

ANÁLISE DA VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E TAXA DE CRESCIMENTO DE CULTURAS POLICONIDIAIS E MONOCONIDIAIS DE *Bipolaris sorokiniana*

Alana Poloni ^{1*}
Maria Viviane Gomes Muller ^{2*}
Igor Pessi ¹
Sueli Teresinha Van Der Sand ^{1‡}

RESUMO

Bipolaris sorokiniana é um fitopatógeno de grande importância na cultura de trigo, causando moléstias como a mancha marrom, podridão comum da raiz e ponta preta dos grãos. Este fungo encontra-se amplamente difundido nas regiões tritícolas do país, acarretando perdas significativas na produção e comercialização deste cereal. O fitopatógeno apresenta uma grande variabilidade morfológica e fisiológica, dificultando medidas de controle contra as moléstias causadas pelo mesmo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência, que diferentes meios de cultura teriam sobre a variabilidade do fungo. Para tanto, foram selecionados 21 isolados de *B. sorokiniana* e destes foram obtidas culturas poli e monoconidiais. As características morfológicas (coloração, borda, textura superficial do micélio aéreo, cor e forma dos setores) e a taxa de crescimento dos isolados foram avaliadas em quatro diferentes meios de cultivo: ágar batata dextrose (BDA), Sabouraud maltose, Sabouraud galactose e Sabouraud glicose. As culturas monoconidiais não apresentaram diferenças significativas na taxa de crescimento entre os diferentes meios. Os mesmos apresentaram pouca variação morfológica entre os diferentes meios de cultura, bem como nas repetições em um mesmo meio de cultivo. No entanto, nas culturas policonidiais, a variação morfológica era evidente até mesmo nas repetições de um isolado em um mesmo meio de cultivo. Comparando-se culturas monoconidiais e policonidiais quanto à taxa de crescimento, foram encontradas diferenças significativas de crescimento nos meios Sabouraud maltose e Sabouraud galactose para as culturas policonidiais, diferença essa não obtida para as monoconidias.

Palavras-chaves: *Bipolaris sorokiniana*; variabilidade fisiológica; morfologia; cultura monoconidial e policonidial.

ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL AND GROWTH RATE VARIABILITY OF POLYCONIDIAL AND MONOCONIDIAL CULTURES OF *Bipolaris sorokiniana*

ABSTRACT

Bipolaris sorokiniana is a phytopathogen of great importance on the wheat culture regions, causing diseases such as spot blotch, common root rot and back point of the grain. This fungus is widely distributed over the country and is responsible for a great loss on the production and commercialization of the grain. It has a high physiological and morphological variability what makes the development of control measures a difficult task. The aim of this work was to verify

¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, sala 158, Porto Alegre, 90050-170, RS, Brasil. E-mail: alanapo@gmail.com, igor_pessi@hotmail.com, svands@ufrgs.br

² UNISC – Universidade de Santa Cruz, Departamento de Biologia e Farmácia, Santa Cruz, RS mv_muller@hotmail.com

* As duas profissionais trabalharam com o mesmo desempenho para o desenvolvimento deste trabalho

‡ autor para correspondência

the influence of different culture media over this variability. For that, 21 isolates of *B. sorokiniana* were selected and from them polysporic and monosporic cultures were obtained. The morphological aspects such: coloration, edge, superficial texture aerial mycelium and color, and shape of the sectors; and the growth rate of the isolates were analyzed in four different media: potato dextrose agar (PDA), Sabouraud maltose, Sabouraud galactose and Sabouraud glucose. The monosporic cultures did not present significant difference in the growth rate among the different media. However, a small morphologic variation, as well as on the repetitions of the isolates in the same medium was obtained. By the other hand, polysporic cultures showed an high morphologic variability among the four media and also the morphologic variability was evident even in the repetitions of one isolate, in the same medium. Comparing monosporic and polysporic cultures, considering the growth rate, a significant difference ($p < 0.05$) was found in Sabouraud maltose and Sabouraud galactose media, for the polysporic cultures. However, no significant difference was observed in the monosporic cultures.

Key words: *Bipolaris sorokiniana*, physiological variability, morphology, monoconidial and polyconidial culture

INTRODUÇÃO

Trigo é o cereal mais comercializado do mundo bem como a segunda cultura de grãos em produção, sendo superado apenas pelo milho. O Brasil consome anualmente mais de 10 milhões de toneladas de trigo, porém não conseguiu produzir, nos últimos anos, mais que 30% de suas necessidades. A Argentina é o grande exportador de trigo para o Brasil e, além de ser competitiva nessa lavoura, pois conta com as vantagens tarifárias possibilitadas pelo Mercosul. A produção brasileira de trigo diminuiu significativamente nas últimas décadas, embora tenha recentemente apresentado uma pequena recuperação, o que representa apenas 1% da produção mundial (IBGE, 2005).

