

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Magnaporthe oryzae* Fábio José GONÇALVES, Marta Cristina FILIPPI, Larissa Leandro PIRES, Valácia Lemes Silva LOBO, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, biofabio_botanico@yahoo.com.br
Palavras chave: brusone, *Oryza sativa*, patogenicidade

INTRODUÇÃO

O arroz é considerado a fonte de 20% de calorias e 13% das proteínas consumidas no mundo segundo a FAO (2004). No Brasil, o arroz é plantado em várzeas com irrigação, em condições de clima temperado e tropical, e em terras altas sem irrigação. A produtividade, em todos os sistemas de plantio vem sendo afetada pela ocorrência de doenças, especialmente a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*.

Relatada em todas as áreas produtoras de arroz do mundo, os danos na produção podem chegar a 100%, dependendo da resistência genética da cultivar utilizada, da época de plantio e das condições climáticas (PRABHU et al., 2002). Portanto, a resistência genética a brusone nas cultivares geneticamente melhoradas é considerada a estratégia mais econômica para minimizar as perdas, além de ser ecologicamente correta. Contudo, cultivares geneticamente melhoradas para resistência à brusone, aos serem disponibilizadas e plantadas em larga escala apresentam resistência não estável, afetando o potencial produtivo das mesmas.

No binômio *M. oryzae* – *O. sativa*, a interação entre o patótipo e a cultivar de arroz é explicada pela teoria gene a gene (Flor, 1971; Silue et. al., 1992). De acordo com essa teoria, a resistência é o resultado de uma interação incompatível entre o gene de avirulência do patógeno e gene de resistência do hospedeiro. A dinâmica da evolução das populações de *M. oryzae* em resposta a diferentes genótipos de arroz torna o melhoramento para a resistência mais complexo, pois a variabilidade acentuada das populações de *M. grisea* permite o aumento da frequência de um determinado patótipo, o qual antes era inexpressivo. A caracterização molecular da estrutura da população de *M. oryzae* em lavouras de arroz, juntamente com a análise de virulência fenotípica, permite detectar mudanças na frequência dos genes ligados a patogenicidade.

Marcadores moleculares para estudos destas populações devem permitir o monitoramento da variabilidade patogênica, direcionando assim a seleção de possíveis genes de resistência para serem incorporados às cultivares adaptadas. Assim, para que a resistência de uma cultivar seja durável, essa deve conter genes de resistência efetivos aos patótipos mais freqüentes que compõem a população e também aos patótipos até então presentes em uma freqüência muito pequena. Para que este resultado seja alcançado, é necessário o conhecimento da sua dinâmica, da composição genotípica e fenotípica da população do patógeno.

O lançamento seqüencial de cultivares com diferentes genes de resistência é uma estratégia interessante para o manejo da brusone em arroz de terras altas (Prabhu et. al., 1999). Entretanto, não há uma rede de informações contínuas quanto à dinâmica de patótipos, dentro de populações, em cada região produtora de arroz, justificando estudos de caracterização genética da população do patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Para determinação dos patótipos de *M. oryzae*, foram obtidos indivíduos monospóricos a partir de lesões esporulativas nas folhas e ramificações das panículas, das amostras de plantas de arroz dos estados de Goiás, Tocantins e Mato Grosso do Sul. A indução da formação dos conídios foi feita em câmara úmida, em placa de Petri, durante 24 horas sob luz contínua. Com o auxílio de microscópio estereoscópio e alça de platina, os conídios foram transferidos diretamente das lesões para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) com antibiótico. Os isolados monospóricos crescidos foram multiplicados em meio BDA para que um disco de micélio fosse transferido para o centro de uma placa a Petri, contendo meio BDA e uma folha de papel filtro esterilizado. Depois do micélio crescido, o papel filtro foi transferido para uma placa de Petri esterilizada e submetido a secagem em estufa a 28 – 30°C. O papel filtro contendo o fungo foi então cortado em quadrados de 1 cm e colocados em microtubos contendo sílica gel indicadora de umidade a – 5°C.

A inoculação por pulverização foi realizada aos 21 dias após o plantio com uma suspensão conidial (3×10^5 esporos/ml) obtida dos isolados monospóricos de *M. oryzae* até que plantas ficassem totalmente cobertas por gotículas da solução de inóculo, evitando o ponto de escorrimento (FILIPPI et al., 2007).

Nove dias após a inoculação, a reação das plantas à brusone foi avaliada nas folhas, utilizando uma escala visual de notas de 0 a 9, baseando-se no tipo de reação. Os tipos de reações variando de 0 a 3 foram consideradas como resistentes ou incompatíveis e de 4 a 9 como suscetíveis ou compatíveis (INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 1988). Após determinação das notas os patótipos foram identificados com base nas reações das oito diferenciadoras internacionais, utilizando a chave proposta por Ling & Ou (1969).

