



## Caracterização genética e fenotípica de isolados de *Pyricularia grisea* do trigo

Maria Fernanda A. Cruz<sup>1</sup>, João L.N. Maciel<sup>2</sup>, Ariano M. Prestes<sup>1</sup>, Estevon A.S. Bombonato<sup>3</sup>, Jorge F. Pereira<sup>2</sup> & Luciano Consoli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, 99001-970, Passo Fundo, RS, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Trigo, 99001-970, Passo Fundo, RS, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Luterana do Brasil, 99500-000, Carazinho, RS, Brasil

Autor para correspondência: João L.N. Maciel, e-mail: jmaciel@cnpt.embrapa.br

### RESUMO

O uso de ferramentas moleculares e avaliações da virulência de *Pyricularia grisea*, agente causal da brusone do arroz e do trigo, têm permitido identificar variantes do patógeno, especialmente aqueles que ocorrem na cultura do arroz. Nesse sentido, os marcadores microssatélites já demonstraram que são eficientes para classificar isolados de *P. grisea* em grupos geneticamente relacionados. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar a diversidade genética de 18 isolados de *P. grisea* do trigo com o auxílio de oito primers de microssatélites e relacionar os dados da análise molecular com os dados do espectro de virulência desses isolados, inoculados em plantas jovens de 70 genótipos de trigo. Dos 8 loci analisados, o primer mais informativo foi PG 5, que apresentou 4 alelos. Além disso, os primers MG 21 e PG 12 permitiram separar os isolados Py 5020 e Py 5038 em um grupo bastante distinto, com menos de 50% de similaridade em relação aos demais isolados. A maioria dos isolados (16) apresentou mais de 75% de similaridade entre si. Na análise de virulência, 15 dos 18 isolados testados apresentaram mais de 85% de similaridade entre si. Com exceção do isolado Py 5002, o agrupamento dos isolados de acordo com o grau de similaridade que os mesmos apresentaram entre si foi muito semelhante nos dois critérios utilizados nesta pesquisa. O fato de não ter sido encontrado um genótipo que fosse resistente a todos os isolados confirma a necessidade de se buscar novas fontes ou melhores combinações genética de genótipos de trigo mais resistentes à doença.

**Palavras-chave:** marcadores moleculares, alelo, resistência, brusone.

### ABSTRACT

#### Molecular pattern and virulence of *Pyricularia grisea* isolates from wheat

The use of molecular tools and virulence evaluations of *Pyricularia grisea*, the causal agent of rice and wheat blast, has permitted identification of strains of the pathogen, especially those occurring in the rice crop. Microsatellites have already demonstrated efficiency to classify *P. grisea* isolates by genetic similarity groups. The objectives of this work were to characterize the genetic diversity of 18 isolates of *P. grisea* collected from wheat by applying 8 microsatellite primers; and to compare the molecular and virulence results of isolates, when inoculated in seedlings of 70 wheat genotypes. The most informative primer was PG 5 with 4 alleles. The primers MG 21 and PG 12 permitted separation of Py 5020 and Py 5038 in distinct groups, with less than 50% similarity in relation to others. The genetic similarity of isolates presented more than 75% similarity among them. In the virulence analysis, 15 out of 18 tested isolates showed more than 85% of similarity. The molecular pattern and virulence were similar for the isolates, except for Py 5002 isolate. The absence of resistance to all isolates confirms the need to seek new sources or better genetic combinations of wheat that are more resistant to disease.

**Keywords:** microsatellite markers, allele, plant disease resistance, rice blast.

### INTRODUÇÃO

A brusone do trigo causada pelo fungo *Pyricularia grisea* Sacc., cuja fase teleomorfa corresponde a *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr, representa uma séria ameaça à triticultura brasileira desde o seu aparecimento nas lavouras brasileiras, em meados da última

década de 80 (Igarashi et al., 1986). A doença causa elevados danos na cultura do trigo (*Triticum aestivum*) principalmente nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo e Goiás (Igarashi et al., 1986; Goulart & Paiva, 1992; Anjos et al., 1996; Goulart & Paiva, 2000). A maioria das observações sobre os danos que a doença provoca na cultura do trigo foi realizada durante a década de 90. Dados obtidos no Mato Grosso do Sul, entre os anos de 1991 e 1992, demonstraram que a brusone do trigo causou uma redução 51% no rendimento de grãos (Goulart & Paiva, 2000).

Parte da Dissertação do primeiro autor. Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo RS. 2008.

Nas espigas, é observado o sintoma mais conhecido da brusone, que é o branqueamento e morte acima do ponto de infecção, além do escurecimento do ráquis (Igarashi, 1988). Quando há produção de grãos nessas espigas, os mesmos são enrugados, pequenos, deformados e com baixo peso específico. Apesar de menos freqüentes, também podem ocorrer sintomas da brusone nas folhas, os quais são representados por manchas, geralmente elípticas ou arredondadas, com margem marrom escura e centro acinzentado. As fontes de inóculo da doença são os hospedeiros secundários e os restos culturais de plantas cultivadas. O fungo também pode sobreviver em sementes infectadas. Os conídios são liberados dos substratos na fase saprofítica, sendo considerados leves e por isso podem atingir longas distâncias ao serem transportados pelo vento (Reis & Forcelini, 1995). As condições favoráveis à doença são: precipitação, temperaturas entre 24 e 28°C, dias nublados e alta umidade relativa do ar.