Essa baixa produção decorre, principalmente, da redução das áreas cultivadas e das condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de doenças fúngicas, os quais são fatores limitantes na produção e na qualidade dos grãos colhidos. O fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.in Sorok) Shoemaker, 1959; (teleomorfo): *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsl. ex dastur, é um fungo filamentosos com conídios fusóides e germinação bipolar que causa doenças em uma ampla variedade de gramíneas, como trigo (*Triticum aestivum*), centeio (*Secale cereale*), aveia (*Avena sativa*) e cevada (*Hordeum vulgare*), além de outros cereais. É um patógeno de especial importância nas culturas do trigo e da cevada, causando moléstias que recebem diferentes denominações, de acordo com o órgão da planta que é afetado (REIS, 1982).

As moléstias causadas por *B. sorokiniana* incidem em qualquer fase de desenvolvimento da cultura. Quando o fungo ataca os órgãos subterrâneos, interferindo nos

processos de absorção de água e nutrientes, a moléstia recebe o nome de podridão comum da raiz, ao atingir os órgãos verdes da planta, interferindo nos processos fotossintéticos, a moléstia é denominada mancha marrom. As folhas ficam crestadas, secas e morrem prematuramente. Os grãos formados nas espigas infectadas expõem o sintoma denominado ponta preta. Esse sintoma nem sempre se manifesta, o que torna as sementes, muitas vezes, aparentemente sadias (REIS & FORCELINI, 1993).

Os métodos de controle desta e de outras moléstias são a rotação de cultura, eliminação de restos culturais, o uso de cultivares resistentes e fungicidas. Os fungicidas são bastante aplicados, pela facilidade e rapidez nos resultados. Porém, o uso contínuo dos mesmos aumenta as chances de resistência de fungos fitopatogênicos (GHINI & KIMATI, 2002).

Durante o processo infectivo, o fungo passa por uma fase biotrófica de crescimento sobre o hospedeiro, caracterizada pela penetração da cutícula e parede celular, seguida do desenvolvimento de hifas dentro das células da epiderme e uma fase necrotrófica onde ocorre a inversão do mesófilo e morte das células atacadas (KUMAR et al., 2002). O fitopatógeno sobrevive no solo, em grãos ou restos de vegetais infectados.

A associação patógeno-semente é um mecanismo eficiente de sobrevivência, permitindo que o patógeno não se separe da principal fonte de nutrição, podendo esporular e se dispersar durante a germinação e emergência das plântulas em uma cultura recém estabelecida (PRESTES 1986).

A importância do papel epidemiológico das sementes infectadas como fonte de inóculo primário é uma questão que não tem sido

devidamente considerada entre as medidas de controle de fungos patogênicos. O controle de fungos associados à semente de trigo deve ser considerado como prática associada a rotação de culturas de inverno e não apenas como uma medida isolada (REIS, 1987). Espécies fúngicas, patogênicas de plantas ou animais, exibem variações em importantes aspectos: a variabilidade na morfologia impede a identificação do patógeno, enquanto a variabilidade fisiológica dificulta a avaliação da patogenicidade. A correta identificação das espécies é uma informação necessária, para entender a relação patógeno-hospedeiro e possibilitar que medidas de controle sejam tomadas (MÜLLER, 2000).

As características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de *B. sorokiniana* já foram abordadas em muitos estudos. Christensen (1925) estudou 37 isolados monoconidiais de *Helminthosporium sativum* e verificou a presença de significativas diferenças morfológicas nos isolados quando crescidos em meio ágar batata dextrose (BDA). Da mesma forma, uma grande variabilidade foi observada em *C. sativus*, com relação à cor dos esporos, pigmentação do micélio, virulência, esporulação e outras características em meio de cultura. Sendo assim foram sugeridos três mecanismos que aumentariam a variabilidade: mutação, heterocariose e hibridização (TINLIND, 1961).

A variabilidade pode ser responsável pelo sucesso infectivo do fungo, pois suplanta a resistência do hospedeiro (GUSEVA et al., 1979). Variabilidade quanto ao crescimento e morfologia de 60 isolados de *C. sativus*, cultivados em diferentes meios de cultura foram relatados por Viegas et al. (1992) e os autores sugeriram que estas diferenças estavam relacionadas ao meio e características de cada isolado.

