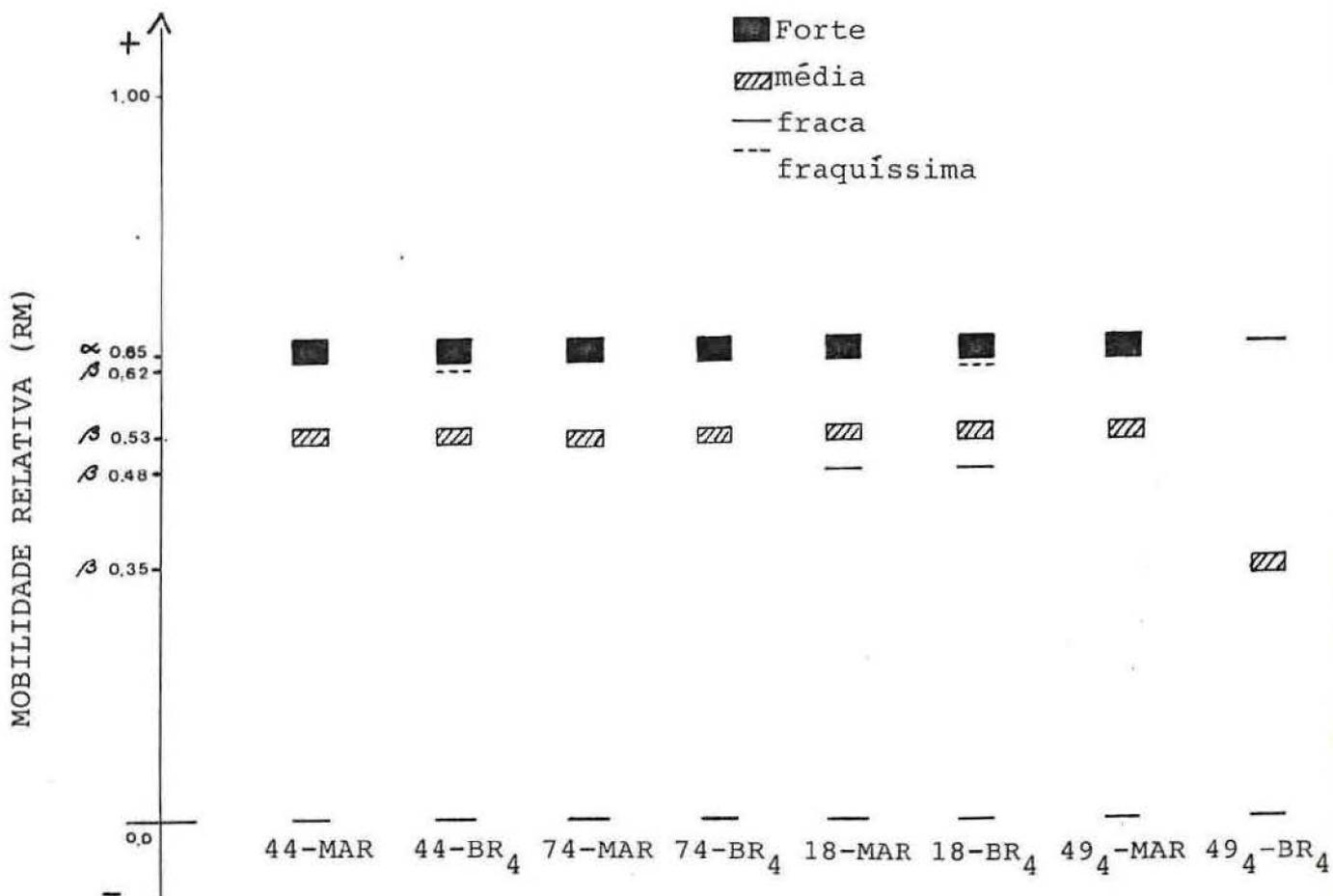
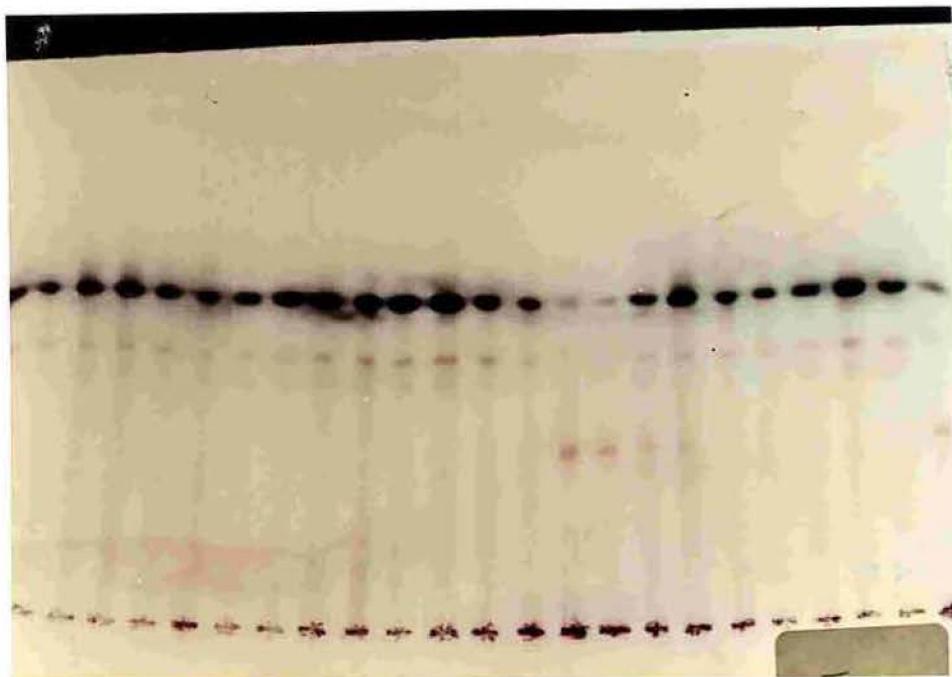


Figura 21. Diagrama dos padrões eletroforéticos para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de esporos dos isolados pertencentes à ETAPA 2.



1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 1 2 3 4 5 6 7 8

Figura 22 - Zimograma para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de esporos dos isolados pertencentes à ETAPA 2. Aplicações nº1=isolado 44-MAR; 2=44-BR<sub>4</sub>; 3=74-MAR; 4=74-BR<sub>4</sub>; 5=18-MAR; 6=18-BR<sub>4</sub>; 7=49<sub>4</sub>-MAR e 8=49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>.

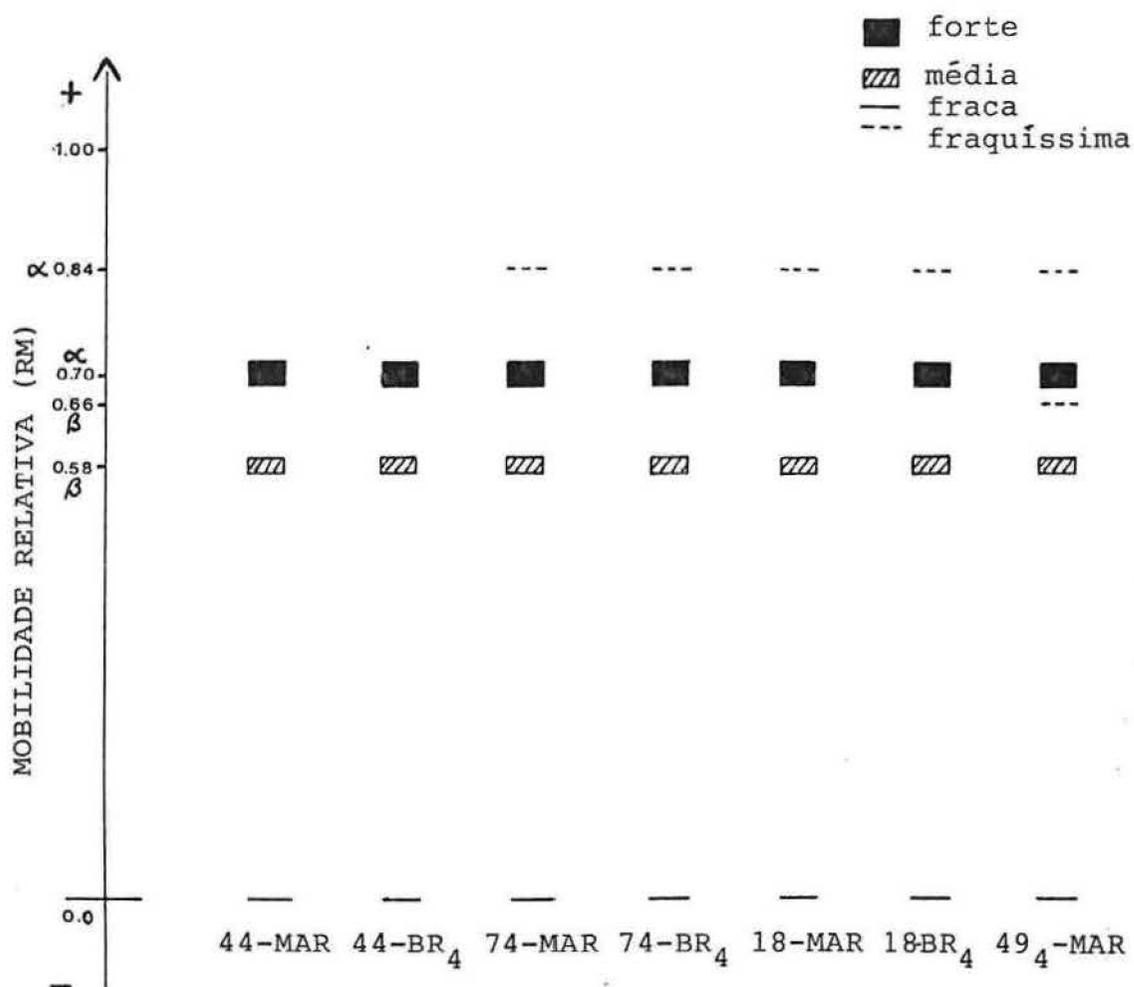


Figura 23 - Diagrama dos padrões eletroforéticos para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de colônias dos isolados pertencentes à ETAPA 3.