A baixa eficiência que a aplicação de fungicidas na parte aérea tem demonstrado para controlar a brusone, associada a sua ampla distribuição pelo País, torna ainda mais grave o problema da doença no Brasil (Goulart & Paiva, 1993; Urashima, 1999). Além disso, embora o uso de cultivares resistentes seja a alternativa mais viável economicamente para controlar a doença, a disponibilidade de cultivares com essa característica é praticamente inexistente (Igarashi, 1990; Urashima & Kato, 1994). Assim, a geração de cultivares com resistência à brusone é uma etapa fundamental no processo de redução dos problemas causados por essa doença Brasil. No entanto, para que as cultivares geradas apresentem níveis adequados e duradouros de resistência, é necessário que fatores relacionados à reação das plantas à infecção do patógeno sejam identificados e monitorados. Entre tais fatores, um dos mais relevantes refere-se ao nível de complexidade genética da população do patógeno ocorrentes nas lavouras de trigo do Brasil, cujo esclarecimento é particularmente importante quando se vislumbra a possibilidade de se relacionar eventuais grupos de variantes genéticos de *P. grisea* com grupos de patótipos estabelecidos pela reação de genótipos de trigo. Urashima et al. (2005), baseando-se em diferenças das características sexuais e *fingerprinting* de DNA do patógeno, descreveram a existência de duas populações de *P. grisea* do trigo no Brasil.

Trabalhos que tratam da possível fonte de variabilidade de *P. grisea* na cultura do trigo têm abordado a possível influência que a recombinação sexual pode exercer sobre a variabilidade do patógeno (Urashima, 1993; Bruno & Urashima, 2001; Urashima et al., 2005). O que já se propôs é que plantas das espécies *Brachiaria plantaginea* e *Setaria geniculata* influenciam a ocorrência da brusone na cultura do trigo e, em especial, a variabilidade de *P. grisea* do trigo. Esta proposição pôde ser sugerida em função do sucesso da inoculação cruzada feita entre isolados de *P. grisea* obtidos de trigo e das duas espécies de plantas daninhas mencionadas acima (Bruno & Urashima, 2001).

Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que isolados obtidos de *B. plantaginea* e *S. geniculata* podem produzir estruturas reprodutivas (peritécios) quando submetidos aos cruzamentos com isolados do trigo. Estes resultados são importantes porque indicam a possibilidade de ocorrência de recombinação sexual natural entre *P. grisea* das duas plantas daninhas e de trigo e, em consequência, da origem à variabilidade genética do patógeno na cultura do trigo.

Dentre os marcadores moleculares empregados para avaliação da variabilidade genética entre isolados de *P. grisea* do trigo estão: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (Busso, 2005), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Urashima et al. 2005; 2007) e SSR (*Simple Sequence Repeats*), este último também conhecido como microssatélites (Brondani et al., 2000; Garrido, 2001). Entre essas alternativas, os marcadores microssatélites merecem destaque pela eficiência em detectar polimorfismo entre espécies e dentro espécies. Nesse sentido, Brondani et al. (2000) e Garrido (2001) verificaram que o polimorfismo gerado pelos marcadores microssatélites foi mais elucidativo para caracterizar a variabilidade de *P. grisea* do arroz do que marcadores baseados nas seqüências MGR-586 e *Pot-2*. A expectativa é a de que para estudos de população de *P. grisea* obtidos de outros hospedeiros como o trigo, por exemplo, o nível de eficiência dos marcadores microssatélites também seja superior. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar a variabilidade genética de isolados de *P. grisea* do trigo originários de quatro estados brasileiros através do uso de marcadores moleculares microssatélites, e relacionar o padrão molecular obtido com a reação promovida por esses isolados quando utilizados em procedimentos de inoculação de genótipos de trigo na fase de planta jovem.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento monospórico e preservação

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fitopatologia e de Biologia Molecular da Embrapa Trigo, em Passo Fundo, RS. Utilizou-se 18 isolados monospóricos de *P. grisea* de trigo, obtidos de amostras de plantas com sintomas de brusone, provenientes dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais e Goiás (Tabela 1). Para a obtenção de isolados monospóricos foram utilizados folhas, ráquis e glumas de trigo com sintomas de brusone. Realizou-se a assepsia do material, que permaneceu em câmara úmida por 24 h. Em seguida, com o auxílio de uma lupa procedeu-se o isolamento dos conídios. Os conídios foram transferidos para o meio ágar-água e, após 15 h, apenas os conídios germinados foram transferidos para o meio aveia-ágar até o desenvolvimento da colônia.

