

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO MOLECULAR E
DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia*
grisea DO TRIGO**

MARIA FERNANDA ANTUNES DA CRUZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia-Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, fevereiro de 2008.

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO MOLECULAR E
DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia*
grisea DO TRIGO**

MARIA FERNANDA ANTUNES DA CRUZ

Orientador: Prof. Dr. Ariano Morais Prestes

Co-orientador: Dr. João Leodato Nunes Maciel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia-Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, fevereiro de 2008.



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOPATOLOGIA



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Caracterização do padrão molecular e de virulência de
isolados de *Pyricularia grisea* do trigo”

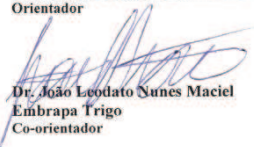
Elaborada por

MARIA FERNANDA ANTUNES DA CRUZ

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Área de Fitopatologia

Aprovada em: 22/02/2008
Pela Comissão Examinadora


Dr. Ariano Moraes Prestes
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador


Dr. João Leodato Nunes Maciel
Embrapa Trigo
Co-orientador


Dra. Jurema Schons
Universidade de Passo Fundo


Dr. Vilsa Antonio Klein
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dr. Mauro Antonio Rizzardi
Diretor FAMV


Dra. Marta Cristina Corsi Filippi
Embrapa Arroz e Feijão

ESTE TRABALHO É DEDICADO

- A minha mãe, Maria das Graças Antunes da Cruz, pelo exemplo de coragem e determinação que norteia minha vida;
- A minha vovó, Lucinda A. da Cruz, pelo carinho, amor e dedicação exclusiva todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

- À Universidade de Passo Fundo pela formação acadêmica;
- À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;
- À Embrapa Trigo pela disponibilização da infra-estrutura;
- Ao Dr. Ariano Moraes Prestes, pela orientação, paciência e carinho dispensado comigo todos esses anos;
- Ao Dr. João Leodato Nunes Maciel, pela co-orientação, colaboração e empenho para a realização deste trabalho;
- A minha família, pelo incentivo;
- Aos meus amigos de verdade, com os quais posso contar em todo o momento e que mesmo longe não deixam de fazer parte da minha história, Andréia Caverzan, Clarissa Dalmagro, Caroline Garcez, Geovana Wallendorff, Tatiana P. Rodrigues, Felipe e Jordana Beux, Raquel Pirã e Vagner Albuquerque;
- Aos funcionários da Embrapa Trigo, que fizeram parte do meu crescimento pessoal e profissional;
- E a todos aqueles que confiaram em mim, e acreditaram no meu esforço e resignação para a realização do trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	x
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 O Trigo.....	17
2.1.1 O Trigo no Brasil.....	19
2.1.2 O Trigo sintético.....	22
2.2 O fungo <i>Pyricularia grisea</i>	24
2.2.1 Identificação e denominação.....	24
2.2.2 Taxonomia e morfologia.....	25
2.2.3 Variabilidade patogênica de <i>Pyricularia grisea</i>	28
2.3 Brusone.....	30
2.3.1 Ocorrência geográfica.....	30
2.3.2 Ciclo da doença.....	31
2.3.2.1 Fontes de inóculo e plantas hospedeiras.....	31
2.3.2.2 Disseminação.....	33
2.3.2.3 Transmissão.....	34
2.3.2.4 Sintomatologia.....	35
2.3.3 Danos à cultura do trigo causadas pela brusone.....	35
2.3.4 Controle da doença.....	38
2.4 Resistência.....	40
2.5 Marcadores moleculares- microssatélites.....	42
2.6 Marcadores moleculares em <i>Pyricularia grisea</i>	47
CAPÍTULO I.....	50

VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Pyricularia grisea</i> E REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE TRIGO À BRUSONE.....	50
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	53
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1 Isolados.....	57
2.2 Genótipos.....	58
2.3 Preparação do inóculo.....	59
2.4 Inoculação.....	61
2.5 Avaliações.....	61
2.6 Análise estatística.....	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4 CONCLUSÕES.....	84
CAPÍTULO II.....	85
PADRÃO MOLECULAR E DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Pyricularia grisea</i> DO TRIGO	85
RESUMO.....	85
ABSTRACT.....	86
1 INTRODUÇÃO.....	88
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1 Isolados.....	90
2.2 Cultivo de isolados para produção de micélio.....	92
2.3 Extração do DNA.....	92
2.4 Otimização da reação PCR de microssatélites.....	93
2.5 Genotipagem dos isolados com marcadores microssatélites	95
2.6 Análise estatística.....	98
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
4 CONCLUSÕES.....	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela	CAPÍTULO I	Página
1	Relação de isolados monospóricos de <i>Pyricularia grisea</i> utilizados no experimento. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	58
2	Relação de genótipos utilizados no experimento na fase de planta jovem. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	60
3	Chave de identificação de patótipos de <i>P. grisea</i> a partir da reação diferencial de 14 genótipos de trigo. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	68
4	Agrupamento dos 70 genótipos de planta jovem de acordo com a similaridade dos dados de severidade para os 18 isolados testados. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	70
5	Severidade de brusone na espiga de 12 genótipos de trigo, submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de <i>Pyricularia grisea</i> . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2007	73
6	Severidade de brusone na folha bandeira de 12 genótipos de trigo, submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de <i>Pyricularia grisea</i> . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	74
7	Coefficientes de determinação e correlação dos dados de severidade na espiga e folha bandeira por genótipo em relação a todos os isolados de <i>Pyricularia grisea</i> testados. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	77

8	Coefficientes de determinação e correlação dos dados de severidade na espiga e folha bandeira por isolado de <i>Pyricularia grisea</i> em relação a todos os genótipos testados. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	77
---	---	----

CAPÍTULO II

1	Relação de isolados monospóricos de <i>Pyricularia grisea</i> utilizados no experimento. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	91
2	<i>Primers</i> e suas respectivas seqüências utilizadas para amplificação do DNA dos isolados de <i>Pyricularia grisea</i> . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	94
3	Concentrações dos reagentes utilizados nos diferentes <i>mixes</i> para reação de PCR de otimização dos <i>primers</i> . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	95
4	Concentrações dos reagentes para as reações de PCR analisados no seqüenciador automático. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	97
5	Seqüências de DNA de <i>Pyricularia grisea</i> amplificadas em seqüenciador automático a partir de 8 <i>primers</i> microssatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007	102

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Conídios e conidióforos de <i>Pyricularia grisea</i> .	26
2	Ascas e ascósporos de <i>Magnaporthe grisea</i> .	27

CAPÍTULO I

1	Tipos de lesões de <i>Pyricularia grisea</i> em trigo. (A) Lesões tipo 1 (a) e 2 (b), coloração amarronzada e não esporulativas. (B) Lesão tipo 4, manchas elípticas com centro discernível esporulativas. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.	62
2	Dendrograma baseado na reação de 70 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de <i>Pyricularia grisea</i> . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.	67
3	Dendrograma baseado na similaridade dos dados de severidade dos 70 genótipos de trigo, submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de <i>Pyricularia grisea</i> . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.	69
4	Severidade de brusone em folha jovem e espiga de 12 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de <i>Pyricularia grisea</i> . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.	75
5	Severidade de brusone em folha bandeira e folha jovem de 12 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de <i>Pyricularia grisea</i> . Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.	76

- 6 Severidade em folha bandeira e espiga de 12 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007. 78

CAPÍTULO II

- 1 Amplificação do DNA dos isolados: (1) Py 5001, (2) Py 5002, (3) Py 5003, (4) Py 5005, com os *primers* (A) MGM01, (B) MGM21 e (C) PG05. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. Marcador molecular Ladder 100 pb (M). Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007. 100
- 2 Análise do perfil de amplificação dos genótipos (A) Py 5001, (B) Py 5020, e (C) Py 3.3.1 com os *primers* MGM21 e M13F1 (marcado com 6-FAM). O número ao lado de cada pico indica o tamanho do produto amplificado em pares de base (pb). Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007. 101
- 3 Dendrograma baseado no perfil de amplificação do DNA de 32 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizando 8 *primers* microssatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007. 105
- 4 Dendrograma baseado no perfil de amplificação do DNA de 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizando 8 *primers* microssatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007. 106
- 5 Dendrograma baseado na reação de 70 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007. 107

CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO MOLECULAR E DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia grisea* DO TRIGO

Maria Fernanda Antunes da Cruz¹, Ariano Moraes Prestes² & João Leodato Nunes Maciel³

RESUMO- A brusone do trigo causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., foi relatada no Brasil, na década de 80 no estado do Paraná. Desde então, os programas de melhoramento de trigo buscam a identificação de fontes de resistência à doença e estudar a variabilidade do patógeno. Os objetivos do presente trabalho foram: a) determinar o padrão de virulência de 18 isolados de *P. grisea* quando inoculados sobre 70 genótipos de trigo em planta jovem; b) verificar o grau de resistência de genótipos de trigo, comum e sintético, em dois estádios de desenvolvimento; c) correlacionar os resultados dos dois estádios de desenvolvimento; d) determinar o padrão molecular de 31 isolados de *P. grisea* do trigo. A análise do padrão molecular dos 31 isolados monospóricos de *P. grisea* a partir de 8 locos microssatélite, e o padrão de virulência de 18 desses isolados quando inoculados sobre 70 genótipos de planta jovem de trigo, permitiram a formação de 4 e 3 grupos de isolados com no mínimo 75% de similaridade entre si. Os isolados se mostraram homogêneos para ambas as variáveis.