O presente estudo visa analisar as características morfológicas (coloração, borda, textura do micélio aéreo, forma e cores dos setores) e fisiológicas (taxa de crescimento) de culturas monoconidiais e policonidiais de isolados de *B. sorokiniana*, utilizando quatro meios de cultivo: ágar batata dextrose (BDA), Sabouraud maltose, Sabouraud galactose e Sabouraud glicose, buscando verificar a interferência dos meios nestas características dos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

ISOLADOS DE *Bipolaris sorokiniana*

Neste trabalho, foram utilizados 21 isolados de *B. sorokiniana* (Tabela 1), dos quais 19 foram obtidos de sementes de trigo contaminadas, provenientes de diferentes cultivares e um foi isolado de cevada oriundas do Brasil e um isolado oriundo do México. As sementes de trigo e o isolado de cevada foram fornecidos pelo CNPT-Embrapa, Passo Fundo, RS, o isolado do México foi fornecido pelo CIMMYT-México.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS POLICONIDIAIS DE *B. sorokiniana*

As sementes de trigo foram submersas em hipoclorito de sódio 2% por dois minutos, enxaguadas três vezes em água destilada estéril e transferidas para placas de Petri contendo BDA. As amostras foram incubadas em estufa a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ por aproximadamente nove dias, com fotoperíodo de 12 horas. Após a obtenção de culturas puras, alíquotas foram removidas das amostras e transferidas para tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado e incubadas como descrito anteriormente. Após o desenvolvimento das colônias, foi realizada a identificação através de microcultivo. Uma vez confirmada a pureza do isolado o mesmo foi repicado e novamente incubado nas mesmas condições descritas e armazenado a 4°C .

ISOLAMENTO DE CULTURAS MONOCONIDIAIS A PARTIR DE CULTURAS POLICONIDIAIS

Para a obtenção das culturas monoconidiais, o micélio aéreo da cultura policonidial foi transferido com auxílio de uma alça de platina para tubos de microcentrífuga contendo 2 ml de solução salina a 0,85%. Em seguida, os tubos foram agitados para a liberação completa dos conídios. A suspensão foi transferida em uma placa de Petri contendo meio BDA e deixada em repouso por um período de 2 horas, para que os conídios pudessem se aderir ao meio de cultura. Após este período o excesso de água da placa foi retirado e os conídios permaneceram aderidos ao meio de cultura. Utilizando-se um estereomicroscópio com aumento de 40x, os conídios foram transferidos assepticamente, com auxílio de uma micro-agulha de vidro, para tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado. Os tubos foram observados sob estereomicroscópio com a finalidade de confirmar a transferência de apenas um conídio por cada tubo. Após, os

tubos foram incubados a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12 horas, até o desenvolvimento completo das colônias. Uma vez verificada a pureza da colônia a amostra era armazenada a 4°C .

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E TAXA DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE *B. sorokiniana* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

Para a avaliação da taxa de crescimento foram utilizadas placas de Petri com sete centímetros de diâmetro contendo os meios de cultura: BDA, Sabouraud glicose, Sabouraud maltose e Sabouraud galactose. Para cada isolado, das culturas policonidiais e monoconidiais foram realizadas cinco repetições, para cada um dos quatro meios. Duas linhas perpendiculares (A e B) foram traçadas no verso de cada placa e um disco de 0,5 cm de diâmetro, contendo micélio do fungo, foi inoculado no centro de cada placa, onde as linhas se interceptavam. As placas foram incubadas em estufa a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12 horas. Foram mantidos constantes condições de fotoperíodo, temperatura e pH, durante o cultivo dos isolados. A procedência geográfica, o cultivar e os meios de cultivo foram as variáveis.

As medidas da taxa de crescimento foram realizadas a cada 24 horas, utilizando um paquímetro, por um período de 120 horas. As características morfológicas foram realizadas de acordo com a técnica de NOBLES (1958), citada por BETTUCI & GUERRERO (1971), considerando: coloração do micélio, textura, tipo de borda e forma e coloração dos setores.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados para cada meio foram expressos pelas médias das taxas de crescimento das cinco repetições e foram comparados por testes de aleatorização, utilizando o programa MULTIV (PILLAR, 2004).

RESULTADOS

ANÁLISE MORFOLÓGICA

COLORAÇÃO DO MICÉLIO AÉREO

A esporulação fúngica, na maioria dos isolados monoconidiais e policonidiais, iniciou no terceiro dia de cultivo, fato este evidenciado pela coloração escura no local de inóculo. Para as culturas monoconidiais o estabelecimento da coloração do micélio se deu no quinto dia de cultivo. A coloração verde escuro predominou

no meio BDA e os tons de cinza nos meios Sabouraud. O isolado 98003 apresentou coloração mesclada (branco e salmão) no meio BDA. Em todos os meios Sabouraud (dextrose, maltose e galactose), foi mantida a coloração cinza claro. Houve uma variação entre os diferentes isolados, porém nas repetições de um mesmo isolado, em um mesmo meio de cultura a coloração se manteve constante (Figura 1). No que se refere às culturas policonidiais, a variação de cores foi muito maior onde foi observadas cores a partir do verde escuro com várias variações de tonalidades, salmon-claro, salmon mesclado e branco. As variações de coloração do micélio ocorreram entre os isolados nos diferentes meios de cultura e nas repetições de um mesmo isolado, em um mesmo meio de cultura (Figura 2).

MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS

As colônias do fitopatógeno apresentaram as bordas do tipo regular/festonada ou irregular/festonada, sendo esta última a forma predominante em ambas as culturas (monoconidiais e policonidiais). A textura predominante para ambas as culturas foi a algodosa em todos os meios de cultura, seguida de afeltrada/acamurçada.

Setores são zonas de coloração e textura diferenciadas do micélio. Estas zonas iniciam normalmente com a mesma textura do micélio e posteriormente vão se modificando em relação ao restante do micélio colonial quanto à forma, coloração e número. O surgimento de setores pôde ser observado na grande maioria dos isolados a partir do terceiro dia de cultivo.

Nas culturas monoconidiais, os isolados apresentaram, predominantemente, setores algodosos, seguidos dos algodosos/grumosos, em leque e globosos. A coloração branca predominou, seguida de tons branco e salmão. Nas culturas policonidiais os setores na sua maioria eram algodosos, onde também houve um predomínio da coloração branco, seguido das colorações salmão e cinza esverdeado (Figura 3). Avaliando todos os isolados pode-se afirmar que não houve uma grande variação na forma e coloração dos setores nos dois tipos de cultura.

TAXA DE CRESCIMENTO

Nas medidas de taxa de crescimento dos isolados em culturas monoconidiais, considerando-se as médias das medidas das cinco repetições, para cada isolado, as

diferenças nas velocidades de crescimento dos isolados já puderam ser observadas nas primeiras 24 horas após a inoculação. Após 120 horas, a maioria dos isolados apresentou uma taxa média de crescimento maior no meio Sabouraud maltose, seguido dos meios Sabouraud galactose e Sabouraud glicose. A menor taxa de crescimento foi observada no meio BDA (Tabela 2).

O mesmo comportamento quanto ao crescimento foi observado com as culturas policonidias com exceção do isolado 98017 que apresentou crescimento a partir de 48h. Após 120 h de crescimento a maioria dos isolados apresentou uma taxa média de crescimento maior quando cultivado em meio Sabouraud maltose. O meio BDA foi o que apresentou a menor taxa de crescimento (Tabela 2).

Através do teste de aleatorização, utilizando o aplicativo MULTIV (PILLAR, 2004), foi avaliado se havia diferença significativa ($p < 0,05$) entre o crescimento nos diferentes meios de cultivo. Comparando-se a taxa de crescimento das culturas monoconidiais entre os diferentes meios não foi observado diferenças significativas entre os meios de cultura ($p < 0,05$) (Tabela 3). No entanto, ao se avaliar as culturas policonidiais foi possível observar diferenças significativas na taxa de crescimento nos diferentes meios de cultura (Tabela 4). No entanto, quando foi realizada a comparação entre as culturas monoconidiais e policonidiais, com os mesmos meios de culturas, foram observadas diferenças significativas nos meios Sabouraud maltose e Sabouraud galactose (Tabela 5).

DISCUSSÃO

Os isolados podem responder diferentemente os meios de cultura (MÜLLER, 2000) e algumas hipóteses poderiam justificar a resposta diferencial dos isolados à esporulação e taxa de crescimento em meio BDA. Nutrientes podem ser metabolizados com velocidades, levando a síntese de macromoléculas diferenciais, cujos compostos ou produtos podem interagir com o mecanismo de controle para a biossíntese de moléculas. (GRIFFIN, 1993). Isto poderia explicar a baixa atividade do crescimento micelial no meio BDA, uma vez que a glicose presente no meio, normalmente, tem um efeito repressor e inibitório na utilização de outras fontes de carbono. A solanina, presente neste meio poderia estar afetando os processos de digestão, transporte e subsequente metabolização dos demais compostos desse meio, ocasionando o retardo do crescimento do micélio. No entanto, o meio BDA se mostrou

um bom meio de cultura quando se deseja a formação de conídios.

De acordo com os resultados, pode-se sugerir que o meio BDA é o menos indicado, quando o objetivo do trabalho for obtenção de crescimento micelial dentro de um curto espaço de tempo. Neste caso, é indicado utilizar o meio Sabouraud maltose. No entanto, quando o objetivo for análise de estruturas reprodutivas, sugere-se que o meio BDA seja empregado, pois o mesmo permite uma rápida esporulação.