A preservação dos isolados foi realizada através do preenchimento de placas de Petri, contendo meio aveia-ágar, com pedaços de papel filtro (1x1 cm). Segmentos do micélio das colônias do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura e pedaços de papel filtro. As placas permaneceram em câmara de crescimento por 10

**TABELA 1** - Relação de isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizados no experimento

N <sub>o</sub>	Designação	Origem	Cultivar	Segmento da Planta*	Ano
1	Py 5001	São Borja - RS	BRS Angico	Ráquis	2005
2	Py 5002	São Borja - RS	BRS Angico	Ráquis	2005
3	Py 5005	Londrina - PR	BRS 248	Ráquis	2005
4	Py 5012	Londrina - PR	BRS 229	Ráquis	2005
5	Py 5017	Londrina - PR	BRS 193	Ráquis	2005
6	Py 5020	Londrina - PR	BR 18	Ráquis	2005
7	Py 5021	Londrina - PR	BR 18	Ráquis	2005
8	Py 5025	Londrina - PR	BRS 249	Ráquis	2005
9	Py 5029	Londrina - PR	CD 105	Ráquis	2005
10	Py 5038	Londrina - PR	BRS 220	Ráquis	2005
11	Py 5039	Londrina - PR	BRS 208	Ráquis	2005
12	Py 6001	Coromandel - MG	BRS 208	Folha	2006
13	Py 6008	Coromandel - MG	BRS 208	Folha	2006
14	Py 6010	Coromandel - MG	BRS 208	Folha	2006
15	Py 6012	Coromandel - MG	BRS 208	Gluma	2006
16	Py 6018	Coromandel - MG	BRS 208	Ráquis	2006
17	Py 6025	Coromandel - MG	BRS 208	Folha	2006
18	Py 6030	Goiânia - GO	BRS 208	Ráquis	2006

\* Parte da planta de onde o isolado foi obtido.

dias, à temperatura de 23±2°C, e fotoperíodo 12 h. Uma vez que a colônia já estava crescida sobre toda a superfície da placa, os pedaços de papel filtro foram transferidos para uma placa de Petri vazia e permaneceram 4 dias em câmara de crescimento. Posteriormente foram transferidos para envelopes de papel, previamente autoclavados e acondicionados a temperatura de -20°C.

#### Seqüenciamento e análise das amplificações

Os isolados foram crescidos em Erlenmeyers com 70 mL de meio líquido completo (Pontecorvo et al. 1953, modificado por Azevedo & Costa, 1973) e incubados por cinco dias a 25°C, sob agitação de 130 RPMs. Em seguida a massa micelial de cada isolado foi filtrada, congelada em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior da extração do DNA. A extração do DNA seguiu o protocolo de Specht et al. (1982), com as seguintes modificações: isolados do fungo cresceram em placas de Petri com meio de aveia-ágar e não em meio líquido; o micélio do fungo não foi liofilizado e não se utilizou tolueno no tampão de extração. O DNA dos isolados foi amplificado utilizando os *primers* MG 1 e MG 21, desenvolvidos por Brondani et al. (2000) e os *primers* PG 3, PG 5, PG 12, PG 20, PG 15, PG 21, desenvolvidos por Garrido (2001). Inicialmente foram estabelecidas condições otimizadas para as reações de PCR utilizando termociclador PTC-100 (Peltier Thermal Cycler). Depois disso, as seqüências *Forward* de cada par de *primer* receberam uma cauda com a seqüência complementar reversa do *primer* M13 para que posteriormente, as reações de PCR fossem acrescidas do M13 marcado com fluoróforo e seus produtos discriminados no seqüenciador. Para a

genotipagem dos isolados de *P. grisea* em seqüenciador automático o *mix* de cada reação otimizada foi diminuído de 1 µL no volume de água para o acréscimo de 1 µL do *primer* M13F1 ou M13F2 (marcado com 6-FAM ou NED); e o *primer* F foi utilizado na concentração de 0,5 µM (diluição 1:10) ao invés da concentração de 5 µM. O programa para as reações de PCR que foram submetidas ao seqüenciador foi o seguinte: 94°C / 3 min, 30 ciclos de 94°C / 30 s, 60°C / 30 s, 72°C / 30 s, extensão final de 72°C / 3 min, e 4°C. Após a amplificação, as reações de PCR foram diluídas com água milli-Q na proporção de 1:40, considerando-se o seguinte protocolo: i. 5 µL de duas reações de PCR foram misturados (uma das reações era feita com o oligonucleotídeo M13-6FAM e outra com M13-NED); ii. 5 µL da mistura foi diluído em 95 µL de água milli-Q; e iii. 3 µL da diluição foram misturados a 6,8 µL de Formamida Hi-Di e 0,2 µL do marcador LIZ500. As amostras foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 5 minutos e colocadas imediatamente em banho de gelo. A eletroforese e a detecção dos fragmentos de PCR marcados foram feitas no seqüenciador ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) e a análise dos fragmentos no programa GeneMapper™ v3.5.