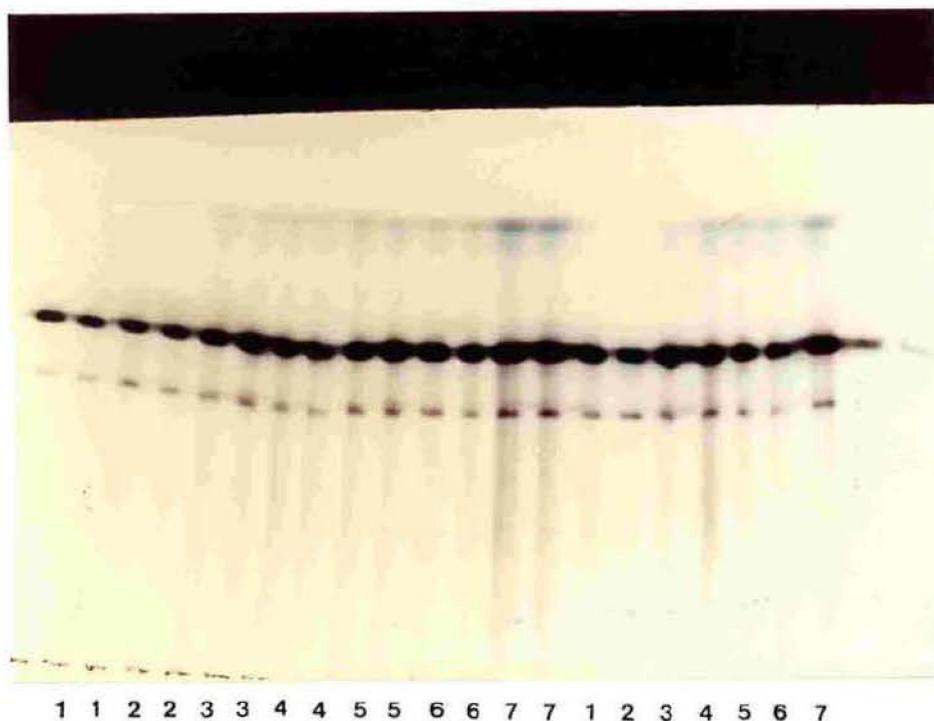


Figura 24 - Zimograma para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de colônias dos isolados pertencentes à ETAPA 3. Aplicações nº 1=isolado 44-MAR; 2=44-BR<sub>4</sub>; 3=74-MAR; 4=74-BR<sub>4</sub>; 5= 18-MAR; 6=18-BR<sub>4</sub> e 7= 49<sub>4</sub>-MAR

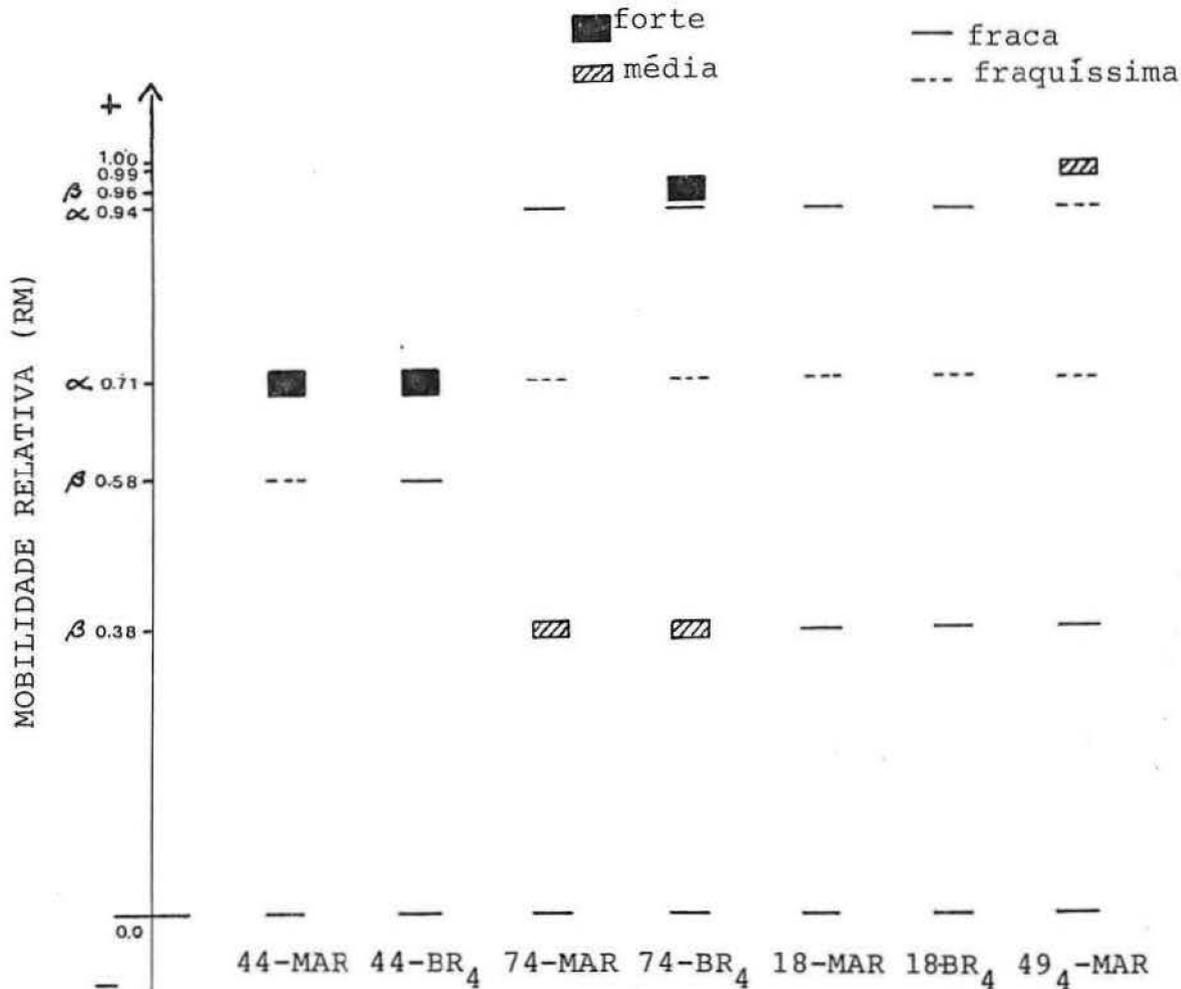
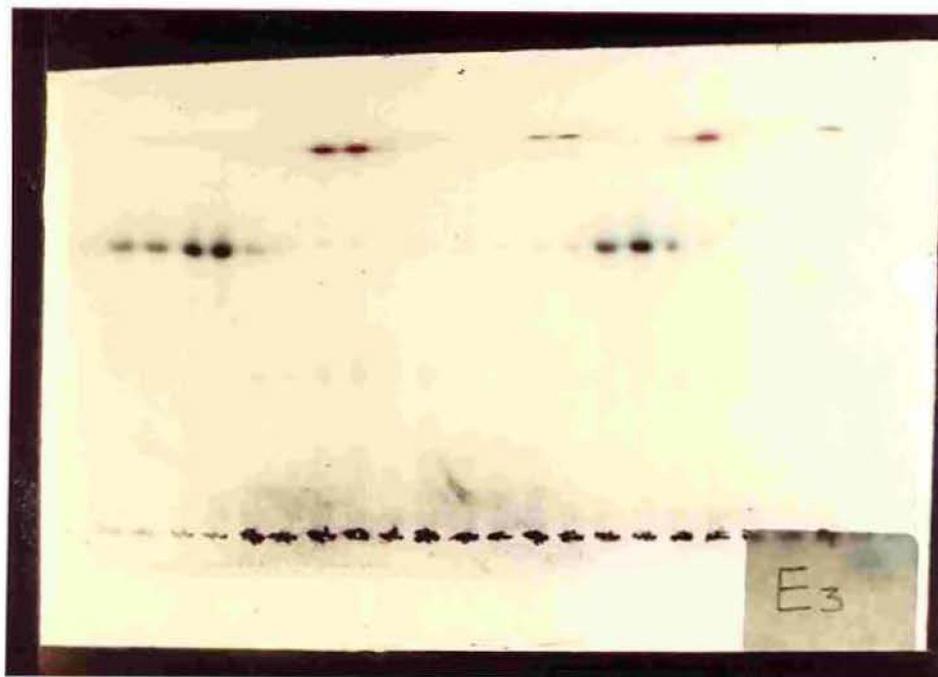


Figura 25 - Diagrama dos padrões eletroforéticos para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de esporos dos isolados pertencentes à ETAPA 3.