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) na FAMV/UPF, área de concentração Fitopatologia

² Orientador, Eng.-Agr., PhD., Professor do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) na FAMV/UPF

³ Co-orientador, Eng.-Agr., Dr., Pesquisador na Embrapa Trigo

Com exceção do isolado Py 5002 que apresentou um padrão de virulência diferente dos demais (32% de similaridade) em contraste ao padrão molecular (95% de similaridade). Na fase de planta jovem destacaram-se quanto a reação de resistência e menor área foliar afetada os genótipos BRS 229, BRS 179, CNT 8, BRS 120, BRS Buriti. Em planta adulta, o cultivar CNT 8 apresentou menor área de espiga afetada (<10%), que não diferiu estatisticamente de PF 844001. Já em folha bandeira, os genótipos de trigo sintético NE 20156-B, PF 844001, PF 964009, PF 804002 apresentaram menor área foliar afetada, e não diferiram estatisticamente do cultivar CNT 8. A correlação entre infecção na folha bandeira e na espiga foi de 54%. Os dados obtidos indicam a existência de genes diferentes expressos nos diferentes estádios de desenvolvimento e partes da planta.

Palavras-chave: variabilidade genética e fenotípica, resistência planta jovem, resistência planta adulta, brusone

CHARACTERIZATION OF MOLECULAR PATTERN AND VIRULENCE OF *Pyricularia grisea* ISOLATES WHEAT

ABSTRACT- Wheat blast caused by *Pyricularia grisea*, was described in Brazil in the 80th, in Parana State. Since then, the wheat breeding programs have searched for sources of resistance to blast, and try to understand the pathogen variability. The goals of this work were: a) to determine virulence pattern of 18 isolates of *P. grisea* based on the inoculation reaction of 70 young wheat genotypes, b) to verify the resistance level to blast of synthetic and common wheat

genotypes at young and adult plant stages, c) to relation the results of both stages d) to determine the molecular pattern of 31 *P. grisea* isolates. The molecular pattern of the 18 monosporic isolates of *P. grisea* based on 8 loci microsatellites presented 75% of similarity among isolates. The molecular and virulence pattern were similar based on the results of 70 wheat seedling inoculation. Exception was observed with Py 5002 isolate. This isolate molecular pattern didn't match with other isolates, presenting 32% of similarity. The genotypes BRS 229, BRS 179, CNT 8, BRS 120, BRS Buriti, presented better performance in young plant compared to the others genotypes. The synthetic wheat adult genotypes (NE 20156-B, PF 844001, PF 964009, PF 804002) and cultivar CNT 8 presented less leaf and head infected area by blast. There was 54% of correlation index between flag leaf and head was 54%. The data obtained in this research indicated the at existence different resistance genes are expressed in different physiological stages of wheat the plant.

Key words: genetic and phenotypic variability, seedling resistance, adult resistance, blast wheat

1 INTRODUÇÃO

A brusone causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. é a doença mais recente diagnosticada na cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.). Os maiores danos ocorrem quando a infecção se dá no ráquis, limitando o desenvolvimento da espiga e ocasionando a queda na produtividade e na qualidade de grãos. Pela ineficiência dos fungicidas disponíveis no mercado, e a inexistência de cultivares resistentes à doença, os programas de melhoramento de trigo objetivam identificar fontes de resistência à brusone que possam fazer parte dos blocos de cruzamento, visando à incorporação de genes de resistência à doença.

Nos programas de melhoramento de arroz, uma das estratégias utilizadas foi o uso de resistência raça específica acompanhada de resistência raça-não específica. A resistência raça específica (resistência vertical ou resistência qualitativa) caracteriza-se por ser facilmente reconhecida e governada por poucos genes de efeitos maiores. Esse tipo de resistência é efetiva contra uma ou mais raças de um patógeno, mas inefetiva contra outras. É a resistência que evita o estabelecimento da infecção. Já a resistência raça não específica (resistência horizontal ou resistência quantitativa) caracteriza-se por: envolver muitos genes de efeitos menores; restringir a colonização e reprodução do patógeno; e por ser efetiva contra várias raças do patógeno (RIBEIRO DO VALE *et al.*, 2001). Uma combinação entre resistência qualitativa altamente efetiva, controlada por genes maiores e altos níveis de resistência parcial

caracterizados por *loci* quantitativos (QTL- *Quantitative Trait Loci*) são capazes de tornar a resistência à brusone do arroz mais durável (PRABHU & FILIPPI, 2006). Porém, em relação à brusone do trigo, que ainda não houve a identificação de genes de resistência de efeito maior nos cultivares disponíveis no mercado, a alternativa é trabalhar com genes de efeito menor. A resistência raça não específica através da identificação dos *loci* envolvidos na expressão desta característica, e a recombinação entre os genótipos de trigo com algum nível de resistência à doença, pode ser uma estratégia para os programas de melhoramento de trigo que visam resistência à brusone.

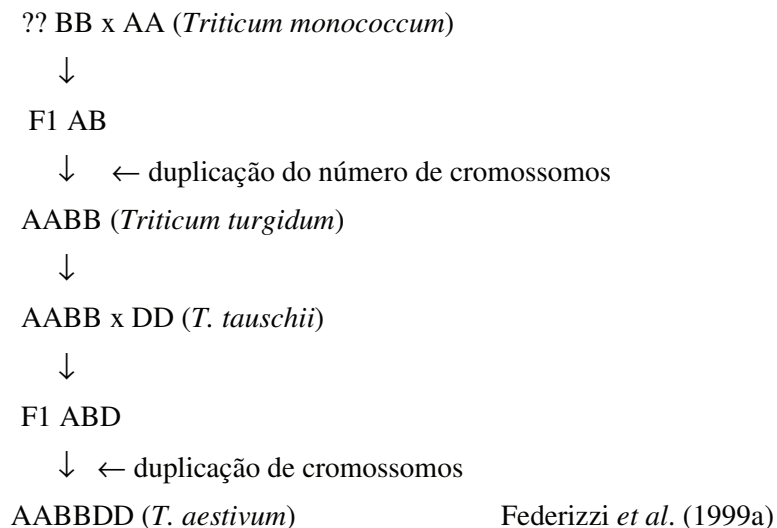
A busca por genótipos que possuam diferentes genes de resistência à brusone não deve se restringir a *Triticum aestivum* L. Outras espécies afim ao trigo cultivado como por exemplo *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*), doadora do genoma DD do trigo hexaplóide, aparece como promissora fonte de resistência à doença. A recombinação interespecífica entre *Triticum tauschii* (2n=14=DD) e *Triticum durum* (2n=28=AABB) é capaz de gerar híbridos hexaplóides sintéticos com a qualidade panificadora de *T. aestivum* e com a resistência a doenças, do *T. tauschii*. Essa técnica permite a reconstituição natural de espécies hexaplóides e é também uma forma de transmitir características desejáveis de *T. tauschii* para o nível hexaplóide do trigo. Além disso, os marcadores moleculares utilizados com sucesso para identificação de populações de *Pyricularia grisea* do arroz, também poderão ser úteis na caracterização e no monitoramento do patógeno nas principais regiões tritícolas do País que, invariavelmente sofrem com os danos provocados pela brusone. Os objetivos do presente trabalho foram: a) determinar o padrão de

virulência de 18 isolados de *Pyricularia grisea* quando inoculados em 70 genótipos de trigo no estágio 14 (4 folhas) da escala de Zadoks *et al.* (1974); b) verificar se há diferença entre genótipos de trigo comum e sintético nos estádios 14 e 60,61 (início da antese) da escala de Zadoks *et al.* (1974) quanto ao grau de resistência; c) correlacionar os dados de ambos os estádios; d) determinar o padrão molecular de 31 isolados de *P. grisea* do trigo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O trigo