#### Testes de virulência

A determinação do espectro de virulência dos 18 isolados utilizados no experimento foi determinada através da observação da reação de 70 genótipos de trigo (Tabela 2) quando submetidos à inoculação com estes isolados no estádio 14 da escala de Zadoks et al. (1974). Dos 70 genótipos testados, 50 eram cultivares comerciais de trigo

TABELA 2 - Padrão de virulência de *Pyricularia grisea* baseado na reação de genótipos de trigo

Genótipos	Isolados													Py 6008	Py 6001	Py 5002		
	Py 5001	Py 5005	Py 5025	Py 5029	Py 5039	Py 6010	Py 5012	Py 6025	Py 6030	Py 6018	Py 6012	Py 5020	Py 5017				Py 5021	Py 5038
NE 20156-B*	S**	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R
NE 20157-X*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
NE 20160-C*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
PF 844001*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R
PF 844002*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R
PF 964009*	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
PF 804001*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R
PF 804002*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
NE 20158-X*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
NE 20159-B*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
NE 20159-C*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NE 20159-X*	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
NE 20159-Z*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
NE 20160-A*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NE 20160-B*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NE 20160-Y*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
NE 20160-Z*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IPF 71404*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R
SINTÉTICO*01	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
NE 20168 -P*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
ANAHUAC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
BH 1146	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
BR 12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
BR 14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
BR 18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
BR 23	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
BR 33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
BR 35	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
CEP 14	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
CEP 19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
CEP 24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
CNT 8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R
CNT 10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
EMBRAPA 16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
EMBRAPA 27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R
EMBRAPA 40	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
FRONTANA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
IAC 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IAC 24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
IAPAR 6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
IAS 54	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
JACUÍ	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KLEIN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
LA 1549	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
OCEPAR 16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
PELADINHO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
PG 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
TOROPI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
OR 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NOBRE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
ALIANÇA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
BRS 120	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R
BRS 177	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
BRS 179	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R
BRS 194	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
BRS 208	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
BRS 209	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
BRS 210	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
BRS 220	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
BRS 229	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R
BURITI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R
CAMBOATÁ	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GUABIJU	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
LOURO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
TIMBAÚVA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
BRILHANTE	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
IAPAR 53	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
IPR 85	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
PF 001102	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
BRS 49	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R
Patotipo	1	1	1	1	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

\* Genótipos de trigo sintético. \*\*R e S significam resistente e suscetível, respectivamente.

hexaplóide e 20 de trigo hexaplóide sintético, resultante do cruzamento entre *Triticum durum* e *Aegilops squarrosa*. O critério adotado para definição dos cultivares utilizados no experimento baseou-se no princípio de que os mesmos deveriam representar o conjunto de cultivares de trigo utilizado pelos produtores de trigo do Brasil nos últimos 40 anos. Os trigos sintéticos utilizados foram os que estavam disponíveis no Banco de Germoplasma da Embrapa Trigo. A decisão de avaliar a resistência à brusone dos trigos sintéticos se deve à possível resistência a esta doença atribuída à espécie *A. squarrosa* (Urashima & Kato, 1994), um dos progenitores desses genótipos testados. As plantas foram cultivadas em vasos de plástico com capacidade de 500 mL, preenchidos com solo de lavoura misturado com adubo NPK, fórmula 5-25-25, na dose de 250 g/t. O número de plantas em cada vaso variou de 10 a 15, mas o número de plantas avaliadas foi oito.

A produção de esporos foi realizada da seguinte forma. Os isolados, mantidos em papel-filtro, foram transferidos para placas de Petri com meio de aveia-ágar, e permaneceram em câmara de crescimento à temperatura de 23 a 25°C por 12 dias. Para preparação do inóculo, as placas foram lavadas com água destilada acrescida de espalhante adesivo Tween 80 (2 gotas/L). O volume de suspensão para cada inoculação em planta jovem foi de 500 mL e para planta adulta, 300 mL, numa concentração de  $2 \times 10^5$  conídios/mL. O volume de suspensão para inoculação de cada um dos 18 isolados foi de 500 mL, numa concentração de  $2 \times 10^5$  conídios/mL. Antes da inoculação, as plantas foram climatizadas por 24 h, a 24°C. Após a inoculação as plantas foram incubadas por 24 horas em escuro total, numa temperatura de 24°C sob nebulização de 120s em intervalos de 60s. Após 24 h, o fotoperíodo foi ajustado para 12h de luz e a nebulização para 60s, a cada 1800 s. As plantas permaneceram por cinco dias nesta condição, até serem avaliadas. Foram avaliadas oito plantas em cada um dos três vasos que foram utilizados no experimento. O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo que o experimento foi conduzido duas vezes.

A reação à doença, no estágio de planta jovem foi avaliada cinco dias após a inoculação, de acordo com a escala diagramática descrita por Urashima et al. (2004). Nessa escala são considerados quatro tipos de infecção, representados por notas que variam de 0 a 4. Zero significa ausência de infecção; 1 (um), lesões escuras, pequeníssimas, denominadas de “cabeça de alfinete”; 2 (dois) pequenas lesões, maiores que as do tipo 1, com coloração marrom a preta, sem o centro distinguível; 3 (três), lesões arredondadas denominadas como “mancha ocular”, com o centro cinza e, 4 (quatro), lesões típicas de suscetibilidade, elípticas e com centro cinza. Quando, pelo menos, dois dos três vasos de um determinado genótipo apresentavam mais de 50% de plantas com notas 0, 1 e 2, atribuiu-se o valor 0 e a condição de resistente (R) a esse genótipo (Urashima et al., 1993). Em caso contrário, quando as reações correspondentes às infecções 3 e 4 superavam o limite acima mencionado, o

genótipo foi considerado suscetível (S), além de ter recebido o valor 1.