1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 1 2 3 4 5 6 7

Figura 26 - Zimograma para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de esporos dos isolados pertencentes à ETAPA 3. Aplicação nº1 = isolado 44-MAR; 2= 44-BR<sub>4</sub>; 3= 74-MAR; 4=74-BR<sub>4</sub>; 5=18-MAR; 6=18-BR<sub>4</sub> e 7= 49<sub>4</sub>-MAR

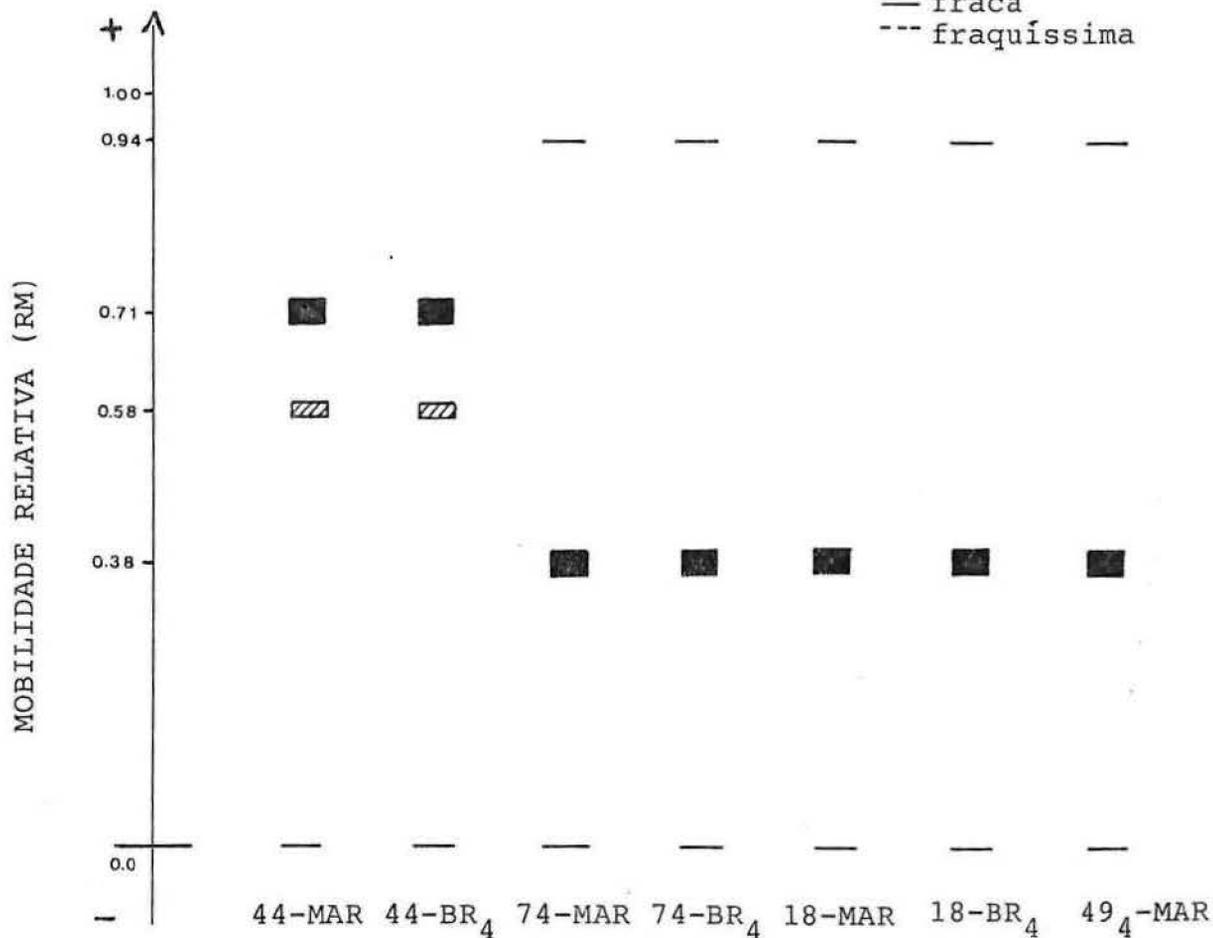


Figura 27 - Diagrama dos padrões eletroforéticos para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de colônias derivadas de esporos dos isolados pertencentes à ETAPA 3.

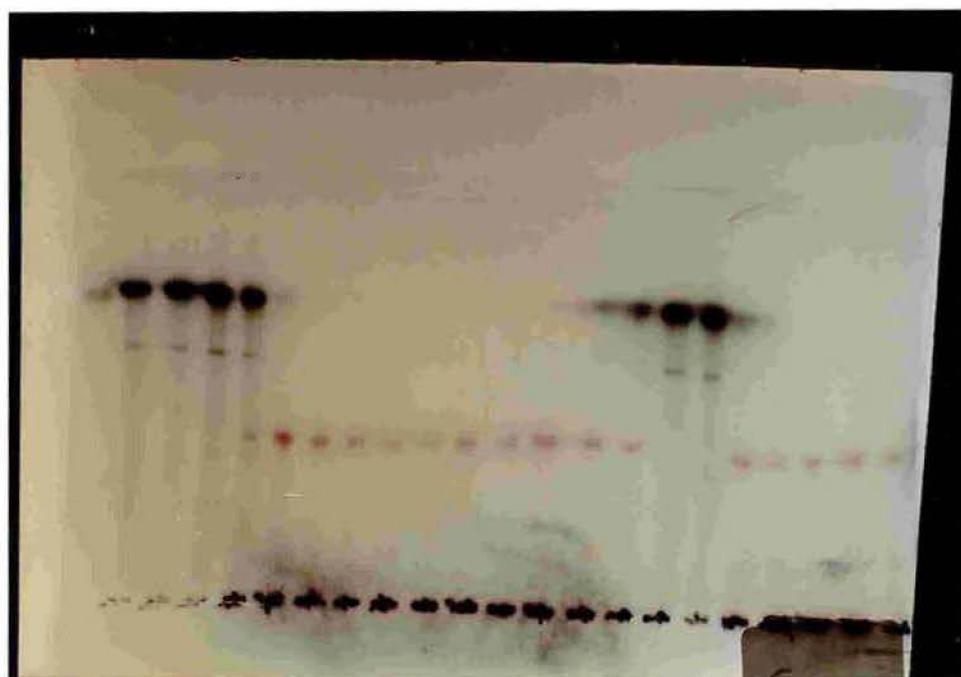


Figura 28 - Zimograma para  $\alpha$  e  $\beta$ -esterases de colônias derivadas de esporos dos isolados pertencentes à ETAPA 3. Aplicações nº 1= isolado 44-MAR; 2=44-BR<sub>4</sub>; 3=74-MAR; 4=74-BR<sub>4</sub>; 5=18-MAR; 6=18-BR<sub>4</sub> e 7=49<sub>4</sub>-MAR

#### 4 - DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho com relação a coloração das colônias de *H.sativum* em BDA e dos esporos em sementes de sorgo, contidos nas Tabelas 3,4 e 5, mostram que ocorreram variações no decorrer das três etapas e que há maior estabilidade nas colônias do que nos esporos, com relação a esta característica. Na ETAPA 1 todas as colônias apresentavam cor cinza-escuro, o par 44 (44-MAR e 44-BR<sub>4</sub>) e o par 18 (18-MAR e 18-BR<sub>4</sub>) mantiveram esta coloração nas duas etapas seguintes, o par 74 (74-MAR e 74-BR<sub>4</sub>) manteve na ETAPA 2 mas passou para cinza claro na ETAPA 3 e o par 49<sub>4</sub> (49<sub>4</sub>-MAR e 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>) modificou para cinza-claro já na ETAPA 2, permanecendo desta maneira na ETAPA 3. Os setores presentes nestas colônias eram sempre de cor rosa, ocorrendo na ETAPA 1 em quatro dos seis isolados (44,74,222 e 49<sub>4</sub>). Na ETAPA 2 somente o isolado 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> apresentava setores e na ETAPA 3 todos os apresentavam.

No meio de sementes de sorgo, a variação entre os isolados no decorrer das três etapas foi maior. Na ETAPA 1, os esporos de todos os isolados eram pretos, com 100% de esporulação, permanecendo desta maneira na ETAPA 2, com exceção do isolado 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>,

cujos esporos tinham cor rosa e a esporulação era inferior a 100%. Este fenômeno se repetiu na ETAPA 3, nos isolados dos pares 74 e 18, e também no outro isolado do par 49<sub>4</sub> (49<sub>4</sub>-MAR). O único par que manteve os esporos de cor preta nas três etapas foi o 44, apesar da esporulação ter caído 50% na ETAPA 3.

É interessante observar que o único isolado que apresentou setores na ETAPA 2, o 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>, foi também o único nesta etapa com esporos de cor rosa. Como os esporos são obtidos a partir de colônias, os setores de cor rosa provavelmente originam esporos da mesma cor, devendo, portanto, estar presentes nas colônias a partir das quais se desenvolveram os esporos rosa em sementes de sorgo. Isto pode ser confirmado na ETAPA 3, onde todos os isolados contendo esporos rosa, em meio de sementes de sorgo, apresentavam colônias com setores, em BDA.

Os esporos dos isolados pertencentes a ETAPA 3 originaram colônias em BDA, cujas características estão na Tabela 6. Pode-se observar que a coloração das colônias era rosa naquelas derivadas de esporos rosa e cinza-escuro no par 44, o único que permaneceu com esporos pretos na ETAPA 3. As colônias deste par continham setores de cor rosa, como aqueles das colônias da ETAPA 1, 2 e 3, as do par 74 eram totalmente rosa, sem setores, e as do par 18 e do 49<sub>4</sub>-MAR eram rosa com setores cinza. Neste último caso ocorreu uma inversão entre coloração predominante da colônia e cor dos setores, com relação às colônias da ETAPA 3, que eram cinzas com setores rosa.