O trigo, *Triticum aestivum* L., pertence à família Poaceae, tribo Triticeae, subtribo Triticinae. As diferentes espécies de trigo, formam uma série poliplóide, com número básico de cromossomos igual a sete e três níveis de ploidia: di, tetra e hexaplóides com 14, 28 e 42 cromossomos, respectivamente. Estudos indicam que as espécies diplóides tiveram uma origem única, já os tetraplóides são anfiplóides, com dois conjuntos de cromossomos, derivados de ancestrais diplóides diferentes. As espécies hexaplóides com três conjuntos distintos de cromossomos, apresentam dois derivados de um trigo tetraplóide (provavelmente *T. turgidum*) e um derivado de um trigo diplóide (*T. tauschii*). O genoma A é proveniente da espécie *T. monococcum* e o genoma D originário da espécie *T. tauschii*, conforme diagrama:



A área geográfica de distribuição e domesticação do trigo coincide com o local e tempo do início da civilização do homem e início da agricultura. As antigas cidades e civilizações, como Babilônia, da Grécia, de Creta, do Egito e de Roma foram baseadas na cultura do trigo (FEDERIZZI *et al.*, 1999b). O trigo é um dos principais cereais da alimentação humana, consumido direta ou indiretamente por 35% da população humana. Estimativas revelam que em 2020, sejam consumidas no mundo um bilhão de toneladas de trigo, pois para atender essa procura pelo grão, seria necessário passar de um rendimento em torno de 2,500 toneladas por hectare a 4,500 toneladas por hectare, sendo necessário para isso um aumento no rendimento de 2,5% ao ano (BACALTCHUK & SILVA, 2001).

A agricultura propiciou tanto o desenvolvimento humano, quanto de microrganismos patogênicos às diferentes culturas, ou seja, um processo de co-evolução que gerou variabilidade nas populações vegetais e de microrganismos. Dessa forma, as doenças acompanharam a evolução do trigo e são responsáveis por consideráveis perdas nessa cultura. Conforme Bacaltchuk & Silva (2001), o homem com o cultivo da terra, provocou um desequilíbrio ecológico, extensas áreas cultivadas com uma mesma espécie vegetal, selecionaram espécies de patógenos especializados em atacar a cultura, com o objetivo único de perpetuação da espécie.

Os fatores que costumam afetar o desenvolvimento das doenças em trigo são: condições climáticas, a base genética do cultivar e a virulência do patógeno. Em relação à base genética dos

genótipos de trigo utilizados, inúmeros são os esforços dos melhoristas vegetais na construção de novos genótipos que agreguem características agronômicas desejáveis ao mercado consumidor e que apresentem alguma forma de resistência às principais doenças que afetam a cultura.

2.1.1 Trigo no Brasil

No Brasil, o cultivo de trigo teve início em 1534 quando os navegantes portugueses que aqui chegaram trouxeram sementes que foram distribuídas na antiga Capitania de São Vicente, de onde a cultura se espalhou por toda a capitania, da ilha de Marajó ao extremo sul. Há quatrocentos anos, o trigo rústico dourou a região tropical e quente do norte brasileiro, mais tarde, atingiu as colinas de Piratininga, para se estender, finalmente até as serras e coxilhas gaúchas (CUNHA, 2001).

Segundo Mundstock (1999), a expansão do trigo no Brasil foi dividida em etapas, merecendo destaque a terceira etapa que iniciou em 1969, momento em que a área cultivada chegou a 4.000.000 ha, e caracterizou-se por ser ordenada por alguns motivos como: criação de variedades mais tolerantes às moléstias, menos sensíveis às variações ambientais, melhor capacidade de produção, melhores informações técnicas ao produtor, sementes de melhor qualidade, corretivos, disponibilidade de fertilizantes e defensivos, ampliação do maquinário, financiamento de custeio a taxas reduzidas e abertura de novas áreas tritícolas, destacando-se São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná especialmente.

O Rio Grande do Sul até início de 1970 foi responsável pela maior parte da produção tritícola nacional, mas a ampliação do cultivo de trigo para a região Centro-Sul, possibilitou uma maior estabilidade de rendimento. Visto que, uma vez ocorrendo diferentes épocas de semeadura, os insucessos que poderiam ocorrer em um estado poderiam ser menos intensos, ou não ocorrerem em outro.

Alguns fatores de produção se controlados, nesta etapa, poderiam contribuir para o aumento da produtividade. Como exemplo pode-se citar o efeito negativo das extensas áreas de cultivo que facilitam a difusão e o aparecimento de novas raças de patógenos, a falta de rotação cultural que também contribui para a difusão de moléstias, além do uso de terras impróprias ao cultivo do trigo.

A quarta etapa faz referência à expansão das fronteiras do trigo para o norte do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Nos últimos anos o estado do Paraná vem se destacando no cultivo do trigo, pois na década de 70, com a erradicação dos cafezais e entrada da soja em solos de alta fertilidade, houve a expansão da lavoura de trigo.

A partir de 1971, São Paulo passou a integrar as estatísticas como produtor de trigo, e em Mato Grosso do Sul onde também houve um aumento de área cultivada após 1978.

Uma análise das safras revela que em 1971 a produção foi cerca de 2 milhões de toneladas. Em 1972 pela interferência de fatores naturais na lavoura, a produção caiu para 700 mil toneladas, em 1973 com o aumento da área plantada e o incentivo oficial do governo colheu-se em 1976, 3,038 milhões de toneladas.

Para Mundstock (1999), a quinta etapa na expansão do trigo, iniciou recentemente com a abertura de uma terceira região tritícola, quando a cultura foi adaptada às zonas altas do Planalto Brasileiro, em áreas situadas de 600 a 1000 m de altitude em latossolos de cerrado com relevo relativamente plano em Goiás, Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal. Áreas em que o solo caracteriza-se por ser intemperizado e de baixa fertilidade natural, apresentando teores variáveis de alumínio.

Nessa etapa, o Cerrado Brasileiro desponta na triticultura nacional por apresentar grande potencial para expansão da triticultura nacional por possuir grande área viável e parque industrial instalado com possibilidade de expansão. Entre as vantagens do cultivo do cereal no Cerrado estão a estabilidade em termos de quantidade e qualidade industrial, uma vez que em condições irrigadas as variações em rendimento de grãos são pequenas, e o grão é colhido no período seco e na entressafra. Além, da região ser capaz de funcionar como reguladora de estoques e exportadora de trigo para outros estados e países. Em 2006, a área de trigo irrigado foi de 45 mil hectares e a produtividade média em torno de 5 toneladas por hectare (EMBRAPA CERRADOS, 2008). Dessa forma, verifica-se que o Cerrado Brasileiro possui potencial para produção de trigo em quantidade e qualidade, desde que medidas essenciais como o uso de cultivares adaptadas a região e resistentes à brusone sejam usadas. Já que a doença é o principal fator limitante da produtividade do trigo safrinha no Cerrado Brasileiro (TRINDADE *et al.*, 2006).

2.1.2 O Trigo sintético

A variabilidade genética existente dentro e entre as espécies de plantas está intimamente relacionada com a sua evolução (BERED *et al.*, 2000). As espécies silvestres são adaptadas a vários tipos de ambientes e, geralmente, possuem um reservatório de genes úteis aos programas de melhoramento vegetal, em especial, aqueles que garantem resistência a doenças. Essas espécies têm sido utilizadas em cruzamentos interespecíficos que visam a introdução de variabilidade genética e transferência de características desejáveis para espécies cultivadas.

Espécies de trigo poliplóides, tanto selvagens quanto cultivados, evoluíram através da anfidiplóidia ou alopoliplóidia, isto é, seus cromossomos pareiam de uma forma diplóide e o modo de herança das características é dissômico. Essa diploidização tem sido crucial na evolução e domesticação dessas espécies, uma vez que a diploidização genética leva à abundância e redundância de genes, que podem divergir para assumir novas funções (HILU apud FREITAS, 1997).