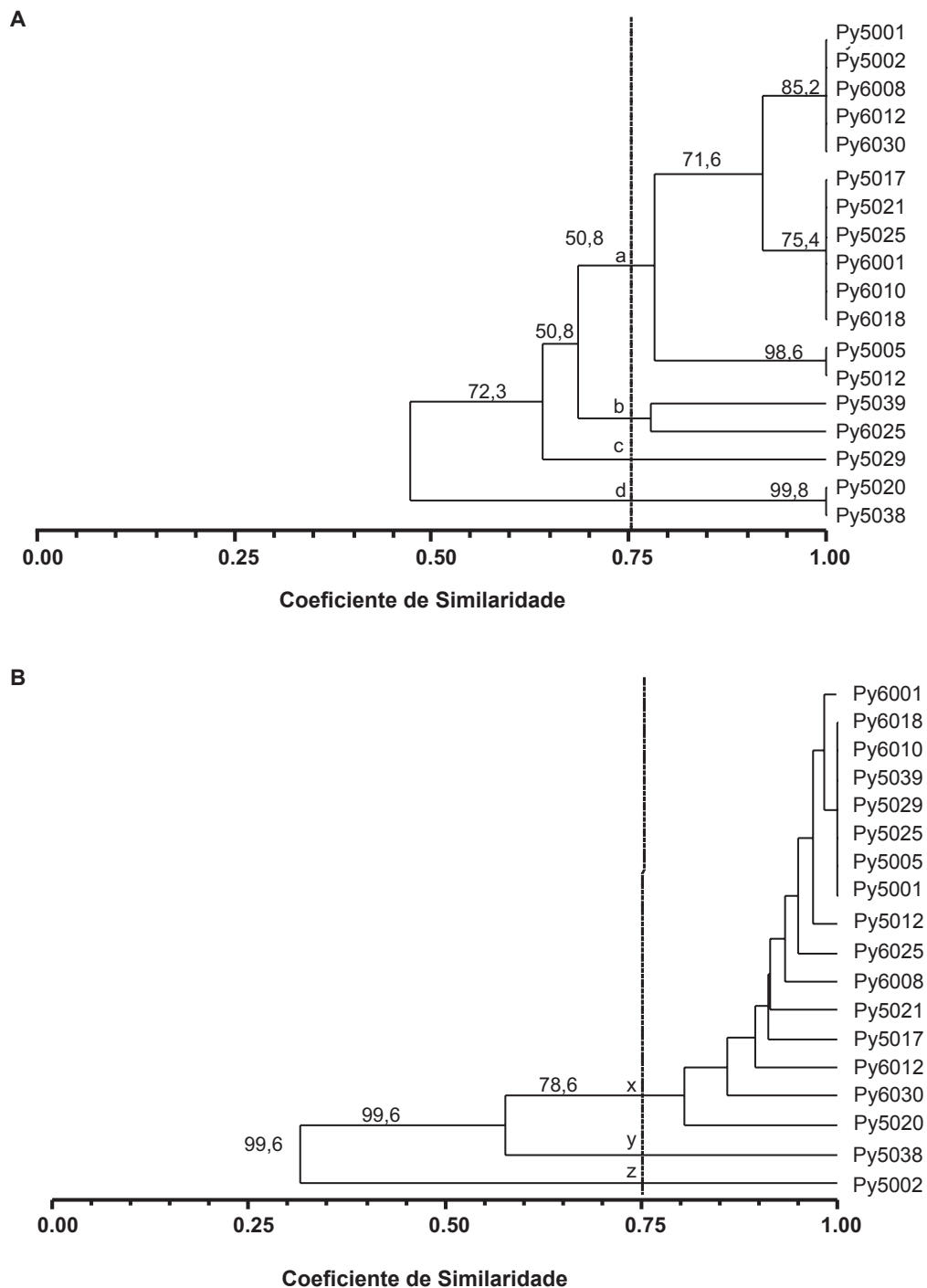
### Análise dos dados

Os dados de polimorfismo de DNA dos isolados do fungo detectados via marcadores microsatélites e os resultados da reação das plantas jovens de trigo submetidas à inoculação com os mesmos isolados monospóricos foram analisados empregando-se a estimativa de similaridade genética entre os isolados. Desta forma foi necessária a construção de uma matriz de similaridade contendo dados binários para cada *primer*. Atribuiu-se o valor zero para ausência do alelo e valor 1 para presença do alelo. A ausência de amplificação de fragmentos por um isolado foi considerada como alelo nulo, e dados de isolados que amplificaram fragmentos em gel de agarose, mas não apresentaram a amplificação no seqüenciador foram considerados como dado perdido. A partir da matriz de similaridade genética foi possível gerar um dendrograma com base na análise molecular.