Alguns estudos relataram grande variabilidade na coloração do micélio de culturas policonidiais de *B. sorokiniana*, quando crescidos em meio BDA (CHRISTENSEN, 1925; HARDING, 1984; VIÉGAS et al., 1992; OLIVEIRA, et al., 1998 e VALIM - LABRES, et al., 1997). A variação apresentada por *B. sorokiniana* pode ser atribuída aos diferentes genes presentes em suas células heterocarióticas, que podem se manifestar diferentemente, dependendo da qualidade e quantidade de núcleos contidos nas células, bem como a ação do meio e hospedeiro (SILVA, 1995). Desta forma pode-se inferir que as diferenças significativas observadas na taxa de crescimento dos isolados, em alguns meios de cultura, pode estar associado ao fato dos mesmos serem multinucleados e com isso possuem maiores recursos no metabolismo dos componentes do meio. As culturas monoconidiais foram utilizadas com o intuito de reduzir o possível efeito da heterocariose, já que um único conídio poderia ser homocariótico ou apresentar uma variabilidade reduzida facilitando desta forma a identificação morfológica do fitopatógeno.

As bordas de *H. sativum* em BDA foram descritas como regulares e irregulares, sendo esta última a mais comum (CHRISTENSEN, 1925). Também foram observadas bordas ondeadas, ciliadas e lisas, prevalecendo as com as texturas algodonosa/acamurçada e algodonosa/afeltrada, em 30 isolados de *B. sorokiniana* estudados por MATSUMURA (1991). Em estudo com 10 isolados de *B. sorokiniana*, foram observadas bordas do tipo ondeada-irregular afeltrada e ciliadas prostradas em dois isolados, e bordas ondeadas-regulares afeltradas nos demais, mostrando, desta forma, a grande variabilidade morfológica destes isolados, mesmo quando inoculados em um mesmo meio de cultura (VALIM-LABRES et al., 1997).

CHRISTENSEN (1925) estudando 37 isolados monoconidiais de *H. sativum* verificou que 18 deles formaram setores em meio BDA, os quais diferiam da colônia parental quanto a

morfologia e patogenicidade. Em novo experimento o autor utilizou o mesmo fungo e foi estabelecida uma relação com a formação de setores que era a temperatura utilizada para seu cultivo, sendo que temperaturas de 25 a 27°C se mostraram as mais propícias para formação de setores (CHRISTENSEN, 1929). VIÉGAS (1989) por outro lado estudando 60 isolados de *B.sorokiniana*, relatou que o aparecimento de setores poderia estar relacionado com o envelhecimento da colônia fúngica.

Em trabalhos realizados em nosso laboratório, utilizando-se somente os setores, oriundos de culturas policonidiais observaram que estes apresentaram uma maior taxa de crescimento em Sabouraud maltose seguido de Sabouraud galactose, Sabouraud glicose e BDA. E, da mesma maneira, novos setores foram observados a partir daqueles que estavam sendo cultivados, nos diferentes meios de cultura, não mostrando uma prevalência na formação dos novos setores nos diferentes meios de cultura. O aparecimento e desenvolvimento dos mesmos são independentes do desenvolvimento mais rápido ou não da colônia fúngica, sugerindo também que não estão relacionados com o envelhecimento da colônia, pois, os mesmos aparecem muito cedo no desenvolvimento da colônia fúngica, por outro lado o meio de cultura também não interferiu na formação dos mesmos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao governo brasileiro pelo apoio com as bolsas através do Programa CAPES/PROF, bem como ao programa interno de bolsas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

- [1] BETTUCCI, L. & GUERRERO, R.T. Hongos xilófagos: estudo de cultivos. **Boletim Facultad de Agronomia**, Montevideo, 1971. p.1-39.
- [2] BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores Agropecuários 1996-2003**. IBGE, 2005. <http://www.ibge.gov.br/>.
- [3] CHRISTENSEN, J.J. Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum*. **Phytopatology**, St. Paul, v. 15, p. 785-795, 1925.
- [4] CHRISTENSEN, J.J. The influence of temperature on the frequency of mutation in *Helminthosporium sativum*. **Phytopatology**, St. Paul, v.19, p.152-155, 1929.
- [5] HARDING, H. Spore-color mutants of *Bipolaris sorokiniana*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.6, p.273-279, 1984.
- [6] GHINI, R. & KIMARTI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Brasília: Embrapa, 2002. p. 65-66.
- [7] GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 458p.
- [8] GUSEVA, N.N.; LEVITIN, M.M.; MIKHAILOVA, L.A. Genetic mechanisms of variability in phytopathogenic fungi. **Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v.14, p.441-447, 1979.
- [9] KUMAR, J.; SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; LANGEN, G.; BALTUSCHAT, H.; STEIN, E.; SUBRAMANIAN, N.; KOGEL, K.H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.3, p. 185-195, 2002.
- [10] MATSUMURA, A.T.S. **Variabilidade intraespecífica quanto a patogenicidade, características de cultura e padrão isoenzimático em populações naturais de *Bipolaris sorokiniana* (*helminthosporium sativum*)**. 1991. 262 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- [11] MÜLLER, M.V.G. **O estudo da variabilidade morfológica e o uso de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) na caracterização de isolados de *Bipolaris sorokiniana***. 2000. 135f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- [12] OLIVEIRA, A.M.R.; PRESTES, A.; MATSUMURA, A. T. S.; VAN DER SAND, S.T. Variabilidade patogênica e morfológica em isolados de *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p. 349-353, 1998.
- [13] PILLAR, V. D. **MULTIV: Multivariate Exploratory Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling. User's Guide v. 2.3.10**. Departamento de Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. 2004.
- [14] PRESTES, A.M. Transmissão de *Septoria nodorum* das sementes para órgãos aéreos do trigo. In: Reunião Nacional de Pesquisa do Trigo, Londrina. **Resultados de Pesquisa**. Passo Fundo: Embrapa – CNPT, 1986.
- [15] REIS, E.M. Levantamento de plantas cultivadas, nativas e invasoras hospedeiras de