Levando em consideração que a transferência de genes de uma espécie doadora para uma espécie receptora, no qual o segmento cromossomal deve ser o menor possível, para evitar a transferência de características indesejáveis, surge como alternativa o cruzamento entre espécies que possuem cromossomos homólogos como o trigo e espécies do gênero *Aegilops* que possibilitam a recombinação genética.

Segundo Prestes *et al.* (1994) existe ampla variabilidade dentro da espécie de *A. squarrosa* (também conhecida como *Triticum*

tauschii) quanto à resistência a doenças foliares, uma vez que esta espécie rústica parece ser a doadora dos genes de resistência encontrados no trigo cultivado. Assim, *A. squarrosa* (*T. tauschii*), torna-se uma promissora fonte de introdução de variabilidade genética para *Triticum aestivum*.

Tendo conhecimento do histórico evolutivo do trigo, pesquisadores trabalham na transferência de características de resistência presentes em *A. squarrosa* para o trigo comum, por meio de cruzamentos interespecíficos. Faz-se necessário para este processo a transferência ao nível hexaplóide, através da cruz entre o diplóide (DD) com uma espécie tetraplóide como *Triticum durum*, resultando num híbrido ABD de 21 cromossomos. O embrião resultante deste cruzamento é cultivado *in vitro* após a fertilização, para evitar a degeneração do endosperma. Posteriormente, é feita a aclimação da plântula gerada, e o tratamento com colchicina duplicando o número de cromossomos e dando origem ao que se denomina trigo sintético. Com 42 cromossomos AABBDD e a fertilidade restaurada, viabilizando o cruzamento direto com *Triticum aestivum* (MORAES-FERNANDES, 1985).

O sucesso neste tipo de cruzamento é limitado, alguns cruzamentos mostram-se incompatíveis, os embriões podem não produzir plantas verdes e o desenvolvimento de plantas híbridas pode ser anormal (PRESTES & GOULART, 1995). Entretanto, quando viáveis os genótipos de trigo sintético podem apresentar novos genes capazes de conferir resistência às moléstias que atingem a cultura do trigo.

2.2 O fungo *Pyricularia grisea*

2.2.1 Identificação e denominação

Os fungos do gênero *Pyricularia* são descritos como patógenos causadores de severas doenças em gramíneas, em especial nas culturas do arroz e do trigo.

O fungo *Pyricularia grisea* foi identificado inicialmente como *Trichothecium griseum* Cooke (1879), mas o artigo escrito por Cooke e Ellis não apresentava a descrição do fungo. Em 1880, Saccardo descreveu o gênero *Pyricularia grisea*, isolado da erva daninha *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop, coletado na América do Norte como espécie tipo. Em 1892, Cavara descreveu *Pyricularia oryzae*, como patógeno isolado de plantas de arroz (HEBERT, 1971). Mas, como o teleomorfo é indispensável para a determinação da posição taxonômica dos isolados de *P. grisea*, Hebert em 1971 obteve a fase teleomórfica de isolados de *Pyricularia* em laboratório, constatando que esse ascomiceto se relacionava com a família Diaporthaceae. Mas Yaegashi e Udagawa, em 1978, discordaram de Hebert que classificava o teleomorfo como *Ceratosphaeria grisea*, que não se adequava ao “taxon” pelo habitat graminícola, peritécio com pescoço mais largo, ascos unitunicados e presença de conídios do tipo simpodial na forma imperfeita. Yaegashi e Neshihava, em 1976, sugeriram que o teleomorfo de *Pyricularia* apresentava maiores semelhanças ao gênero *Magnaporthe*. Assim, em 1977, Barr transferiu *C. grisea* para *Magnaporthe grisea*, ascomiceto heterotálico (PURCHIO-MUCHOVEJ & MUCHOVEJ, 1994).

De acordo com Rossman *et al.* (1990), trabalhos têm sugerido que o nome destas duas espécies são sinônimos, mas a literatura se mostra confusa quanto a isto. Por convenção determinou-se que o fungo causador da brusone em arroz seria *Pyricularia oryzae* Cavara e aquele possuidor de uma variada gama de hospedeiros, tanto de espécies liliopsidas quanto de magnoliopsidas seria *Pyricularia grisea* Saccardo. Porém, tem-se utilizado até o momento a denominação *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., tanto para isolados de arroz quanto de outras espécies de gramíneas.

2.2.2 Taxonomia e morfologia

O fungo *Pyricularia grisea*, encontra-se, segundo a classificação taxonômica de Worth *et al.* apud Putzke & Putzke (1998), no Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, Ordem Hyphomycetales, Família Moniliaceae.

O gênero *Pyricularia* compreende um fungo de coloração cinza clara, que entre outras características, apresenta conídios piriformes, hialinos em conidióforos longos, delgados, livres e eretos. Primeiramente os conídios são encontrados aderidos ao conidióforo por uma pequena célula, uma vez o conídio amadurecido, esta pequena célula se divide produzindo um pequeno dentículo na base do conídio, e na lateral do conidióforo conforme a Figura 1 (PURCHIO-MUCHOVEJ & MUCHOVEJ, 1994). Os conídios não apresentam tamanho, nem morfologia únicos, pois ambos são influenciáveis pelo hospedeiro, do qual o fungo foi isolado, assim como o meio de cultura utilizado, a temperatura e a luminosidade disponíveis.

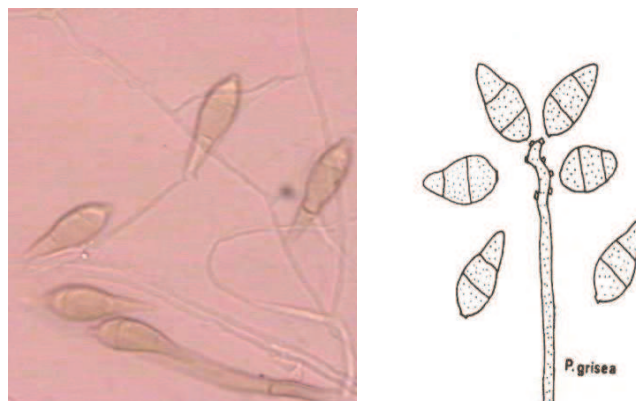


Figura 1 – Conídios e conidióforos de *Pyricularia grisea*.

Fonte: Purchio-Muchovej & Muchovej (1994)

Os isolados de *Pyricularia* de diversas espécies de gramíneas revelaram variação na morfologia dos conídios. Os isolados de arroz possuem dimensões de 13-46,1 x 6-12,5 μm em meio de aveia; 16-39 x 5,5-13,5 μm em meio completo e 12,5-44 x 5,1-13 μm em BDA. Isolados de outras gramíneas apresentaram dimensões que variaram de 12,5-46,1 x 5,1-13,5 μm (PURCHIO-MUCHOVEJ & MUCHOVEJ, 1994).

Em relação à textura da colônia Cárdenas & Hernández (1997), isolaram o patógeno de folhas de arroz e repicaram em diferentes meios. Obtiveram colônias de textura lisa, (esporulativa) e algodonosas (não esporulativas), houve predomínio da coloração verde oliva e o tamanho dos conídios variou conforme o meio.

O gênero monotípico *Magnaporthe*, criado por Krause e Welster em 1972 caracteriza-se por apresentar peritécio escuro,

globoso, pescoço comprido, cilíndrico, ligeiramente projetado, acima da bainha foliar, ascos unitunicados, parede fina, hastes curtas, flutuando levemente dentro do peritécio e dissolvendo-se na maturidade, ascosporos longos funiformes, curvos, tricelulares, ligeiramente constrictos no septo, hialinos ou marrom-amarelado na maturidade, sem estroma como apresentado na Figura 2 (PURCHIO-MUCHOVEJ & MUCHOVEJ, 1994).