Procedimento semelhante foi utilizado para análise estatística da reação das plantas jovens de trigo submetidas à inoculação. Construiu-se uma matriz binária, na qual substituiu-se os valores das reações R e S pelos dígitos 0 e 1, respectivamente. A partir dessa matriz binária foi possível gerar um segundo dendrograma. O programa estatístico NTSys 2.02 foi utilizado para a construção das matrizes de similaridade e do dendrograma, os quais foram estabelecidos pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, respectivamente (Rohlf, 1997; Filippi & Prabhu 2001; Meyer, 2002). O grau de consistência dos dendrogramas foi avaliado usando programa estatístico WINBOOT (Yap & Nelson, 1996). As matrizes binárias originais foram *bootstrapped* 1.000 vezes para gerar as matrizes variantes, as quais foram reavaliadas para gerar os dendrogramas e cujos valores de *bootstrap* aparecem nos nós (Figura 1A-B).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do DNA dos isolados permitiu verificar a formação de fragmentos de DNA polimórficos e monomórficos (Tabela 3). O *primer* PG 3 apresentou dois *loci*, em um deles foi possível amplificar um fragmento de 113 pb comum a todos os isolados e, no segundo, foram produzidos fragmentos de 126 e 127 pb. Este é o motivo pelo qual este *primer* (PG 3) aparece na Tabela 3 como PG 3a e PG 3b. Além disso, considerando todos os isolados utilizados no experimento, os únicos *primers* monomórficos foram o PG 3a, o PG 15 e o PG 20. O *primer* mais polimórfico foi o PG 5, o único que permitiu a diferenciação dos isolados do Rio Grande do Sul em relação aos demais. Esse *primer* apresentou 4 padrões de fragmentos (197, 195, 185, 183 pb). Os *primers* MG 21, PG 5 e PG 12 foram capazes de diferenciar os isolados Py 5020 e Py 5038 dos demais isolados. O isolado Py 5029 foi o único que gerou



**FIGURA 1-** A. Dendrogramas baseados no perfil de amplificação do DNA 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizando 8 primers microssatélites e, B. na reação de 70 genótipos de trigo submetidos à inoculação no estágio de planta jovem com os mesmos isolados.

bandas de 197 e 235 pb, quando submetido à amplificação com os *primers* PG 5 e PG 21, respectivamente. Os *loci* MG 1, MG 21, PG 3a, PG 3b, PG 5, PG 12, PG 15, PG 20 e PG 21 apresentaram, respectivamente, 2, 2, 1, 2, 4, 2, 1, 1 e 2 alelos (Tabela 3).

Com exceção do isolado 5039, os isolados obtidos do cultivar BRS 208 apresentaram o mesmo padrão

molecular (Tabela 3). Além disso, os dois isolados obtidos do cultivar BRS Angico, Py 5001 e 5002, apresentaram padrões idênticos. Os isolados de MG e GO, com exceção do Py 6025, apresentaram o mesmo padrão molecular, não havendo distinção entre regiões e partes vegetais dos quais estes isolados foram obtidos. Vale lembrar que esses isolados são oriundos do mesmo cultivar BRS 208 em

**TABELA 3** - Número de pares de bases de fragmentos do genoma de *Pyricularia grisea* amplificados por *primers* de microssatélites

Isolado	Cv. Origem	<i>Primers</i> *								
		MGM01	MGM21	PG03a	PG03b	PG05	PG12	PG15	PG20	PG21
Py 5001	BRS Angico	97	168	113	127	149	107	126	144	205
Py 5002	BRS Angico	97	168	113	127	149	107	126	144	205
Py 5005	BRS 248	100	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5012	BRS 229	100	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5017	BRS 193	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5020	BR 18	97	151	113	127	185	101	126	144	205
Py 5021	BR 18	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5025	BRS 249	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5029	CD 105	97	168	113	127	197	107	126	144	235
Py 5038	BRS 220	97	151	113	127	185	101	126	144	205
Py 5039	BRS 208	100	168	113	126	AN	107	126	144	205
Py 6001	BRS 208	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6008	BRS 208	97	168	113	127	DP	107	126	144	205
Py 6010	BRS 208	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6012	BRS 208	97	168	113	127	DP	107	126	144	205
Py 6018	BRS 208	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6025	BRS 208	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6030	BRS 208	DP	168	113	127	AN	107	126	144	AN

\*DP e AN significam dado perdido e alelo nulo, respectivamente.

regiões geográficas diferentes, mas obtidos no mesmo ano 2006.

Todos os *primers* utilizados foram desenvolvidos com base no seqüenciamento do genoma de *P. grisea* do arroz, mas já haviam sido úteis na discriminação de isolados de *P. grisea* de outros hospedeiros como trigo, triticale e espécies daninhas (Brondani et al., 2000; Garrido, 2001). Esse fato evidenciou a conservação dos *loci* testados em isolados de diferentes hospedeiros, obtidos de regiões geográficas distintas. A presença ou ausência de locais para o anelamento dos *primers* também pode ser usado na discriminação dos isolados. No trabalho, houve a presença de alelos nulos nos isolados originários do cultivar BRS 208 dos estados do Paraná e Goiás para os *primers* PG 5 e PG 21. O *locus* PG 3 apresentou mais que um fragmento, fato não esperado para um organismo haplóide. Isso pode ser o reflexo do anelamento inespecífico durante a PCR ou a presença de *locus* duplicado no genoma (Brondani et al., 2000).