Estes resultados indicam que existem duas formas fúngicas ocorrendo juntas, sendo uma selvagem, de coloração cinza nas colônias em BDA e preta nos esporos em sementes de sorgo, e outra de coloração rosa tanto em colônias, onde aparece na forma de setores nas ETAPAS 1,2 e 3, quanto em esporos, predominando nas colônias derivadas destes esporos. Isto sugere que os esporos de cor rosa derivam de setores da mesma cor e são capazes de originar colônias também de coloração rosa.

A predominância de uma forma sobre a outra parece estar relacionada ao meio de cultura. As colônias são obtidas a partir de folhas infectadas do hospedeiro e crescem em BDA, que é um meio de cultura rico e bastante favorável ao desenvolvimento da forma selvagem, que predomina sobre a forma rosa, a qual é visível apenas nos setores. O meio de sementes de sorgo já é bem mais pobre, tanto que é indicado para obtenção de esporos livres de micélio, sendo; portanto, estressante à forma selvagem. Na primeira passagem por este meio, a forma selvagem predominou em todos os isolados, na segunda passagem em um isolado já predominou a forma rosa e na terceira passagem esta foi predominante em cinco dos sete isolados. Apenas em um dos quatro pares de isolados a forma selvagem predominou em sementes de sorgo na última passagem por este meio (par 44) mas a esporulação foi de apenas 50%. Pode-se concluir que o meio de sementes de sorgo exerce pressão seletiva sobre a forma selvagem, o que leva à redução da esporulação desta forma após passagens sucessivas por este meio, possibilitando o desenvolvimento e predominância da forma rosa, que parece ser melhor a

daptada do que a selvagem a estas condições.

A redução da esporulação observada quando há predominância da forma rosa, pode ser confirmada pela concentração de conídios típicos de *H.sativum* em 100 ml de inóculo, que era menor do que  $1 \times 10^5$  conídios por ml quando era a forma rosa que predominava e maior quando era a forma selvagem, conforme mostram as Tabelas 7,8 e 9. Uma única exceção é o par 44 da ETAPA 3, que permaneceu selvagem mas cuja esporulação não atingiu a concentração estipulada para o inóculo. A forma selvagem destes isolados (44-MAR e 44BR<sub>4</sub>) parece ser melhor adaptada e mais estável do que os demais isolados, pois apesar de reduzir sua esporulação em sementes de sorgo continuou predominante. Pode-se observar, ainda, que nos inóculos da forma selvagem tinha-se apenas os conídios típicos de *H.sativum* enquanto que, naqueles onde a forma rosa predominou, apareceram hifas e um outro tipo de esporo, de tamanho menor e em maior concentração do que o conídio típico de *H.sativum*, cuja concentração nestes inóculos é baixa.

É importante destacar, também, que os isolados que mais esporularam na ETAPA 3, os do par 74, foram os únicos nos quais os esporos deram origem a colônias totalmente rosas, sem os setores cinzas que apareceram nas colônias derivadas de esporos dos outros isolados. Isto sugere que a forma rosa destes isolados (74-MAR e 74-BR<sub>4</sub>) foi a que melhor se adaptou em sementes de sorgo, atingindo níveis elevados de esporulação e impedindo o desenvolvimento da forma selvagem, o que pode ser verificado pela ausência de setores da selvagem nas colônias da forma rosa

destes isolados.

Estas formas de coloração clara, aparecendo como setores em colônias de *H.sativum* em BDA, foram documentadas inicialmente por CHRISTENSEN (1925), que as considerou como formas 'mutantes'. O autor observou que quando estas formas eram transferidas dos setores para meio de cultura, desenvolviam colônias diferentes da colônia parental e que os esporos dos mutantes produziam novas colônias mutantes. Como mutantes com baixa produção de conídios e cor clara ocorriam frequentemente, sugeriu que a mutação estaria envolvida com a perda de fatores como cor e esporulação. Assim como no presente trabalho, o autor constatou que meios mais pobres apresentavam maior número de mutantes e que alguns isolados apresentavam formas mutantes com mais frequência que outros. TINLINE (1960) observou que alguns mutantes de cor clara não esporulavam, eram muito pouco patogênicos e sexualmente inférteis, não cruzando com cepas selvagens. Com base nestes dados pode-se questionar o fato destas formas tão extremas pertencerem à mesma espécie, já que a identificação da espécie era feita apenas sobre características morfológicas. TINLINE (1962) atribuiu o aparecimento de setores em culturas de laboratório à síntese ou dissociação de heterocárions que iniciavam por mutação em um dos núcleos de um conídio.

O meio de sementes de sorgo para esporulações foi utilizado por MEHTA (1981) , que observou que as características '

de muitos isolados eram alteradas quando os mesmos eram mantidos por períodos longos neste meio. Os isolados reduziam sua esporulação, o que também foi observado no presente trabalho e, após algum tempo, alteravam ou perdiam sua patogenicidade. Sendo assim, este meio não deve ser utilizado quando se deseja manter as características originais dos isolados em estudo. A redução da capacidade patogênica dos isolados decorrente da esporulação destes em sementes de sorgo, também foi observada neste trabalho e será discutida a seguir.

Os índices de infecção dos isolados, obtidos nos testes de patogenicidade diretos e cruzados e apresentados nas tabelas 10, 11 e 12, mostram um aumento na virulência dos isolados, em ambas as cultivares, da ETAPA 1 para a ETAPA 2. Na ETAPA 3, bem como no isolado 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> da ETAPA 2, há uma redução drástica na patogenicidade, o que pode ser explicado pela redução da esporulação e conseqüente baixa concentração de conídios típicos de *H. sativum* nos inóculos. CASTRO (1976) destaca a importância da concentração do inóculo nos testes de patogenicidade, observando que a doença na planta é proporcional a esta concentração. Os esporos de cor rosa não são patogênicos às cultivares IAC 5. MARINGÁ e BR 4, os baixos índices de infecção observados nos isolados 74-MAR, 74-BR<sub>4</sub>, 18-MAR, 18-BR<sub>4</sub> e 49<sub>4</sub>-MAR da ETAPA 3 e no isolado 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> da ETAPA 2, nos quais predominam estes esporos em sementes de sorgo, são devidos aos isolados da forma selvagem de *H. sativum* presentes em baixa concentração nos inóculos. Os esporos de coloração clara foram considerados muito pouco patogênicos, em sua maioria, por TINLINE (1960).

Segundo CHRISTENSEN e DEVAY (1955), os meios de cultura, bem como certos hospedeiros, podem selecionar biótipos que já estavam presentes no inóculo original ou que surgiram por mutação. Pode-se admitir que os isolados coletados na natureza, e analisados no presente trabalho, são compostos, cada um, por mais de uma forma fisiológica e que as proporções entre estas formas variam em resposta à seleção imposta pelas cultivares hospedeiras e pelos meios de cultura, principalmente sementes de sorgo. Este meio atuaria selecionando uma forma que melhor se adapta a ele mas que não é patogênico às cultivares testadas, ocorrendo uma reversão à forma selvagem quando o isolado passa pelo hospedeiro. Os autores citados acima comprovaram que ocorre seleção no hospedeiro, utilizando como inóculo uma mistura de duas culturas de *H. sativum*, sendo uma escura e virulenta e outra clara e muito pouco patogênica. Observaram que a raça albina era eliminada em poucas passagens pelo hospedeiro, mesmo quando em maior proporção no inóculo, e que quanto maior a proporção da raça escura mais severa era a infecção.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam um aumento na virulência dos isolados na ETAPA 2 quando comparada com a ETAPA 1. Esta comparação não pode ser feita com os isolados da ETAPA 3, ou com o isolado 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> da ETAPA 2, porque os inóculos destes isolados não atingiram a concentração de  $1 \times 10^5$  conídios por ml de suspensão. Este aumento na virulência pode ser explicado pela seleção, nos hospedeiros, de formas do

patógeno mais virulentas e; portanto, mais aptas à sobreviver e se desenvolver nas cultivares. Segundo BURDON (1987), as plantas hospedeiras exercem forte pressão seletiva sobre as populações de seus patógenos, sendo que inicialmente são fixadas as raças mais virulentas e, no decorrer das gerações do patógeno, o custo adaptativo associado à virulência deve ser mais alto ou mais baixo, de modo a manter o polimorfismo na população e impedir a dominância de uma raça extremamente virulenta. Como neste trabalho foram feitas apenas três inoculações, sendo duas com a forma selvagem e a concentração do inóculo alta, é de se esperar um aumento na virulência da forma selvagem, na ETAPA 2, já que os indivíduos com genótipos mais virulentos são os primeiros a se fixarem.

O aumento na patogenicidade de *H.sativum* decorrente de passagens seriadas por hospedeiros foi observado também por CASTRO (1976), que passou um isolado quatro vezes sucessivas por trigo, aveia e cevada. O isolado foi mantido em solo estéril, sendo este um meio adequado porque aparentemente não atua seletivamente, possibilitando, assim, a manutenção das características originais do inóculo. Já MEHTA (1981), manteve os isolados em sementes de sorgo, assim como no presente trabalho, observando alterações e até perda da capacidade patogênica dos isolados devido às modificações sofridas por estes em sementes de sorgo. Sendo assim, da ETAPA 1 para a ETAPA 2 deste trabalho houve um aumento esperado na virulência dos isolados, que mantiveram suas características originais

(com exceção do 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>, que já modificou na ETAPA 2), e da ETAPA 2 para a ETAPA 3 houve uma queda na virulência devido à predominância de uma forma não-patogênica e/ou à redução da esporulação da forma selvagem, patogênica.