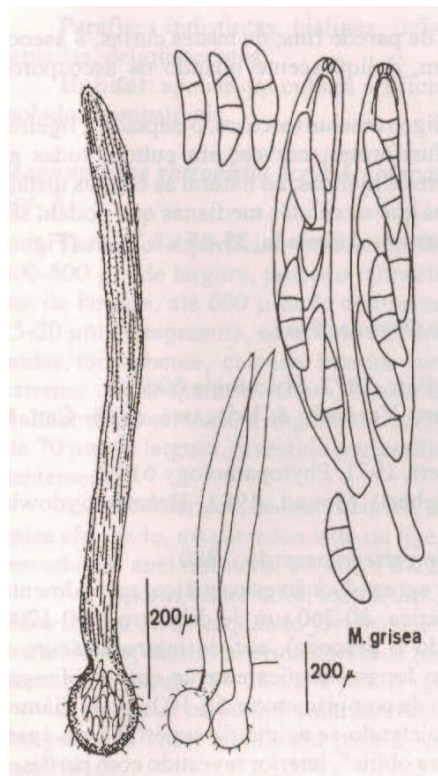


Figura 2 – Ascas e ascosporos de *Magnaporthe grisea*.

Fonte: Purchio-Muchovej & Muchovej (1994)

2.2.3 Variabilidade patogênica de *Pyricularia grisea*

Os fungos filamentosos apresentam mecanismos de variabilidade genética que lhes conferem uma maior adaptação a ambientes e hospedeiros distintos. A variabilidade patogênica de *Pyricularia grisea* do arroz foi demonstrada, entre outras formas, pela diferenciação de raças originárias de uma mesma lesão (OU & AYAD, 1968), ou ainda pelas mudanças de raças patogênicas em um viveiro de brusone durante o período de um mês (QUAMARUZZAMAN & OU, 1970).

O amplo espectro de virulência do fungo tem sido evidenciado através de testes de virulência em uma série diferencial de cultivares, que permite através de sua reação a identificação e monitoramento das raças existentes no local. Ou ainda, testes em casa de vegetação com isolados monospóricos provenientes de cultivares suscetíveis em condições de campo (SILVA *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2005). Além dos testes de virulência, que permitem o agrupamento de isolados a partir das reações de resistência ou suscetibilidade expressa pelos cultivares, o uso de marcadores moleculares tendem a contribuir na identificação de genes de patogenicidade associados à resistência à brusone, e na elucidação da sua interação com o hospedeiro.

Urashima *et al.* (2004) analisando o espectro de virulência de *Magnaporthe grisea* do trigo em planta jovem provenientes dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul detectaram 30 modelos de virulência entre 37 isolados do Mato Grosso do Sul e 25 modelos de virulência de 35 isolados do Paraná. Nenhum dos cultivares de trigo

foram resistentes a todos os isolados, mas apresentaram diferentes espectros de resistência. O trabalho também revelou um grupo comum de isolados que foram hábeis em atacar todos os cultivares.

Em *M. grisea* do arroz, testes visando à elucidação da herança de fertilidade e de patogenicidade do fungo foram realizados por Valent *et al.* (1986). Esses autores através do cruzamento entre linhas do fungo isolados de *Eleusine coracana*, *Eragrostis curvularia* e *Oryza sativa* concluíram que os isolados do arroz são capazes de cruzar com patógenos hermafroditas de outras gramíneas produzindo ascosporos viáveis. E, que a especificidade da espécie hospedeira entre isolados desse fungo pode ter tanto uma base genética complexa como simples. No cruzamento entre os isolados das gramíneas daninhas foi possível identificar um único gene que determina patogenicidade em relação a *Eragrostis curvula*, e um segundo gene diferente não ligado ao anterior que determina patogenicidade em relação a *Eleusine indica*.

A análise genética da patogenicidade de *M. grisea* em trigo foi detectada através de cruzamento de isolados compatíveis de *M. grisea* do trigo e de capim marmelada. A segregação sugeriu que a patogenicidade ao trigo era condicionada por um gene de efeito maior na relação 1:1 e provavelmente o envolvimento de genes de efeito menor, responsáveis pelas lesões intermediárias (URASHIMA, 1999). Em relação a *Pyricularia grisea* do trigo, trabalhos têm evidenciado a possível recombinação entre isolados de trigo e demais gramíneas, sugerindo a possibilidade de uma possível recombinação entre esses organismos na natureza, e que viria a explicar a agressividade desse fungo (URASHIMA *et al.*, 1993).

Urashima *et al.* (2001) analisando a segregação de avirulência entre progênies obtidas de cruzamentos entre isolados de *M. grisea* provenientes de trigo, que diferiam na reação de avirulência e virulência observaram, uma relação de avirulência/virulência de 1:1 nos cultivares CNT 8, BR 17 e OR1. Evidenciou-se a segregação de um gene de avirulência diferente para cada um dos cultivares. Já para os cultivares BR 31 e Iapar 3 foi de 1:3 avirulência/ virulência. Além disso, a recombinação sexual entre os isolados do fungo possibilitou a produção de isolados virulentos a todos os cultivares, fato relacionado à superação de resistência de cultivares ditas resistentes.

2.3 Brusone

2.3.1 Ocorrência

A ocorrência da brusone, doença que possui como agente causal o fungo *Pyricularia grisea* em trigo, na região sul do Brasil foi descrita pela primeira vez por Igarashi *et al.* (1986), no estado do Paraná, nos municípios de Primeiro de Maio, Setanópolis, Rancho Alegre, Londrina, Engenheiro Beltrão e São Pedro do Ivaí no ano de 1985, de forma esporádica. Já no ano de 1986 ocorreu uma maior disseminação da doença nas regiões norte e oeste do Paraná, noroeste de São Paulo e sul do Mato Grosso do Sul, acarretando prejuízos consideráveis no norte do Paraná. A situação se agravou na safra de 1987, quando a doença tomou proporções epidêmicas nas regiões mencionadas anteriormente e provocou perdas parciais ou totais em muitas lavouras. Naquele ano em cerca de 70 municípios, houve prejuízos, estimados em 10 a 12% (IGARASHI, 1988 ab; IGARASHI

et al., 1986). Conforme relatos de Igarashi (1988a), em 1988, a manifestação da doença se deu cerca de 8 a 10 dias após a emergência, devido a presença de sementes infectadas, cultivares suscetíveis, inóculo da safra anterior e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. Na época, a intensidade do ataque foi maior nos Vales do Paranapanema, Ivaí e Tibagi, em especial notada nos cultivares precoces, semeadas até a primeira quinzena de abril. De 1988 a 1992, no Mato Grosso do Sul, foi realizado um trabalho com o objetivo de avaliar os danos causados por *Pyricularia grisea* em trigo, através do qual foi verificado que a importância econômica da brusone decorre das reduções no rendimento e na qualidade dos grãos.

Na safra 2004 a brusone voltou a causar graves prejuízos principalmente no Cerrado brasileiro e no Mato Grosso do Sul, assim como nas regiões Norte e Oeste do estado do Paraná, provocando um alerta geral aos produtores de trigo e cevada nessas regiões.

2.3.2 Ciclo da doença

2.3.2.1 Fontes de inóculo e plantas hospedeiras

A dificuldade para determinar as espécies de *Pyricularia* é motivada pela grande diversidade de plantas hospedeiras do patógeno. O patógeno já foi verificado em mais de 80 gêneros de vegetais, em especial aos da família Poaceae, entre os quais estão incluídas as espécies de interesse agrônômico, ou seja, aquelas cultivadas em grandes áreas e de importante valor econômico, sem se esquecer das plantas daninhas, que segundo alguns autores servem de fonte de inóculo do patógeno, e também se fazem presentes nessas áreas. Dentre as gramíneas infectadas por brusone, merecem destaque os

prejuízos causados nas culturas do arroz, trigo, centeio, cevada e triticales (URASHIMA *et al.*, 1993).

O fungo *Pyricularia grisea* já foi identificado em espécies cultivadas e espontâneas das famílias Poaceae, Cannaceae, Zingiberaceae, Musaceae, Ciperaceae e Commelineaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Polygonaceae, Lauraceae, Juncaceae e Sterculiaceae. Ainda, na Grécia foram identificadas lesões por *Pyricularia* em plantas ornamentais da família Marantaceae (*Ctenanthe oppenheimiana* e *C. setosa*) (PAPPAS & PAPLOMATAS, 1998; PURCHIO-MUCHOVEJ & MUCHOVEJ, 1994).

Como não há unanimidade quanto ao número de hospedeiros de *P. grisea* nem sobre a especificidade de infecção, estudos na área de orizicultura demonstraram que o fungo se perpetua de um ano a outro em resíduos de cultivos infectados, em rebrotes de arroz, e descrevem as sementes e as plantas daninhas como fontes de inóculo primário para a brusone (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). Estas informações também devem ser levadas em consideração, para a cultura do trigo.