fungos causadores de podridões radiculares em cereais de inverno e em outras culturas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.8, p.134-140, 1982.

[16] REIS, E.M. **Patologia de sementes de inverno**. São Paulo: CNDA, 1987. 32 p.

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

[18] SILVA, M.E. **Diversidade fenotípica de colônias policônicas, monoconídias e de pontas de hifa de *Bipolaris sorokiniana***. 1995. 148 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

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

[21] VIÉGAS, J. **Variabilidade da morfologia, crescimento e fertilidade de isolados brasileiros de *Cochliobolus sativus* (ITO & KURIB) DRECHSLER DASTUR**. 1989. 222p Tese (Doutorado em agronomia – Genética e Melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agronomia “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

[22] VIÉGAS, J.; CZERMAINSKI, A. B.; GOMES-OLIVEIRA, I. V.; AZEVEDO, J. L. Variabilidade morfológica de isolados de *Cochliobolus sativus*. IN: XXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia/ **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p. 204, 1992.

Tabela 1. Isolados utilizados nos experimentos e origem geográfica dos mesmos.

Código do Isolado	Procedência
98003	Pelotas – RS
98004	Cruz Alta – RS
98006	Pelotas – RS
98012	Lagoa Vermelha – RS
98014	Lagoa Vermelha – RS
98017	Samambaia – PR
98018	Vitória – PR
98022	Selbach – RS
98030	Cruz Alta – RS
98033	Landoi – PR
98007	Cruz Alta – RS
98021	Vitória – PR
98023	Vitória – PR
98026	Piratini – RS
98029	Piratini – RS
98031	Nova Estância – PR
98032	Eng. Beltrão – PR
98040	Piratini – PR
98041	Vitória – PR
CEV 53	Guarapuava – PR
Mex 02	Guardalajara – México

Tabela 2. Média da taxa de crescimento das cinco repetições dos isolados policonidiais e monoconidiais de *B.sorokiniana*, após 120 horas de cultivo, nos meios BDA, Sabouraud maltose, Sabouraud glicose e Sabouraud galactose.

Meios de cultura	BDA	Maltose	Glicose	Galactose	BDA	Maltose	Glicose	Galactose
Isolados	Culturas Policonidiais				Culturas Monoconidiais			
98003	2,3	7,0	6,2	6,8	6,6	6,9	4,8	5,1
98004	4,7	6,1	4,4	4,8	5,3	4,2	5,1	5,1
98006	3,3	6,2	5,4	5,6	6,9	6,7	6,0	5,6
98012	3,8	5,4	4,4	4,8	3,0	2,9	2,6	2,7
98014	6,3	6,6	5,7	5,7	3,1	3,5	3,3	3,2
98017	7,0	6,2	6,3	6,6	6,9	5,4	6,0	6,2
98018	4,1	4,6	3,9	4,8	3,2	4,5	3,6	3,2
98022	4,6	5,2	3,9	4,0	4,9	5,2	5,4	5,1
98030	4,4	6,8	6,7	6,6	5,4	5,6	5,3	5,1
98033	4,8	5,6	4,7	4,6	4,1	4,6	3,9	4,2
98007	6,0	5,9	4,7	5,5	5,6	7,0	4,8	5,0
98021	3,9	5,9	4,7	5,5	4,0	5,0	4,5	5,3
98023	4,7	5,4	3,91	4,5	5,1	6,4	6,1	7,0
98026	4,76	5,7	5,41	5,2	4,7	5,7	4,8	4,9
98029	3,9	5,4	4,88	5,5	4,9	5,4	5,7	5,4
98031	6,6	6,5	4,82	5,4	5,1	6,5	6,2	5,9
98032	6,3	6,4	4,87	6,0	6,6	4,9	6,1	5,3
98040	4,8	5,8	4,97	6,1	3,7	4,3	4,3	3,9
98041	6,4	5,1	4,24	5,0	3,2	3,4	2,9	3,2
Cev53	5,7	6,1	4,8	5,5	4,84	4,94	4,36	5,25
Mex02	6,0	6,5	5,7	6,3	6,37	6,54	6,5	6,28