Por outro lado, CHRISTENSEN e SCHNIDER (1948) não encontraram alterações na virulência de um isolado de *H. sativum* após cinco passagens sucessivas por trigo, mas a linhagem utilizada era derivada de muitos isolamentos monospóricos; portanto, bastante purificada. BROWN e MILLER (1954) também não encontraram alterações na patogenicidade desta espécie após duas passagens de isolados monoconidiais por aveia. ROBERT e JENKINS (1949), ao contrário, observaram mudanças na patogenicidade de isolados monoconidiais de *H. turcicum* ao longo de passagens por hospedeiros susceptíveis. As mudanças em virulência que ocorrem em isolados monoconidiais podem ser explicadas com base na dissociação de heterocáritons, quando o conídio que origina o isolado é heterocariótico, ou através de mutação em um dos núcleos de um conídio homocariótico, gerando um heterocáriton. A dissociação de heterocáritons pode originar muitas formas geneticamente distintas, que variam em virulência e também em relação às outras características. Como neste trabalho não se utilizou isolados monoconidiais, é mais provável que as alterações em virulência observadas tenham sido devidas principalmente à seleção de formas que diferiam em virulência e que estavam coexistindo naturalmente em cada isolado. Admitindo-se que indivíduos homocarióticos e heterocarióticos

rióticos estão presentes nos isolados e que, segundo TINLINE e MACNEILL (1969), virulência em fungos fitopatogênicos abrange ' de um a muitos loci e é uma função de produtos gênicos via etapas biossintéticas, pode-se esperar, então, diferenças em virulência entre homocárions e heterocárions e também entre os diferentes heterocárions.

Além de diferenças na virulência dos isolados de uma etapa para outra e entre os isolados dentro de cada etapa, os resultados das inoculações cruzadas e diretas realizadas neste trabalho mostram que os isolados apresentam índices de infecção diferentes nas duas cultivares. Os isolados coletados da cultivar IAC 5. MARINGÁ (44,74 e 222) foram sempre mais virulentos nesta cultivar do que em BR<sub>4</sub> e os isolados coletados em BR<sub>4</sub> foram sempre mais virulentos nesta cultivar do que em IAC 5. MARINGÁ. Isto indica que existe uma interação íntima entre cultivar hospedeira e patógeno na natureza, levando à uma especialização do patógeno à sua hospedeira natural. Mesmo assim, os isolados são capazes de infectar outra cultivar e adaptar-se a esta nova hospedeira, confirmando a plasticidade, com relação a patogenicidade, característica de *H. sativum*. Na primeira inoculação cruzada, realizada na ETAPA 1 (Tabela 10), os isolados 222 (coletado de IAC 5. MARINGÁ ) e 21 (coletado de BR<sub>4</sub>) foram os que apresentaram menores diferenças entre os índices de infecção em uma e em outra cultivar, sendo; portanto, os isolados menos específicos à cultivar original. Entre os isolados coletados em IAC 5. MARINGÁ, o 74 mostrou-se mais específico (maior diferença de

infecção entre as cultivares), o 44 intermediário e o 222 menos específico. Nos isolados coletados de BR 4, o 49<sub>4</sub> foi mais específico, o 18 intermediário e o 21 menos específico. As diferenças entre os índices de infecção médios de cada isolado, em cada uma das cultivares, poderiam ter sido analisadas estatisticamente mediante o teste t (de Student) para verificar suas significâncias, o que não foi feito ainda por absoluta falta de tempo.

Na ETAPA 2, os isolados 44 e 18 reduziram bastante as diferenças entre os índices de infecção obtidos na cultivar de origem e na outra cultivar, quando comparados aos índices da ETAPA 1. Isto sugere que estes isolados, após um único contato com uma cultivar que não a sua original, já são capazes de infectar e se desenvolver nesta nova cultivar com quase tanto sucesso quanto o fazem na cultivar de origem. O mesmo não ocorreu com o isolado 74, que se manteve específico à cultivar IAC 5. MARINGÁ, tanto que apresentou um pequeno aumento na diferença entre os índices. Não é possível fazer este tipo de comparação, com base nas diferenças entre os índices de infecção de cada isolado nas duas cultivares, com o isolado 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> porque neste isolado houve alteração nas características e concentração do inóculo já na ETAPA 2, o mesmo acontecendo com os demais isolados na ETAPA 3, como explicado anteriormente.

Na inoculação realizada pro MATSUMURA e cols. (1988), após estes isolados terem sido coletados na natureza, o isolado 44

foi o que se mostrou mais virulento entre sete isolados coletados em IAC 5. MARINGÁ e o isolado 18 entre os vinte e três coletados em BR 4, o que provavelmente está relacionado com a maior capacidade de adaptação destes dois isolados à novas cultivares, como mostra os resultados do presente trabalho. Estes isolados devem ser mais polimórficos com relação à patogenicidade do que o 74, ocorrendo possivelmente uma seleção de genótipos em cada uma das hospedeiras. Esta pressão seletiva imposta pelas cultivares pode ser constatada já na segunda inoculação (Tabela 11), pois o aumento da virulência destes isolados, da ETAPA 1 para a ETAPA 2, na cultivar que não a sua original é maior do que o aumento observado na cultivar original. Esta plasticidade só é possível em isolados polimórficos, sobre os quais atuam pressões seletivas, no caso as cultivares hospedeiras, favorecendo os genótipos do patógeno mais aptos a se desenvolverem em cada uma das cultivares. Um expressivo aumento em virulência na cultivar que não a de origem também foi verificado no isolado 49<sub>4</sub>. Já o 74 parece ser mais especialista, mas seria necessário um maior número de inoculações de modo a verificar se esta especialização à cultivar original é mantida ou não.

NELSON e KLINE (1962) observaram uma grande variação em patogenicidade entre oito isolados de *H. sativum*, em doze espécies de gramíneas. Os isolados obtidos de cada espécie apresentavam uma patogenicidade semelhante na espécie hospedeira da qual haviam sido coletados, indicando que todos os isolados de

uma determinada espécie possuíam um complexo gênico similar para patogenicidade à um hospedeiro específico. A patogenicidade à outros hospedeiros era bastante variável entre os isolados, evidenciando a presença de genes para virulência a mais do que o necessário para atacar o hospedeiro natural. Relacionando estas conclusões dos autores com os resultados do presente trabalho, os isolados 44 e 18 teriam mais genes para patogenicidade e/ou virulência "em excesso" do que o isolado 74, pois os primeiros adaptaram-se mais facilmente à cultivar que não a sua de origem. Segundo BURDON (1987), virulência e agressividade são as características que determinam a adaptação de genótipos individuais de um patógeno, sendo esta última uma medida comparativa do grau de sucesso reprodutivo que um isolado virulento apresenta em um determinado hospedeiro.

Na terceira inoculação (Tabela 12), os índices de infecção foram baixos devido à reduzida esporulação da forma selvagem, virulenta, em sementes de sorgo. Entre os isolados, os do par 44 foram os mais virulentos porque nestes a forma selvagem, apesar de ter reduzido sua esporulação, predominou sobre a forma rosa, avirulenta; que, por sua vez, predominou nos demais isolados.

Os resultados aqui obtidos quanto a adaptação dos isolados à cultivares que não a hospedeira natural, estão de acordo com o fato de cultivares inicialmente resistentes à *H. sativum* serem infectadas por este fungo após alguns anos de uso destas nas lavouras. WOOD (1962) testou a patogenicidade de 103 isolados desta espécie em vários hospedeiros, encontrando grandes di

ferências no que se refere ao número de hospedeiros infectados e à virulência dos isolados em cada hospedeiro. O autor recomendou que estes resultados fossem levados em consideração quando se tentasse desenvolver variedades resistentes a este patógeno. Segundo CASTRO (1976), o cultivo de variedades resistentes pode, por pressão de seleção, favorecer o surgimento de raças mais agressivas de *H. sativum*. A rotação de culturas é a prática mais indicada para evitar a adaptação crescente do patógeno à uma determinada cultivar hospedeira, e, conseqüentemente, o aumento da seriedade da doença e das perdas causadas nas lavouras.

As análises eletroforéticas das isoenzimas de alfa e beta-esterases dos isolados fúngicos, mostraram algumas alterações no padrão de bandas entre colônias e esporos de um mesmo isolado, entre os isolados de uma mesma etapa e em um mesmo isolado nas diferentes etapas. As figuras 15 a 28 mostram os diagramas e os zimogramas em colônias e esporos dos isolados pertencentes às ETAPAS 1,2 e 3.