No Rio Grande do Sul, já foram identificadas sementes de azevém, gramínea de fácil dispersão nas culturas, em especial nas de inverno, infectadas com *P. grisea* nas safras de 1995/96 e 1997/98 (LUCCA FILHO *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo em que as sementes são consideradas fontes de disseminação de moléstias, podem servir como fontes de inóculo para cultivos posteriores e constituir um veículo para introdução de patógenos em áreas até então livres de determinada doença. Em outubro de 2001, foi identificada a presença

de *P.grisea* em sementes de cevada provenientes do Distrito Federal, sendo este, o primeiro relato da ocorrência deste fungo em sementes de cevada em sistema irrigado por pivô central no cerrado brasileiro (GOULART *et al.*, 2003).

Bruno & Urashima (2001), utilizando isolados de *Magnaporthe grisea* do Brasil, como parentais em estudos de determinação do tipo compatível do fungo, evidenciaram que isolados de brusone proveniente de *Brachiaria plantaginea*, *Triticum aestivum* e *Setaria geniculata*, poderiam influenciar na alta variabilidade de *M. grisea*.

Dados de patogenicidade obtidos em experimento de Urashima & Kato (1998), confirmaram que o organismo causal da brusone do trigo não foi originado do arroz, devido ao insucesso nas inoculações cruzadas entre isolados de ambas as gramíneas. Porém, os isolados de trigo foram compatíveis com os isolados obtidos de ervas daninhas. Mesmo com o resultado desse experimento, não é possível afirmar que gramíneas daninhas sirvam de inóculo para a brusone do trigo.

2.3.2.2 Disseminação

As principais formas de disseminação de conídios de *P. grisea* e de outros fungos que apresentam esporos são: vento, água e restos culturais.

Em especial nas regiões temperadas, no inverno, a sobrevivência do fungo se dá através da infecção de grãos e de palhas dos restos culturais. Nos trópicos a densidade de conídios, no ar é alta,

uma vez que esses são facilmente transportados pelo vento e capazes de introduzir o patógeno em áreas onde não há registro da doença, ou até mesmo provocar a reinfecção em áreas livres de infecção (MEHTA, 1993).

Pyricularia grisea é um fungo de grande esporulação, no arroz estima-se que nas manchas típicas da folha sejam produzidos 2000 a 6000 conídios durante duas semanas, com maior produção à noite até as 3 horas da manhã. Um dos fatores que pode auxiliar a disseminação dos conídios é a chuva, uma vez que os conídios emergem dos conidióforos por meio de pequenas células que quando sofrem pressão hidráulica liberam os conídios para o ar. Justificando as altas densidades de conídios de *Pyricularia grisea* durante a época chuvosa (KRANZ *et al.*, 1982).

2.3.2.3 Transmissão

Pesquisas que visam à confirmação da transmissibilidade de patógenos das sementes para as plantas, freqüentemente são realizadas e, geralmente, confirmam a infecção em plantas jovens (MENTEN & MORAES, 1988).

A transmissão de *Pyricularia grisea* por sementes já foi descrita em trabalhos com diferentes cereais. Conforme Goulart & Paiva (1990), os patógenos presentes nas sementes são potencialmente capazes de desencadear o processo de doença. Utilizando sementes de trigo com 12% de contaminação e/ou infecção natural do fungo, foi registrada a passagem do mesmo para o coleóptilo numa taxa de transmissão de 4:1, em laboratório e confirmada no campo. Em triticale, um experimento semelhante foi realizado e confirmou-se

novamente a transmissão do patógeno das sementes para plântula com dois tipos de sintomas: morte de plântulas e sintomas nas folhas primárias sem a morte de plântulas (MARTINS *et al.*, 2004).

2.3.2.4 Sintomatologia

Na primeira detecção da brusone em trigo, houve o entendimento que esta era uma doença específica da espiga, devido à lesão provocada na ráquis e o branqueamento parcial ou total da espiga, mas, posteriormente, sintomas nos demais órgãos da planta foram evidenciados (IGARASHI, 1988b).

As lesões nas folhas na fase de plântula, são geralmente elípticas, levemente arredondadas com bordas cloróticas, e dimensões variando de 2 a 7 mm x 1 a 3 mm, com abundante frutificação acinzentada na face inferior da folha. Já nas folhas adultas, as lesões apresentam dimensões de 2 a 25 mm x 1 a 2 mm, o centro da lesão varia de branco a castanho claro, com margens levemente escuras e extremidades com prolongamentos castanho avermelhados. As lesões na bainha são elípticas, e medem de 2 a 22 mm x 1 a 3 mm. Nas glumas, as lesões elípticas são de coloração castanho claro a acinzentado nas bordas, provocando a má formação de grãos (IGARASHI, 1988b).

2.3.3 Danos à cultura do trigo causados pela brusone

No estado de Mato Grosso do Sul, Goulart *et al.* (1992), constataram que as áreas experimentais com a cv. Anahuac, nos municípios de Rio Brillhante, Dourados e Itaporã nos anos de 1988 a 1990, apresentaram perdas no rendimento de grãos de 174 kg/ha, ou

seja, 11% da produção total estimada em 1988, em Rio Brillhante, com incidência média de 51% de espigas infectadas. No ano seguinte as perdas foram menores, registrando 270 kg/ha ou 10% do rendimento, com incidência média de 45% de espigas com brusone. Já em 1990, no município de Dourados, as perdas chegaram a 892 kg/ha, representando 40% da produção estimada, com incidência média de 93% de espigas com brusone. Os autores perceberam que em grande número de espigas, ocorria o estrangulamento da ráquis; a produção de grãos de tamanho maior que o normal, uma vez que a ação do fungo na ráquis impediu a passagem da seiva para a parte superior da espiga. Ocorre desta forma, uma compensação de produção por parte da planta. Ainda foi possível constatar que quando a época de infecção ocorria mais cedo, as perdas eram maiores.

Goulart (2004) relatou que nos anos de 1991 e 1992 em Itaporã as perdas alcançaram, em média: 1,806 kg/ha ou 15% do rendimento de grãos, com incidência média de 86% de espigas com brusone. Durante os anos de avaliação foi possível verificar uma redução no peso hectolitro das sementes em relação à época de infecção das espigas por *P. grisea*, menor que 66,0 kg para a infecção precoce, 66,8 kg para infecção tardia e 73,0 kg para as sementes sadias.

Estudos para determinar a relação entre a incidência da brusone em espigas de trigo e a presença de *P. grisea* nas sementes colhidas no Mato Grosso do Sul possibilitaram a constatação dos cultivares suscetíveis ao patógeno na região. Em dois anos de avaliação Goulart *et al.* (1995), constataram que a menor incidência de

brusone foi observada no cultivar BH 1146, que apresentou baixas percentagens de espigas infectadas (4,7 %); as maiores incidências (85%) foram constatadas nos cultivares Iapar 6- Tapejara, Iapar 17- Caeté, Iapar 28- Igapó, Iapar 29- Cacatu, Iac 13- Lorena, Iac 24- Tucuruí, Inia 66, Anahuac, Cocoraque, Jupatico 73, Ocepar 7- Batuira, BR 10- Formosa e BR 31 Muriti. Além disso, foi possível evidenciar uma relação direta entre a incidência de espigas contaminadas e a presença de *P. grisea* nas sementes, proporcionando perdas consideráveis na produção de grãos, conforme os níveis de infecção no campo.

Quanto à escolha de cultivares que apresentem menor percentagem de infecção em espiga, Goulart & Paiva (1992), em seus experimentos relacionaram como resistentes os cultivares BH 1146, BR 11-Guarani, BR 18-Terena e BR 21-Nhandeva. Uma possível explicação para a relação desses cultivares está no ciclo vegetativo mais longo ou intermediário, que pode ter ocorrido devido a um escape, pois a época de espigamento pode ter ocorrido num período desfavorável para o patógeno. Assim os cultivares de ciclo longo e intermediário podem vir a contribuir na diminuição de perdas de grãos pela brusone.

No ano de 2004, no Mato Grosso do Sul, a brusone apareceu com muita intensidade, principalmente nas lavouras plantadas em março e abril. Os levantamentos preliminares de rendimento para a região foram de apenas 425 kg/ha e a produtividade média na safra foi de 1,500-2,000 kg/ha.