Tabela 3. Comparação das taxas de crescimento entre os diferentes meios de cultivo nas culturas monoconidiais, mostrando os valores de significância encontrados no teste de aleatorização.

Meios de cultivo	Valores de significância
BDA x S. MAL	0,438
BDA x S. GLIC	0,864
BDA x S. GAL	0,937
S. MAL x S. GLIC	0,327
S. MAL x S. GAL	0,353
S. GLIC x S. GAL	0,948

Tabela 4. Comparação das taxas de crescimento entre os diferentes meios de cultivo nas culturas policonidiais, mostrando os valores de significância encontrados no teste de aleatorização.

Meios de cultivo	Valores de significância
BDA x S. MAL	0.007
BDA x S. GLIC	0.968
BDA x S. GAL	0.103
S. MAL x S. GLIC	0.001
S. MAL x S. GAL	0.035
GLIC x GAL	0.051

Tabela 5. Comparação das taxas de crescimento entre as culturas monoconidiais e policonidiais em um mesmo meio de cultivo, apresentando os valores encontrados no teste de aleatorização.

Meios de cultivo	Valores de significância (P<0,05)
BDA x BDA	0.919
S. MAL x S. MAL	0.025
S. GAL x S. GAL	0.049
S. GLIC x S. GLIC	0.714

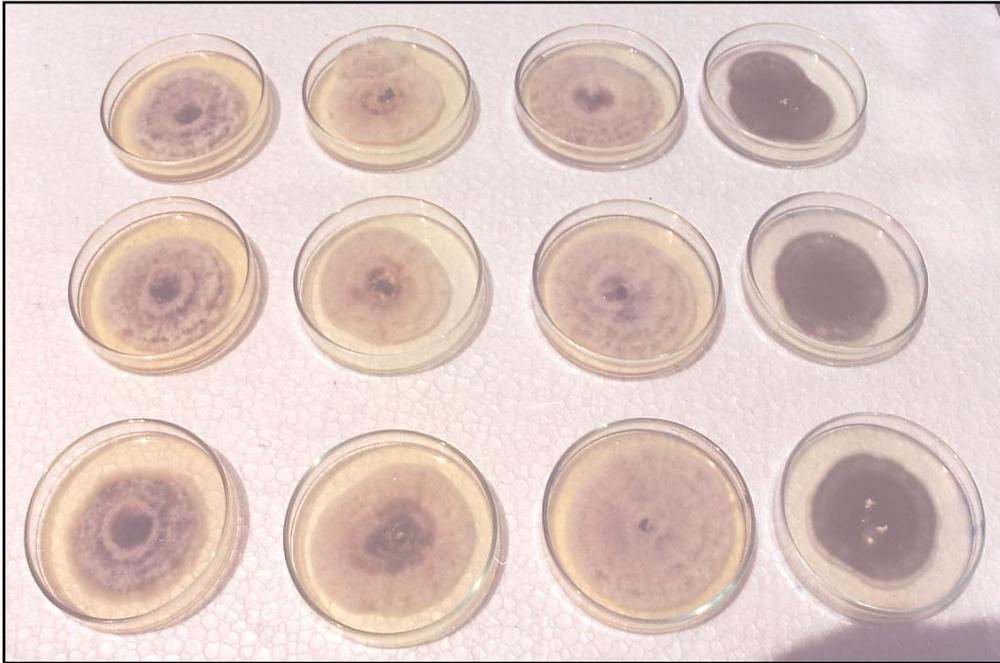


Figura 1. Isolado 98029 monoconidial. Observam-se três repetições nos quatro meios utilizados. Da esquerda para a direita, os meios: Sabouraud galactose, Sabouraud glicose, Sabouraud maltose e BDA.