Observando-se todos os zimogramas, nota-se inicialmente que existem dois padrões bem distintos, um que se caracteriza principalmente por uma banda alfa de intensidade forte, com RM variando de 0,62 à 0,74, e outro onde esta banda alfa é fraquíssima, aparecendo uma banda beta fraca, média ou forte, com RM de 0,35 à 0,38. Estes dois padrões básicos correspondem às duas formas fúngicas observadas neste trabalho e que também diferem quanto à mor

fologia e patogenicidade, sendo o primeiro característico da forma selvagem, escura e virulenta, e o segundo característico da forma rosa, avirulenta. Como a forma selvagem predominou sobre a rosa nas colônias em BDA, nas ETAPAS 1, 2 e 3, os três géis referentes a estas três colônias apresentam o padrão básico da forma selvagem em todos os isolados. Além da banda alfa forte já descrita, é característico também destas colônias uma banda beta de intensidade média com RM variando de 0,49 a 0,58. Em esporos, no meio de sementes de sorgo, a forma selvagem predominou em todos os isolados da ETAPA 1 e em sete dos oito isolados da ETAPA 2, o que pode ser observado no padrão de bandas destes isolados, que é o básico da forma selvagem. Nos esporos do isolado  $49_4$ -BR<sub>4</sub> da ETAPA 2 e dos isolados da ETAPA 3, com exceção do par 44 (44-MAR e 44-BR<sub>4</sub>), predominou a forma rosa, o que concorda com o padrão de bandas típico desta forma, nestes isolados.

Além destas diferenças marcantes entre as formas existem outras que, embora não tão características, mostram que ocorreram alterações à nível genético como decorrência de passagens sucessivas dos isolados pelas cultivares e por meios de cultura. Nas colônias da ETAPA 1, obtidas de plantas infectadas que estavam estocadas à três anos à 4°C, os isolados 44, 74, 18 e  $49_4$  apresentaram o mesmo padrão eletroforético, com uma banda alfa forte, com RM=0,62, e uma banda beta média, com RM=0,49. Os isolados 222 e 21 apresentaram, além destas duas bandas, uma outra banda beta média com RM=0,65. É interessante observar que estes dois isolados, oriundos de cultivares diferentes, foram os menos específicos na primeira inoculação cruzada, apresentando índices de infecção muito próximos

nas duas cultivares. Talvez esta banda beta adicional possa estar relacionada com a maior abrangência de hospedeiros constatada nestes isolados, o que está de acordo com as afirmações de NELSON e KLINE (1962), de que a patogenicidade a outros hospedeiros que não o original seria devida a presença de genes a mais do que o necessário para infectar o hospedeiro natural. Nos esporos desta etapa, os isolados 44,74 e 49<sub>4</sub> mantiveram praticamente o mesmo padrão que em colônias, só que as bandas ficaram todas mais anódicas, com RM= 0,74 para a alfa forte e 0,60 para a beta, que diminuiu bastante em intensidade, passando de média nas colônias à fraquíssima nos esporos. O isolado 18 modificou seu padrão, permanecendo a alfa forte que estava presente nas colônias mas alterando as betas que, de uma em colônias passou para duas em esporos, sendo uma fraca, com RM = 0,48 e outra média, com RM=0,95. Os isolados 222 e 21 permaneceram idênticos, mas ambos mostraram três bandas betas a mais do que as observadas nos isolados 44,74 e 49<sub>4</sub>, sendo uma média, com RM= 0,80; uma fraca, com RM= 0,85 e uma fraquíssima com RM= 0,98. Tanto em colônias quanto em esporos estes dois isolados, menos específicos em patogenicidade, apresentaram padrões idênticos e com maior número de bandas do que os demais isolados.

Na ETAPA 2, após a primeira inoculação cruzada e direta nas cultivares, as colônias dos isolados dos pares 44 (44-MAR e 44-BR<sub>4</sub>) 74 (74-MAR e 74-BR<sub>4</sub>) e 18 (18-MAR e 18-BR<sub>4</sub>) apresentaram padrões eletroforéticos idênticos, com as mesmas bandas observadas nas colônias destes isolados na ETAPA 1, só que mais anódicas, sendo o

RM da alfa forte igual a 0,68 e o da beta média igual a 0,55. No par 49<sub>4</sub> houve alteração, com uma banda beta adicional, de intensidade fraca e RM= 0,39, tanto no 49<sub>4</sub>-MAR quanto no 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub>, sendo que neste último apareceu ainda outra banda beta, de intensidade fraquíssima e RM= 0,64. A banda beta de RM=0,39 corresponde a presente nos isolados quando predomina a forma rosa e, de fato, esta forma predominou nos esporos do isolado 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> nesta etapa, o que pode ser verificado pelo padrão eletroforético apresentado pelos esporos deste isolado. Isto indica que a forma rosa já estava presente nas colônias, mas em menor proporção do que a forma selvagem, predominando sobre esta última quando o isolado cresceu em sementes de sorgo, que é um meio mais desfavorável à forma selvagem. Em esporos, pode-se observar algumas variações dentro dos pares de isolados, como uma banda beta de intensidade fraquíssima e RM=0,62 a mais no isolado 44-BR<sub>4</sub> em relação ao 44-MAR e também, a mesma banda, a mais no isolado 18-BR<sub>4</sub> com relação ao 18-MAR. Este é um fato interessante porque mostra que os isolados ativaram genes adicionais quando inoculados em BR 4, que é mais resistente à helmintosporiose do que IAC 5.MARINGÁ. No isolado 49<sub>4</sub>-BR<sub>4</sub> esta banda já havia aparecido nas colônias deste isolado e não nas colônias do isolado 49<sub>4</sub>-MAR, nos isolados 44-BR<sub>4</sub> e 18-BR<sub>4</sub> ela não apareceu em colônias mas sim em esporos e no 74-BR<sub>4</sub> ela não apareceu, ficando os dois isolados do par exatamente iguais. Isto pode estar relacionado ao fato do isolado 74 ter sido o único que manteve sua especificidade à cultivar original tão alta na ETAPA 2 quanto havia sido na ETAPA 1, enquanto que os demais isolados reduziram suas especificidades.

Na ETAPA 3, as colônias de todos os isolados apresentaram o padrão eletroforético característico da forma selvagem, com uma banda alfa forte, com  $RM=0,70$  e uma banda beta média, com  $RM= 0,58$ . Porém, nos isolados dos pares 74,18 e no  $49_4$ -MAR(o  $49_4$ -BR<sub>4</sub> não foi analisado nesta etapa por não ter sido possível sua recuperação das folhas, que estavam muito pouco infectadas), apareceu uma outra banda alfa, fraquíssima, com  $RM= 0,84$ . Esta banda não foi constatada nos isolados do par 44, os únicos que mantiveram a forma selvagem predominante nos esporos desta etapa. Os esporos dos demais isolados apresentaram o padrão típico da forma rosa, com uma banda beta com  $RM= 0,38$ , média no par 74, no qual a porcentagem de população da forma rosa foi maior, e fraca no par 18 e no  $49_4$ -MAR. A banda alfa típica da forma selvagem tornou-se fraquíssima nestes isolados, indicando a presença de indivíduos desta forma em baixa concentração, mas permaneceu forte nos isolados do par 44, nos quais a forma selvagem predominou. Assim como em colônias, uma outra banda alfa foi ativada nos isolados nos quais predominou a forma rosa, de intensidade fraca e  $RM= 0,94$ . O  $49_4$ -MAR apresentou ainda outra banda alfa, com  $RM= 0,99$  e intensidade média e o  $74$ -BR<sub>4</sub> ativou uma banda beta a mais do que o  $74$ -MAR, com  $RM= 0,96$  e intensidade forte. As colônias obtidas a partir destes esporos mostraram o padrão típico da forma selvagem nos isolados do par 44 (uma banda alfa forte e  $RM=0,71$  e uma banda beta média e  $RM= 0,58$ ) e o típico da forma rosa nos isolados dos pares 74,18 e no  $49_4$ -MAR(uma banda beta forte e  $RM=0,38$  e uma banda alfa fraca e  $RM=0,94$ ), coincidindo com o padrão básico dos esporos que originaram estas colô-

nias mas sem as bandas adicionais observadas nos esporos do 49<sub>4</sub>-MAR e do 74-BR<sub>4</sub>.

Com base nestes resultados pode-se constatar que os isolados, de uma maneira geral, ativaram mais bandas no estágio de esporos do que quando em colônias, o que deve estar relacionado com o maior esforço que os isolados devem empregar para sobreviverem em meio de sementes de sorgo do que em BDA, que é um meio rico e propício ao desenvolvimento das colônias fúngicas. Outro ponto importante é a ativação de bandas diferentes entre isolados que se originaram de um mesmo isolado natural e que foram inoculados em cultivares diferentes, o que sugere uma interação a nível genético entre patógeno e hospedeiro, onde a ativação de determinados genes favoreceria a adaptação dos isolados à uma ou à outra cultivar. A análise de várias isoenzimas poderia esclarecer melhor estes pontos, que são bastante importantes no estudo das interações hospedeiro-patógeno.

As duas formas fúngicas identificadas neste trabalho, denominadas selvagem e rosa, coexistem nos isolados provavelmente já nas lavouras onde foram coletados, predominando a selvagem em condições ideais para o desenvolvimento do fungo (hospedeiros e meio de cultura BDA) e a rosa, nos isolados dos pares 74,18 e 49<sub>4</sub>, em condições desfavoráveis (passagens sucessivas por sementes de sorgo). Apesar da forma rosa não predominar na última etapa deste trabalho no par 44, como ocorreu nos outros isolados, a presença de setores de cor rosa em colônias do 44 indica que ambas as formas coexistem

também neste isolado, mas sua forma selvagem deve possuir mecanismos adicionais que possibilitam um melhor desenvolvimento desta em sementes de sorgo, impedindo assim a predominância da forma rosa. Estas duas formas diferem significativamente quanto à coloração, patogenicidade e padrão eletroforético para alfa e beta-esterases. Além disso, os inóculos da forma rosa continham esporos diferentes dos típicos de *H.sativum*. Estes fatores levam a dúvida, já levantada anteriormente neste trabalho, quanto a descrição da forma rosa como pertencente a espécie *H.sativum*, fato comum na literatura e já discutido anteriormente. Como a identificação desta espécie tem por base apenas características morfológicas, a obtenção de padrões eletroforéticos é um dado novo a ser considerado na caracterização de formas fisiológicas deste fungo. É possível, e bastante provável dado as diferenças encontradas principalmente no padrão de bandas entre as formas selvagem e rosa, que esta última pertença, na verdade, à outra espécie muito pouco patogênica à trigo e que estaria coexistindo naturalmente com *H.sativum*. Estamos estendendo os estudos comparativos entre estas formas, abrangendo análises isoenzimáticas, morfológicas, citológicas e de patogenicidade, de modo a esclarecer as dúvidas que ainda restam quanto à sua taxonomia.