Para a caracterização genotípica dos isolados de *M. oryzae*, o micélio dos isolados foram colocados em meio líquido contendo extrato de levedura para crescimento, secados, liofilizados e macerados para extração de DNA. Foram selecionados 16 isolados e realizada reação de rep PCR utilizando os primers *Pot 2.1* e *Pot 2.2* e o produto da reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 0,5 %. O padrão eletroforético foi transformado em matriz numérica e submetido a análise pelo programa Ntsys 2.1 para construção do dendograma. O DNA extraído dos isolados monospóricos foram submetidos a reação de PCR utilizando-se marcadores moleculares microssatélites e a eletroforese realizada em gel de Poliacrilamida, estes estudos estão em andamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de patogenicidade realizados demonstraram que existe variabilidade genética dos isolados monospóricos obtidos. Para o estado de Goiás os grupos de patótipos predominantes foram IC, IF e IB, para o Tocantins os grupos de patótipos mais expressivos foram ID e IB enquanto que no Mato Grosso de Sul IB e ID. Em trabalho realizado por Silva et. al. (2007) utilizando isolados obtidos em cinco municípios do Estado de Goiás, em dois anos consecutivos, de oito lavouras comerciais das cultivares BRS Bonança e Primavera, 22 patótipos foram identificados, dos 170 isolados coletados da cv Primavera havendo predominância dos patótipos IF-1, ID-9 e IC-9. Enquanto nos

testes conduzidos com 136 isolados provenientes das lavouras de BRS Bonança 19 patótipos foram detectados e os mais freqüentes foram IB-41 e IB-9. Os resultados obtidos até o momento no presente trabalho indicam que houve mudança na frequência de patótipos no estado de Goiás.

Os 16 isolados selecionados para a reação de rep PCR utilizando os primers *Pot 2.1* e *Pot 2.2* demonstraram que dois isolados, Py 365 L1 4.1 e Py 365 L1 4.2, oriundos de uma mesma colônia formadora de setor, apesar de demonstrarem padrões fenotípicos de virulência distintos, classificando-se nos patótipos IB e IG; quando amplificados, apresentaram de bandas iguais, demonstrando 100% de similaridade, conforme o coeficiente de similaridade de Jaccard. A análise de isolados de *M. oryzae*, coletados na cultivar Metica-1, utilizando Rep-PCR com dois primers (*Pot-2*) revelou a ocorrência de seis grupos de linhagens, as quais não mostraram uma relação entre a virulência dos isolados e o agrupamento genético (FILIPPI et al., 2002). Estes resultados indicam que a variabilidade destas populações, no que diz respeito a patogenicidade, não é devidamente monitorada ao se adotar os marcadores até então disponíveis.

Os marcadores microssatélites utilizados, foram capazes de identificar diferenças entre os isolados Py 365 L1 4.1 e Py 365 L1 4.2.

BRONDANI et al. (1998) e GARRIDO (2001) desenvolveram marcadores moleculares baseados na amplificação de regiões microssatélites de *M. oryzae* do arroz. De acordo com os autores, o polimorfismo gerado pelos marcadores microssatélites foi mais elucidativo do que os que foram baseados nas seqüências MGR-586 e *Pot-2*. Nesse sentido, outros autores também têm relacionado os marcadores microssatélites como uma alternativa bastante eficiente para caracterizar os variantes de *M. oryzae*. KAYE et al. (2003) conseguiram, inclusive, identificar marcadores microssatélites que foram capazes de integrar um mapa genético de ligação elaborado a partir de uma progênie segregante, oriunda do cruzamento de isolados de *M. grisea* obtidos do arroz.

CONCLUSÕES

- Foi possível observar a variabilidade de *M. oryzae* dos isolados testados;

- Os isolados Py 365 L1 4.1 e Py 365 L1 4.2, oriundos desta variabilidade foram pertencentes a patótipos diferentes e a mesma linhagem genética;
- Os marcadores *Pot 2.1* e *Pot 2.2* não identificaram a variabilidade entre os isolados Py 365 L1 4.1 e Py 365 L1 4.2
- Os marcadores microssatélites foram capazes de identificar variabilidade entre os isolados Py 365 L1 4.1 e Py 365 L1 4.2 indicando que pode haver relação entre a virulência e os marcadores utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAO. 2004. FAO. Internet Communication. Concert about rice production practices. FAO News Room <http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/7538-en.html>

FILIPPI, M.C.; PRABHU, A.S., ARAUJO, L.G. and FARIA, J.C. Genetic diversity and virulence pattern in field populations of *Pyricularia grisea* from rice cultivar Metica-1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília 37. 2002

FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B.; PRABHU, A. S. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 5, p. 387-392, set./out. 2007.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **A. Rev. Phytopathology**. 9:275-296.1971.

Garrido, L.R. 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. 2001

Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M., Tharreau, D., The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. **Fung. Genet. Biol.** **40**, 207–214. 2003.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e seu controle. In: **A cultura do Arroz no Brasil**. 1 ed. Santo Antônio de Goiás, Embrapa, 1999.

SILUE, D., THARREAU, D., TALBOT, N.J., CLERGEOT, P.H., NOTTEGHEM, J.L. and LEBRUN, M.H. Identification and characterization of *apf1-* in a non-pathogenic mutant of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* which is unable to differentiate appressoria. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 53[4]: 239-251. 1992