No estado do Paraná no ano de 2004, a maior intensidade da doença ocorreu nas regiões de Assaí e Maringá e de menor intensidade em Sertanejo, Rolândia e Araongas. Houve dificuldade no controle da doença, pois no momento da visualização dos sintomas, o fungo já estava instalado. As perdas foram estimadas entre 15 e 20% nas lavouras do norte e 55 % nas lavouras do oeste do estado. Nessa safra, a ocorrência da brusone em maior ou menor intensidade em certas áreas do estado deu-se pela época de semeadura antecipada, pela suscetibilidade dos cultivares plantados, pela falta de estudos que identifiquem o melhor período para o início do tratamento fúngico e pelos níveis variados de controle apresentados pelos novos produtos, uma vez que até então não foram registrados produtos que apresentem níveis de controle acima de 50% no controle da brusone (RIEDE, 2004).

2.3.4 Controle da doença

A cultura do trigo é atacada por uma variedade de patógenos, responsáveis por perdas consideráveis. Para que haja o controle eficiente da doença é necessário um conjunto de técnicas e medidas que devem ser aplicadas conjuntamente. Ou seja, o manejo integrado de doenças nada mais é que a integração de práticas agronômicas com práticas de controle, que regulam a população do patógeno a níveis toleráveis sem causar danos econômicos, porém o seu sucesso depende da seleção de técnicas apropriadas para os diferentes ecossistemas. Dentre esses estão o conhecimento sobre o potencial do patógeno para causar danos; fatores que favorecem o

aumento e a diminuição da doença; práticas agronômicas da cultura e aspectos socioeconômicos (PRABHU & FILIPPI, 2006).

De acordo com Maciel & Prestes (2005) o controle da brusone do trigo requer medidas como o plantio de variedades com maior nível de resistência, utilização de sementes saudáveis, tratamento de sementes, escolha da melhor época de plantio, rotação de culturas, eliminação de hospedeiros alternativos do patógeno, adubação adequada e uso de fungicidas.

Os primeiros fungicidas utilizados para conter a doença nos anos 80 eram à base de ditiocarbamatos associados aos benzimidazóis e/ ou organo-estânicos, aplicados no início do espigamento (5 a 10 %) em intervalos de 12 dias e mostravam níveis satisfatórios de controle na época (IGARASHI, 1988c). A recomendação para o controle químico, baseando-se no potencial produtivo da lavoura e na economia passou a ser realizado no início do espigamento, complementada por outra aplicação em um intervalo de 10 a 12 dias da primeira, quando houve condições propícias para a infecção. Os produtos em forma de mistura de princípios ativos têm apresentado níveis variados de controle, como é o caso de Epoxiconazole + Pyraclostrobium, Azoxystrobin, Propiconazole + Trifloxystrobin e Tebuconazole + Trifloxystrobin. O Tebuconazole e Metconazole, já foram registrados e apresentam eficiência de 30 a 50 % (RIEDE, 2004)

Além da aplicação de fungicidas em plantas, pode-se realizar o tratamento químico em sementes. Os melhores resultados no controle de *P. grisea*, foram obtidos com thiram+ iprodione, carboxin,

triadimenol + anilazine, benomyl + mancozeb, mancoze, etiltranol, iminoctadine, triflumizole + tiofanoto metílico e thiabendazol que erradicaram o patógeno das sementes conforme dados de Goulart *et al.* (1990). Embora o controle químico seja uma das medidas utilizadas para o controle da brusone em trigo, é preciso avaliar os custos que esta medida representa para o produtor e para o meio ambiente. Desta forma, a melhor alternativa para o controle da brusone está no uso de cultivares com algum grau de resistência à doença.

2.4 Resistência

Ao longo do processo evolutivo, as espécies tanto vegetais como animais desenvolveram diferentes mecanismos para garantir a sua perpetuação no ambiente. Dessa forma os principais mecanismos expressos pelas plantas consistem: no escape, na resistência e na tolerância aos variados fatores bióticos e abióticos que possuem a capacidade de causar doença (RIBEIRO DO VALE *et al.*, 2001).

A resistência consiste na capacidade que a planta possui de resistir à penetração ou colonização por um microrganismo parasita, através de mecanismos de defesa tanto estruturais (cutícula, tricomas, estômatos) como bioquímicos (fenóis, alcalóides, fitoalexinas).

Os tipos de resistência costumam ser divididos em: resistência não específica e resistência específica. No caso da brusone

do arroz, a alta variabilidade do fungo costuma fazer com que cultivares com resistência específica, tenham sua resistência superada por novas raças do patógeno dois ou três anos após seu lançamento (PRABHU & FILIPPI, 2006). A resistência específica geralmente é governada por poucos genes de efeito maior, e é de fácil identificação no campo, além disso, os cultivares que possuem esse tipo de resistência não permitem a infecção e colonização de seus tecidos pelo parasito e dessa forma contribuem para diminuição de inóculo do patógeno.

A resistência não específica caracteriza-se por apresentar uma graduação da doença, ou seja, apresenta diferentes níveis de severidade quando exposta a um patógeno. Geralmente é composta por vários genes de efeito menor e aditivo, e uma planta com resistência não específica é resistente contra várias raças ou patótipos de um microrganismo, ou seja, não há especificidade. É o tipo de resistência mais comum de ser encontrada, mas de difícil exploração pelos melhoristas, tendo em vista que, um número maior de genes contribui para a maior diversidade de combinações gênicas em uma população.

Para a brusone do arroz a herança da resistência (específica) pode ser conferida por um a três pares de genes independentes, sendo a resistência dominante, como encontrado por Nunes *et al.* (2007) para os cultivares “Taim” e BRS Firmeza.

De acordo com Prabhu *et al.* (1996) os genótipos nativos de arroz de sequeiro apresentam resistência não específica para brusone em folha e foram correlacionadas positivamente com as

severidades médias de brusone no pescoço das panículas. A expressão da resistência não específica é alterada pelo ambiente e pela população do patógeno, e sua herdabilidade à brusone é baixa (WANG *et al.*, 1989).

A resistência de brusone nas folhas e na panícula, também tem sido objeto de estudos na fitopatologia. Para alguns autores este tipo de resistência provavelmente é controlada por genes distintos, pois há cultivares que se mostram resistentes em uma fase e suscetíveis em outra, além disso o nível de resistência quantitativa de brusone no campo nem sempre coincide com os resultados em planta jovem (PRABHU & FILIPI, 2006; HWANG *et al.*, 1987; KOH *et al.*, 1987). A perda da correspondência entre os testes de resistência em folha e panícula, pode ser atribuída parte às diferenças ambientais e à diferença entre os cultivares em relação ao seu período de florescimento (BONMAN, 1992). Prabhu *et al.* (1996) encontraram correlação positiva entre a brusone nas folhas e nas panículas, sob condições de campo. Resultados semelhantes foram encontrados no patossistema *Pyricularia grisea* – trigo, no qual houve correlação positiva entre suscetibilidade nas folhas no estágio vegetativo e nas espigas (ARRUDA *et al.*, 2005).

2.5 Marcadores moleculares-microsatélites

A manipulação assistida por marcadores moleculares é uma das técnicas mais recentes utilizadas nos programas de melhoramento vegetal, os quais visam maior eficiência na transferência de fatores genéticos. Marcadores moleculares ligados a

características de importância econômica têm sido desenvolvidos para diferentes culturas e permitem a seleção de características desejáveis em populações segregantes. Dessa forma, os marcadores se tornam úteis por reduzir o tempo e o trabalho de seleção por várias gerações, antes necessárias no melhoramento tradicional para criação de um cultivar por exemplo (CAIXETA *et al.*, 2006).

Marcadores moleculares são características do DNA, herdadas geneticamente, capazes de diferenciar indivíduos. Os marcadores moleculares são diferenciados pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA: hibridação ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Os revelados por amplificação são: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e Microssatélites (ou SSR- *Simple Sequence Repeats*) (MILACH,1998).

Os marcadores RFLP surgiram no início dos anos 70 e detectam a variação ou polimorfismo (diferentes alelos em um *locus*) em seqüências de DNA de 4 a 8 pares de base, reconhecidas por enzimas de restrição. O polimorfismo verificado por esse marcador pode ser decorrente da criação ou eliminação de sítios de restrição, devido à substituição ou modificação de pares de bases (mutações), ou, rearranjo dos segmentos de DNA por deleções, inserções, inversões ou translocações nas fitas de DNA. A técnica consiste na extração do DNA; digestão com enzimas de restrição; separação dos

fragmentos por eletroforese, transferência do DNA para uma membrana de nitrocelulose; hibridação da membrana com sonda molecular radioativa; exposição da membrana a filme de raio x (BRAMMER, 2005; MILACH, 1998). Entre as vantagens do uso desses marcadores estão sua expressão co-dominante, e o fato de não serem afetados por pleiotropia, epistasia ou variações ambientais. Os resultados apresentado por esse marcador é altamente estável e reproduzível. A técnica RFLP tem custo elevado e é laboriosa por envolver a execução de muitas etapas, que requerem investimentos em pessoal, equipamentos, químicos e cuidados especiais na utilização de sondas radioativas (CAIXETA *et al.*, 2006; CAVALLI, 2003).