## 5 . RESUMO E CONCLUSÕES

Seis isolados do fungo fitopatogênico *Helminthosporium sativum* coletados das cultivares de trigo IAC 5. MARINGÁ e BR 4, foram analisados quanto aos seus comportamentos ao longo de três passagens pelos hospedeiros e por meios de cultura artificiais. Durante o trabalho foram feitas três inoculações diretas (de cada isolado em sua cultivar de origem) e cruzadas (na cultivar que não a original do isolado). Após cada inoculação nas hospedeiras, era avaliada a patogenicidade dos isolados e algumas características morfológicas, bem como os padrões eletroforéticos para o sistema isoenzimático de alfa e beta esterases, de suas colônias em meio de cultura BDA e de seus esporos em meio de sementes de sorgo. A especificidade dos isolados de *H. sativum* às suas cultivares hospedeiras de origem foi testada, de modo a verificar o potencial genético para patogenicidade e/ou virulência desta espécie.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- os isolados fúngicos estudados contêm duas formas fisioló -

gicas, ou duas prováveis espécies, bastante distintas com relação à coloração de colônias e esporos, produção de conídios em sementes de sorgo, patogenicidade e padrão eletroforético para alfa e beta-esterases; a proporção entre estas formas depende do meio no qual se desenvolvem.

- Passagens sucessivas dos isolados por meio de sementes de sorgo levam à redução da esporulação da forma selvagem e conseqüente predominância da forma chamada rosa, avirulenta; este meio exerce forte pressão seletiva sobre o fungo selvagem, não sendo indicada a sua utilização quando se deseja manter as características naturais dos isolados.

- Da primeira para a segunda inoculação foi observado um aumento na virulência dos isolados, sugerindo a ocorrência de seleção, no hospedeiro, de genótipos do patógeno mais virulentos e; portanto, mais aptos a se fixarem e se desenvolverem nas plantas. A queda na virulência observada na terceira inoculação foi devida à baixa esporulação da forma selvagem, virulenta, no meio de sementes de sorgo, com conseqüente baixa concentração de conídios nos inóculos.

- A redução na especificidade dos isolados à sua cultivar original, ao longo das inoculações, reflete a plasticidade da espécie *H. sativum* no que se refere à patogenicidade, o que pode ser verificado em condições de campo, onde cultivares inicialmente resistentes à este patógeno são por ele infectadas após algum tempo nas lavouras. A rotação de culturas é indicada para evitar a

crescente adaptação do patógeno à uma determinada cultivar hospedeira.

- Os padrões eletroforéticos para alfa e beta-esterases são bastante característicos para as formas selvagem e rosa, indicando que as diferenças morfológicas e fisiológicas entre elas se refletem no conteúdo isoenzimático, tendo; portanto, base genética.

- De uma maneira geral, em conídios são ativadas mais bandas de alfa e beta-esterases do que em colônias, o que pode ser explicado pelo maior esforço empregado pelos isolados para sobreviverem em meio de sementes de sorgo, que é pobre em nutrientes.

- A ativação de bandas diferentes nos isolados, quando inoculados em uma e em outra cultivar, indica a ocorrência de interação patógeno/hospedeiro a nível genético, onde a ativação de determinados genes favorece a adaptação do isolado ao seu hospedeiro no momento.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ADLAKHA, K.L.; WILCOXSON, R.D. & RAYCHAUDURI, S.P. 1984. Resistance of wheat to leaf spot caused by *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Dis.* 68: 320-321.
- ALEXOPOULOS, C.J. & MIMS, C.W. 1985. *Introducción a la micología*. 2 ed. Barcelona, Ediciones Omega, 638 p.
- AZEVEDO, J.L. 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Ph itopathologica*, 2:3-15.
- BABAYANTS, L.T. & KLECHKO, E.A. 1983. Root rots of winter wheat in the South West of the Ukraine. *Plant Breeding Abstracts*, 5: 880.
- BELL, A.A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32: 21-81.
- BONTEA, V. & GROU, E. 1972. Aminoacid composition and electrophoretic characteristics as criteria separating species of *Helminthosporium*. *Studi Si Cercetari de Biologie. Acad.Republ. Soc. Rom. Ser. Bot.*, 24: 357-361.
- BROWDER, L.E.; LYON, F.L. & EVERSMEYER, M.G. 1980. Races, pathogenicity, and type cultures of plant pathogens. *Phytopathology*, 70 :581-583.
- BROWN, A.R. & MILLER, J.H. 1954. A comparative study of *Helminthosporium sativum* P.K. & B and *H.victoria* M & M. on oats. *Agron.Jour.*, 46:63-67.
- BURDON, J.J. 1987. *Diseases and plant population biology*. Cambridge, Cambridge University Press. 208 p.

- BURDON, J.J. & ROELFS, A.P. 1985. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and '*P.recondita* on wheat . *Phytopathology*, 75:907-913.
- BUXTON, G.W. 1960. Heterokaryosis, saltation and adaptation. In: HORSFALL, J.G. & DIMOND A.E. eds. *Plant Pathology II, The Pathogen*. New York, Academic Press. cap. 10, p. 395-405.
- CASTRO, C. 1976. Mudanças em esporulação e patogenicidade de *Helminthosporium sativum* Pamm, King & Bakke através de passagens seriadas em hospedeiros. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 59 p. Dissertação Mestr. Fitopatologia.
- CHIOAMBARAM, P.; MATHUR, S.B. & NEEGAARD, P. 1973. Identification of seed-borne *Drechslera* species. *Friesia*, 10:165-207.
- CHRISTENSEN, J.J. 1925. Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum*. *Phytopathology*, 15:785-796.
- CHRISTENSEN, J.J. 1929. The influence of temperature on the frequency of mutation in *Helminthosporium sativum*. *Phytopathology*, 19:155-162
- CHRISTENSEN, J.J. & DEVAY, J.E. 1955. Adaptation of plant pathogen to host. *Ann Rev. Plant Physiol* ., 6:367-392.
- CHRISTENSEN, J.J. & DAVIES, F.R. 1937. Nature of variation in *Helminthosporium sativum*. *Mycology*, 29:85-99.
- CHISTENSEN, J.J. & SCHNEIDER, C.L. 1948. The effect of repeated passage of *Helminthosporium sativum* through the host on genetic variation and pathogenicity. *Phytopathology*, 38:5.
- CLARE, B.G., FLENTJE, N.T. & ATKINSON, M.R. 1968. Eletrophoretic patterns of oxireductase and other protein as criteria in fungal taxonomy. *Ann. J. Biol. Scien.*, 21:275-295.
- COHEN, E.; SVERDLOVE, E. & WOOL, D. 1977. Expression of esterases during ontogenesis of the flour beetle *Tribolium costaneum* (Tenebrionidae: Coleoptera). *Biochemical Genetics* , 15:253-264
- DAY, P.R. 1974. *Genetics of host-parasite interaction*. San Francisco, W.H. Freeman and Company. 238 p.

- DICKSON, J.G. 1956. *Diseases of field crops*. New York, Mc Graw-Hill. 517 p.
- DIEHL, J.A. 1982. Podridão comum. In: *Trigo no Brasil*. Fundação Cargill. V.2. cap. 12, p.501-507.
- Enzyme nomenclature*. 1979. Recommendations (1978) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. New York, International Union of Biochemistry, Academic Press, Inc..
- FERNANDES, J.M.C. & PICININI, E.C. 1984. Doenças do trigo: como de terminar a melhor época de controle. Folheto CNPT - EMBRAPA.
- FLOR, H.H. 1951. Genes for resistance to rust in Victory Flax. *Agronomy Journal*, 43: 527-531.
- FREITAS, L.B. & MATSUMURA, A.T.S. 1989. Investigação da relação patógeno-hospedeiro em plantas de trigo. *Ciência e Cultura*, 41 (7): 709. Suplemento.
- GUSEVA, N.N.; LEVITIN, M.M. & MIKHAILOVA, L.A. 1979. Genetics mechanisms of variability in phytopathogenic fungi. *Acta Phytopathologica Academia Scientiarum Hungaricae*, 14: 441-447.
- HARRIS, H. 1980. *The principles of human biochemical genetics*. 3 ed. Amsterdam, Elsevier.
- HENRY, C.E. & GARBER, E.D. 1967. Genetics of phytopathogenic fungi XVIII. Detection of esterases of *Colletotrichum lagenarium* in culture filtrates and diseased tissue extracts by starch gel zone electrophoresis. *Acta Phytopathol.*, 2: 89-94.
- HOOKE, A.L. & SAXENA, K.M.S. 1971. Genetics of disease resistance in plants. *Annual Review of Genetics*, 5: 407-424.
- HOSFORD, R.M. Jr; SOLANGI, G.R.M. & KIESLING, R.L. 1975. Inheritance in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, 65: 699-703.
- HUNTEN, R.C. & MARKERT, J. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Scientia*, 125: 1294-1295.
- JAMES, W.C. 1971. An illustrated series of assessment keys for plant diseases: their preparation and usage. *Can. Plant Dis. Surv.*, 51: 40-65.