A análise hierárquica dos dados de amplificação permitiu constatar uma similaridade mínima de cerca de 47% entre os isolados de *P. grisea* de trigo (Figura 1A). O conjunto de isolados foi dividido em quatro grupos, caracterizados pelas letras a,b,c,d. Os isolados pertencentes a cada grupo apresentaram uma similaridade mínima entre si de 75%. O grupo “a” foi formado por 13 isolados, os quais apresentaram, no mínimo, 80% de similaridade entre si, neste grupo foram inclusos representantes de todas as regiões amostradas e de diferentes partes vegetais. Nesse grupo estão os dois isolados do Rio Grande do Sul (Py 5001 e Py 5002). O grupo “b” foi composto por dois isolados

(Py 5039 e Py 6025). O grupo “c” foi formado pelo isolado Py 5029 (63% de similaridade com o restante do grupo). O grupo “d” apresentou menor similaridade genética em relação ao restante dos isolados, foi composto pelos isolados: Py 5038 e Py 5020 (47%).

As reações dos genótipos são apresentadas na Tabela 2. A combinação das reações de resistência e suscetibilidade dos genótipos, embora tenha existido a predominância dessa última, confere aos isolados a característica diferencial quanto à virulência. O espectro de virulência demonstrado pelos 18 isolados permitiu classificá-los em 13 patótipos ou raças, o que caracteriza um grau elevado de variabilidade fenotípica. Os isolados cujas reações de todos os genótipos foram de suscetibilidade foram classificados como pertencentes ao patótipo I. Obviamente que nem todas as plantas avaliadas nos três vasos de cada repetição apresentaram o mesmo tipo de reação, os dados do presente trabalho são médias, as quais foram estabelecidas utilizando critérios já relatados (Urashima et al., 1993). Além disso, o conjunto de plantas de cada genótipo não apresentou uma variação muito acentuada quanto as suas reações.

Um segundo dendrograma (Figura 1B) representando o espectro de virulência dos 18 isolados quando inoculados sobre 70 genótipos de trigo no estágio de planta jovem foi construído e possibilitou a comparação dos isolados sob dois aspectos: o padrão molecular e de virulência. A análise hierárquica do padrão de virulência dos isolados permitiu a formação de três grupos identificados pelas letras x, y e z, considerando a similaridade mínima de 75% entre os componentes de cada grupo, tendo sido o mesmo grau de similaridade estabelecido para separação dos grupos de

acordo com o padrão molecular. Esse nível de similaridade é muito próximo ao estabelecido em outros trabalhos para classificar *P. grisea* em grupos com o mesmo padrão molecular ou de virulência (Filippi & Prabhu, 2001).

Tanto na análise molecular quanto no espectro de virulência a maioria dos isolados apresentou mais de 85% de similaridade. Porém, o isolado Py 5002 apresentou cerca de 32% de similaridade com os demais isolados no espectro de virulência. Já na análise molecular, este isolado apresentou uma similaridade de, pelo menos, 75% com 12 dos 18 isolados utilizados no experimento, além de ter sido idêntico ao Py 5001, isolado virulento a todos os genótipos testados. Os isolados Py 5038 e 5020 formaram um grupo com o mesmo padrão molecular, embora em termos de virulência eles tenham sido diferentes, com menos de 60% de similaridade. Embora sejam diferentes quanto à virulência, o posicionamento do isolado Py 5020 no grupo “x” de virulência é o que mais se difere dos demais isolados.

A expectativa do trabalho era a de que seria possível, baseando-se nos dois critérios utilizados, formar grupos de isolados com integrantes comuns, ou seja, estabelecer uma característica única que contemplasse aspectos relacionados à variabilidade genética e fenotípica, esta última apresentada pela questão da virulência. Observando-se, os dendrogramas construídos, e levando-se em consideração que a maioria dos isolados pertencem a grupos com mais de 75% de similaridade entre si, independente do critério (genético ou de virulência), pode-se afirmar que a variabilidade genética detectada foi bastante compatível com a variabilidade fenotípica e a expectativa inicial do trabalho foi contemplada. Já foi proposto, para *P. grisea* do arroz, que a relação entre as características moleculares e de virulência seria direta (Levy et al., 1991), ou seja, a proposição era a de que marcadores moleculares de DNA agrupassem somente variantes do fungo com características idênticas de virulência. No entanto, avaliações realizadas em períodos posteriores demonstraram que é possível existir diversidade entre e dentro dos grupos formados de acordo com cada um dos dois critérios (Maciel et al., 2004; Zeigler et al., 1995). Nesta situação, provavelmente, se inclui o isolado Py 5002, avaliado no presente trabalho, e cuja relação com os demais isolados não foi a mesma de acordo com o critério utilizado para agrupamento.