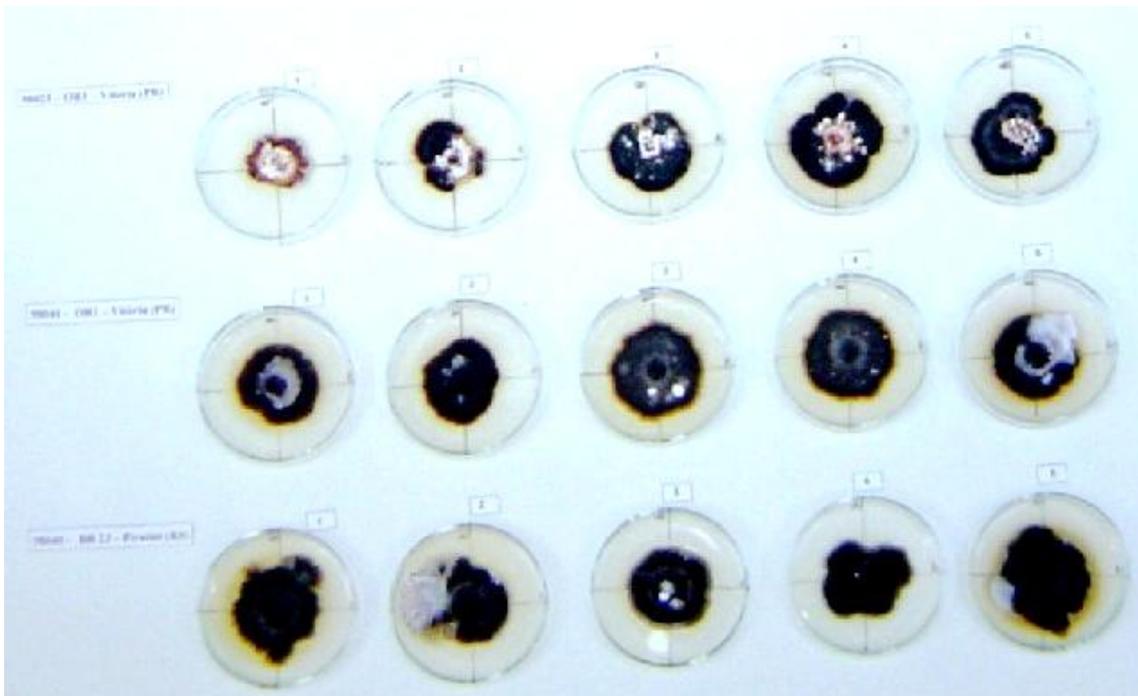
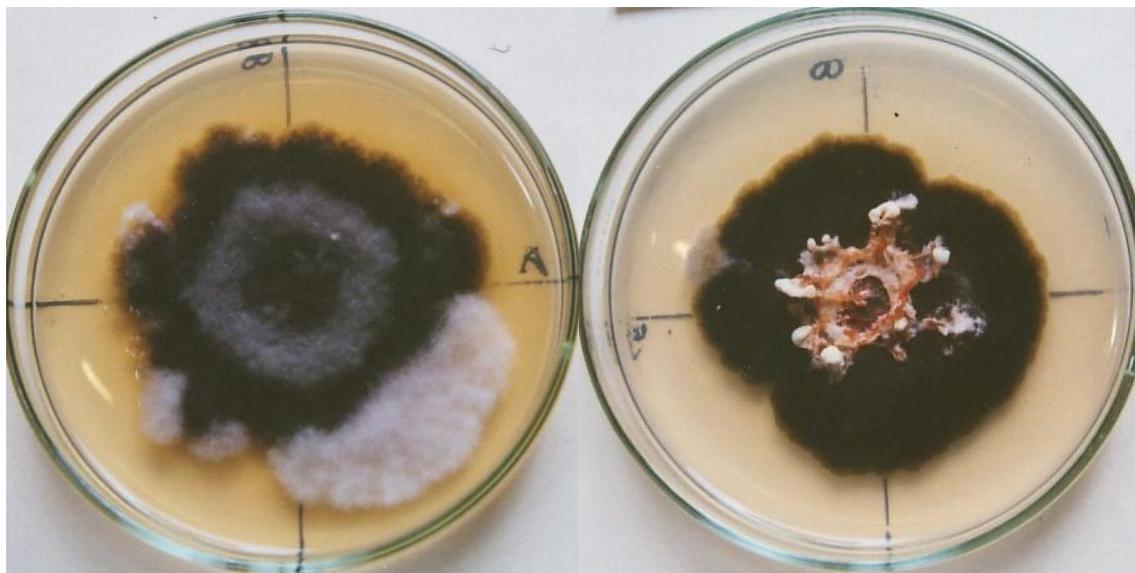


Figura 2 - Aspectos morfológicos das colônias 98023, 98041 e 98040, crescidas em meio BDA (14º dia de cultivo) onde se observa a diferenciação de um mesmo isolado nas repetições deste



A – Isolado 98043

B - Isolado 98023

Figura 3. A) Isolado 98043 com um setor branco, algodinoso e em forma de leque. B) Isolado 98023 com setores brancos e salmão algodinosos/grumosos e grumosos. Isolados de culturas policonidiais.