- JOSHI, L.M.; GOEL, L.B. & RENFRO, B.L. 1969. Multiplication of inoculum of *Helminthosporium turcicum* on sorghum seeds. *Indian Phytopathol.*, 22: 146-148.
- KINSEY, J.G. & HOOKER, A.L. 1973. Changes in *Helminthosporium turcicum* populations following serial host passage. *Plant Dis. Repr.*, 57: 590-591.
- KUNOH, H. e cols. 1988. Contact tropism by *Erysiphe graminis*: release of esterase. In: 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY. *Anais*. Kyoto, Japan. p.235.
- LAGOS, M.B. 1983. História do melhoramento do trigo no Brasil. *Bol. Téc. IPAGRO*, Porto Alegre, 10: 1-80.
- LEMONS, C.T. 1983. *Relações fenéticas entre as espécies do complexo Briza - (Gramineae): isoesterases*. Porto Alegre, UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Genética. 191 p. Dissertação Mestr. Genética.
- LINDEN, A.R. e cols. 1988. Características biológicas de *Bipolaris sorokiana* em plantas de BR 4 e IAC 5. MARINGÁ. In: XV REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO. *Resumos*. Passo Fundo, CNPT-EMBRAPĀ. V.1. p.174.
- LUZ, W.C. 1982. Mancha marron. In: *Trigo no Brasil*. Fundação Cargill. v.2. cap. 13, p. 525-529.
- LUZ, W.C. 1987. *Identificação dos principais fungos das sementes de trigo*. Passo Fundo, EMBRAPA-CNPT (Circular Técnica 1). 28 p.
- MATSUMURA, A.T.S.; ALMEIDA, A.M.P. & HEIDRICH SOBRINHO, E. 1982. A comparison of the pathogenicity of monoconidial and polyconidial isolates of *Trichometasphaeria turcica* Lutt. *Rev. Brasil. Genet.*, 5: 287-295.
- MATSUMURA, A.T.S. e cols. 1987. Electrophoresis patterns of genetic variability in natural occurring populations of *Cochliobolus sativus*. *Annual Wheat Newsletter*, 33 : 41.
- MATSUMURA, A.T.S. e cols. 1988. Relações Fenéticas entre isolados naturais de *Bipolaris sorokiniana*. In: XV REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO. *Resultados de Pesquisas do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo*. Passo Fundo, CNPT - EMBRAPA, p. 230.

- MATSUMURA, A.T.S. e cols. 1988. Polimorfismo isoenzimático em populações naturais de *Bipolaris sorokiniana*. In: XV REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, *Resultados de Pesquisas do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo*. Passo Fundo, CNPT-EMBRAPA, p.229.
- McKEEN, W.E. 1974. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 64: 461-467.
- McMILLIN, D.E. 1983. Plant isozymes: a historical perspective. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam, Elsevier. Part A, p.3-14.
- MEHTA, Y.R. 1981. Identification of races of *Helminthosporium sativum* of wheat in Brazil. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, 16: 331-336.
- MEHTA, Y.R. 1986. Avaliação de perdas em trigo causadas por *Helminthosporium sativum*. *Fitopatologia Brasileira*, 11: 320-321
- MEYER, J.A. & RENARD, J.L. 1969. Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopatology*, 59: 1409-1411.
- MISRA, A.P. 1979. Variability, physiologic specialization and genetics of pathogenicity in graminicolous *Helminthosporium* affecting cereal crops. *Indian Phytopathology*, 32: 1-22
- NELSON, R.R. 1961. Evidence of gene pools for pathogenicity in species of *Helminthosporium*. *Phytopathology*, 51: 736-737.
- NELSON, R.R. & KLINE, D.M. 1962. Intraspecific variation in pathogenicity in the genus *Helminthosporium* to gramineous species. *Phytopathology*, 52: 1045-1049.
- NELSON, R.R. & KLINE, D.M. 1969. Genes for pathogenicity in *Cochliobolus heterostrophus*. *Can. J. Bot.* 47: 1311-14.
- NELSON, R.R.; MACKENSIE, D.R. & SCHEIFELE, G.L. 1970. Interaction of genes for pathogenicity and virulence in *Trichometasphaeria turcica* with different numbers of genes for vertical resistance in *Zea mays*. *Phytopathology*, 60: 1250-1254.
- NICHOLSON, R.L.; KUC, J. & WILLIAMS, E.B. 1972. Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 62: 1242-1247.

- MATSUMURA, A.T.S. e cols. 1988. Polimorfismo isoenzimático em populações naturais de *Bipolaris sorokiniana*. In: XV REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, *Resultados de Pesquisas do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo*. Passo Fundo, CNPT-EMBRAPA, p.229.
- McKEEN, W.E. 1974. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 64: 461-467.
- McMILLIN, D.E. 1983. Plant isozymes: a historical perspective. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam, Elsevier. Part A, p.3-14.
- MEHTA, Y.R. 1981. Identification of races of *Helminthosporium sativum* of wheat in Brazil. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, 16:331-336.
- MEHTA, Y.R. 1986. Avaliação de perdas em trigo causadas por *Helminthosporium sativum*. *Fitopatologia Brasileira*, 11:320-321
- MEYER, J.A. & RENARD, J.L. 1969. Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopatology*, 59:1409-1411.
- MISRA, A.P. 1979. Variability, physiologic specialization and genetics of pathogenicity in graminicolous *Helminthosporium* affecting cereal crops. *Indian Phytopathology*, 32:1-22
- NELSON, R.R. 1961. Evidence of gene pools for pathogenicity in species of *Helminthosporium*. *Phytopathology*, 51: 736-737.
- NELSON, R.R. & KLINE, D.M. 1962. Intraspecific variation in pathogenicity in the genus *Helminthosporium* to gramineous species. *Phytopathology*, 52: 1045-1049.
- NELSON, R.R. & KLINE, D.M. 1969. Genes for pathogenicity in *Cochliobolus heterostrophus*. *Can. J. Bot.* 47: 1311-14.
- NELSON, R.R.; MACKENSIE, D.R. & SCHEIFELE, G.L. 1970. Interaction of genes for pathogenicity and virulence in *Trichometasphaeria turcica* with different numbers of genes for vertical resistance in *Zea mays*. *Phytopathology*, 60: 1250-1254.
- NICHOLSON, R.L.; KUC, J. & WILLIAMS, E.B. 1972. Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 62 1242-1247.

- NYGAARD, S.L. e cols. 1989. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology*, 79:773-780.
- OTT, L. & SCANDALIOS, J.G. 1978. Genetic control and lineage relationships among aminopeptidases in maize. *Genetics*, 89:137-146.
- PRESTES, A.M. and PICININI, E.C. 1984. Doenças fúngicas da parte aérea do trigo. *Agroquímica Ciba-Geigy*, 23:22-26.
- REIS, E.M. 1982. Levantamento de plantas cultivadas, nativas e invasoras hospedeiras de fungos causadores de podridões radiculares em cereais de inverno e em outras culturas. *Summa Phytopathologica*, 8: 134-140.
- ROBERT, A.L. & JENKINS, M.T. 1949. Variability in monoconidial and hyphal-tip isolates of *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, 39:504.
- SCANDALIOS, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Ann. Rev. Biochem. Genet.*, 3:37-39.
- SCANDALIOS, J.G. 1974. Isozymes in development and differentiations. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 25: 225-258.
- SCHEEREN, P.L. 1986. Informações sobre o trigo *Triticum* spp. Documento. CNPT- EMBRAPA. Passo Fundo, RS. 34 p.
- SNIDER, R.D. 1973. Electrophoresis and the taxonomy of phytopathogenic Fungi. *Bull. Torrey Bot.*, 100: 272-276
- SRIVASTAVA, O.P.; LUTHRA, J.K. & NARVLA, P.V. Inheritance of seedling resistance to leaf blight of wheat. *Indian Journal of Genetics & Plant Breeding*, 31(2):209-211.
- TINLINE, R.D. 1960. Pathogenic and cultural variation in *Cochliobolus sativus*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 43:696-697.
- TINLINE, R.D. 1962. *Cochliobolus sativus*. V. Heterokariosis and parasexuality. *Can. J. Bot.*, 40:425-437
- TINLINE, R.D. & McNEILL, B.H. 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopath.*, 7: 147-170.

- TINLINE, R.D.; STANFFER, J.F. & DICKSON, J.G. 1960. *Cochliobolus sativus*.  
III. Effect of ultraviolet radiation. *Can. J. Bot.*, 38:275-282.
- TOLMSOFF, W.J. 1983. Heteroploidy as a mechanism of variability  
among fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 21:317-340.
- WATSON, I.A. 1970. Changes in virulence and population shifts in  
plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 8:209-230.
- WEBSTER, R.K. 1974. Recent advances in the genetics of plant patho-  
genic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 12: 331-353.
- WOOD, L.S. 1962. Relation of variation in *Helminthosporium sativum* to  
seedling blight of small grains. *Phytopathology*, 52: 493-498.
- ZAMBINO, P.J. & HARRINGTON, T.C. 1989. Isozymes variation within and  
among host-specialized varieties of *Leptographium wageneri*. *Mycologia*,  
81:122-133.