Persistem as expectativas em torno da geração de cultivares de trigo que sejam mais resistentes à brusone, e que venham a minimizar os danos causados pela doença. Os resultados obtidos no presente trabalho fornecem um direcionamento para futuras ações de pesquisa com o objetivo de atender as expectativas mencionadas acima. É necessário investigar se a variabilidade genética do fungo é mais ampla do que a observada, seria interessante relacionar informações sobre variabilidade genética e aspectos como locais e genótipos onde os isolados são obtidos. Marcadores microsatélites obtidos do genoma de *P. grisea* do trigo, e não de *P. grisea* do arroz, como os que foram utilizados,

podem ser mais informativos. Também seria de muita validade o avançar o conhecimento na determinação fontes mais eficientes de resistência à doença. Os trigos sintéticos continuam sendo uma boa opção, apesar do baixo nível de resistência demonstrado por aqueles que foram usados no presente trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de estudo, ao Centro Nacional de Pesquisa de Trigo - CNPT pela estrutura física disponibilizada para a condução do trabalho, e às pesquisadoras Marta Filippi e Jurema Schons pelas correções do trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anjos JRN dos, Silva DB da, Charcar MJD, Rodrigues, GC (1996) Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos cerrados do Brasil Central. Pesquisa Agropecuária Brasileira 31:79-82.
- Azevedo JL, Costa SOP (1973) Exercícios práticos de genética. São Paulo SP. Editora Nacional.
- Brondani C, Brondani RPV, Garrido L, Ferreira ME (2000) Development of microsatellite markers for genetic analysis of *Pyricularia grisea*. Genetics and Molecular Biology 23:753-762.
- Busso C (2005) Caracterização genética de isolados patogênicos de *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum* do trigo (*Triticum aestivum*) e do triticale (*X. triticosecale*) no estado do Paraná. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá PR.
- Filippi MC, Prabhu AS (2001) Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from brazilian upland rice cultivars. Pesquisa Agropecuária Brasileira 36:27-35.
- Garrido LR (2001) Desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipervariáveis do genoma de *Magnaporthe grisea* na análise da estrutura de populações do patógeno infectando plantações de arroz. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília DF.
- Igarashi S (1988) “Brusone” do trigo - sintomatologia. Resumos, 15. Reunião Nacional de Pesquisa de Trigo. Passo Fundo RS. Embrapa Trigo.
- Igarashi S (1990) Update on wheat blast (*Pyricularia oryzae*) in Brazil. In: Saunders DA (Ed.) Proceedings, International Conference-Wheat for the nontraditional warm areas. México City. CIMMYT. pp. 480-483.
- Igarashi S, Utimada CM, Igarashi LC, Kazuma AH, Lopes RS (1986) *Pyricularia* sp. em trigo. I. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. Resumos, 14. Reunião Nacional de Pesquisa de Trigo. Londrina PR. Instituto agrônomo do Paraná. p. 57.
- Goulart ACP, Paiva FA (1992) Incidência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. Fitopatologia Brasileira 17:321-325.



- Goulart ACP, Paiva FA (1993) Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*T. aestivum*). Fitopatologia Brasileira 18:167-173.
- Goulart ACP, Paiva FA (2000) Perdas no rendimento de grãos de trigo causada por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. Summa Phytopathologica 26:279-282.
- Levy M, Romão J, Marchetti MA, Hamer JE (1991) DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. The Plant Cell 3:95-102.
- Maciel JLN, Rodrigues PCS, Avozani AO, Moraes MG (2004) Padrão molecular e de virulência de isolados de *Pyricularia grisea* do estado do Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 29:504-510.
- Meyer AS (2002) Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes. Dissertação de Mestrado. ESALQ, Universidade de São Paulo. Piracicaba SP.
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, MacDonald KD, Bufton AWJ (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics 5:141-238.
- Reis EM, Forcelini CA (1995) Controle cultural. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.) Manual de Fitopatologia. Vol.1. Princípios e conceitos. São Paulo SP. Ceres. pp. 710-716.
- Rohlf FJ (1997) NTSYS-PC ver. 2.02. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York NY. Exeter Publishing.
- Specht CA, Dirusso CC, Novotny CP, Ullrich RC (1982) A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. Analytical Biochemistry 119:158-163.
- Urashima, AS (1999) Genetic analysis of *Magnaporthe grisea* pathogenicity on wheat. Fitopatologia Brasileira 24:567-569.
- Urashima A, Igarashi S, Kato H (1993) Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. Plant Disease 77:1211-1216.
- Urashima A, Kato H (1994) Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. Summa Phytopathologica 20:107-112.
- Urashima AS, Bruno AC (2001) Interrelação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo com a brusone de outros hospedeiros. Fitopatologia Brasileira 26:21-26.
- Urashima AS, Lavorenti NA, Goulart ACP, Mehta YR (2004) Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. Fitopatologia Brasileira 29:511-518.
- Urashima AS, Stabili A, Galbieri R (2005) DNA fingerprinting and sexual characterization revealed two distinct populations of *Magnaporthe grisea* in wheat blast from Brazil. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 41:238-245.
- Urashima A, Leite SF, Galbieri R (2007) Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. Summa Phytopathologica 33:275-279.
- Yap IV, Nelson RJ (1996) Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI Discussion Paper Series No. 14. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research 4:415-421.
- Zeigler RS, Couc LX, Scott RP, Bernardo MA, Chen DH, Valent B, Nelson RJ (1995) The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. Phytopatology 85:443-451.

---

TPP 8122 - Recebido 15 Outubro 2008 - Aceito 17 Novembro 2009  
Editor de Seção: Luis Eduardo Aranha Camargo