Os marcadores identificados por amplificação de DNA baseiam-se na reação em cadeia de polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), técnica desenvolvida em meados dos anos 80. A PCR é uma técnica usada para amplificar pequenas seqüências específicas de nucleotídios, a partir de pequena quantidade de DNA (BRAMMER, 2005). As etapas básicas do PCR são: desnaturação do DNA; anelamento dos *primers*; extensão das cadeias de DNA que estão sendo amplificadas. A técnica de RAPD utiliza *primers* de seqüência arbitrária para a amplificação do DNA, os quais podem encontrar várias regiões complementares à sua seqüência, distribuída em diversos pontos do genoma e formar muitas bandas. A principal característica desse tipo de marcador é a dominância, ou seja, não permite distinguir indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos em uma população. As vantagens desse marcador são: simplicidade, rapidez na obtenção de dados, custo reduzido e aplicabilidade a qualquer organismo. A principal limitação é o baixo

conteúdo de informações genéticas em cada loco, além da baixa reprodutividade dos resultados entre laboratórios (CAIXETA *et al.*, 2006).

Os marcadores AFLP baseiam-se na amplificação do DNA via PCR para detectar diferenças em fragmentos selecionados e digeridos com enzima de restrição. A metodologia envolve a digestão do DNA com duas endonucleases de restrição; ligação de adaptadores específicos; amplificação seletiva de fragmentos com *primers* específicos e separação dos fragmentos por eletroforese em gel de poliacrilamida. Dentre as principais características desses marcadores está a habilidade de analisar grande número de locos polimórficos com uma combinação de *primers* em um gel. Através do alto grau informativo dos marcadores AFLP, os mesmos são utilizados principalmente na construção de mapas de ligação e clonagem de genes de interesse. Mas, a grande desvantagem dessa técnica está na identificação de variantes alélicas em um loco específico, levando a utilização do mesmo, como dominante (CAIXETA *et al.*, 2006).

Os marcadores microssatélites são também conhecidos como seqüências simples repetidas (SSR- *Simple Sequence Repeats*) ou pequenas seqüências repetidas em cadeia (STR- *Short Tandem Repeats*), são regiões repetidas de DNA não codificantes, compostas por pequenas repetições de 1 a 6 nucleotídeos, os quais são distribuídos no genoma de eucariotos e procariotos. As seqüências microssatélites costumam ser relacionadas à variabilidade genética e patogênica de microrganismos, e podem estar associadas com a modulação da expressão de genes desses organismos. Essas

seqüências repetitivas são encontradas com frequência em genes de virulência em patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, que permite a seleção de *primers* específicos para amplificação por PCR. Os produtos da amplificação podem ser visualizados em géis de poliacrilamida ou agarose corados com nitrato de prata ou brometo de etídio, ou através do uso de *primers* fluorescentes em seqüenciador semi-automático de DNA (CAIXETA *et al.*, 2006; MILACH, 1998).

A constante substituição de outros marcadores moleculares pelo uso de microssatélites está entre outras características pela sua reprodutibilidade e simplicidade técnica; a pequena quantidade de DNA requerida; ao baixo custo; ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo. A variação no tamanho do produto de amplificação por PCR, resulta da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura dos microssatélites, a qual pode ser originada de *crossing over* desigual ou erro da DNA polimerase durante a replicação, ou ainda, pela deleção e inserção de uma base ou de fragmentos longos de DNA em regiões flanqueadoras. Porém independente da origem da variação, os marcadores microssatélites destacam-se dos demais marcadores por constituir um loco genético altamente variável, multialélico e informativo (CAIXETA *et al.*, 2006; CAVALLI, 2003).

Os microssatélites constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares. O alto nível de diversidade alélica desses marcadores possibilita o uso dos mesmos no

mapeamento genético de populações segregantes. Além de propiciar a ligação entre variações fenotípicas e genotípicas de diferentes espécies. Os microssatélites apresentam vantagens sobre os demais marcadores baseados no PCR por terem uma distribuição freqüente e aleatória, que permitem a cobertura ampla do genoma e serem co-dominantes. Ou seja, possuem a capacidade de distinguir os indivíduos homozigotos dos heterozigotos. A grande limitação dos microssatélites é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos para cada espécie (CAIXETA *et al.*, 2006; MILACH, 1998).

2.6 Marcadores moleculares em *Pyricularia grisea*

O estudo de variabilidade genética de *Pyricularia grisea* utilizando marcadores moleculares é realizado desde 1989 (HAMER *et al.*, 1989) através da técnica de RFLP, através do uso da sonda MGR-586 (*Magnaporthe grisea repeats*) que hibridiza com regiões microssatélites presentes no genoma do fungo (GARRIDO, 2001). Geralmente *P. grisea* oriunda de hospedeiros diferentes do arroz contém um ou poucos fragmentos que hibridizam com as sondas MGR. A sonda MGR-586 possui 1860 pb repetindo-se no genoma do fungo em torno de 46 vezes, tem sido utilizada para caracterização de populações do patógeno (ZEIGLER *et al.*, 1995; SHULL & HAMER, 1994).

Em função das dificuldades em trabalhar com marcadores RFLP como a quantidade e qualidade de DNA necessários para a análise, os custos em equipamento, reagentes, pessoal treinado, cuidados com as sondas radioativas, e número restrito de amostras analisadas, George *et al.* (1998) desenvolveram uma técnica que

combina a simplicidade do PCR com o polimorfismo detectado pelo RFLP. A técnica foi denominada rep-PCR, reação da cadeia da polimerase baseada em elementos repetitivos, a qual gera DNA *fingerprint* por amplificação de seqüências entre cópias de elementos dispersadas no genoma do fungo. Essa técnica usa os *primers Pot2-1 e Pot2-2*, também é conhecida como *Pot2 rep-PCR* usada em substituição à sonda MGR-586 para estudos da diversidade genética em *P. grisea* do arroz (PRABHU *et al.*, 2007; MACIEL *et al.*, 2004; PRABHU *et al.*, 2002).

O *Pot2* é um transposon, um elemento repetitivo, presente em grande número de cópias (± 100), dispersado pelo genoma de *P. grisea* de arroz e outros hospedeiros, apresenta características estruturais semelhantes às observadas em MGR-586 (GEORGE *et al.*, 1998; ZEIGLER *et al.*, 1998).

Marcadores microssatélites também foram usados para caracterização molecular de *Pyricularia grisea* do arroz. Sabendo-se da capacidade dos marcadores microssatélites em detectar pequenos polimorfismos, Brondani *et al.* (2000), desenvolveram marcadores moleculares para análise genética de *Magnaporthe grisea*. Os pesquisadores genotiparam isolados monospóricos de *M. grisea* de arroz e trigo do Brasil, Colômbia e China em três locus microssatélite. Os isolados do sudeste do Brasil foram predominantemente monomórficos, mas nos isolados do Brasil-Central sete alelos foram observados para o locus MGM-1 e nove alelos nas amostras da Colômbia. Assim, evidenciou-se a existência de variabilidade genética entre isolados de uma mesma região geográfica para esse locus. Além

da possibilidade da construção de novos *primers* que permitem a análise de outros *loci* do patógeno que possam estar relacionados à especificidade e patogenicidade de *P. grisea*. Garrido (2001) conseguiu classificar os isolados de *P. grisea* obtidos em todo o Brasil em três grandes grupos através da genotipagem com uma bateria de 13 microssatélites: (1) isolados obtidos de arroz irrigado, (2) isolados de arroz de sequeiro e (3) isolados patogênicos a outras gramíneas. Recentemente um conjunto de 18 marcadores microssatélites para *P. grisea* foi capaz de detectar amplo polimorfismo em populações de seis diferentes países (ADREIT *et al.*, 2007).

Desta forma, é possível constatar que o uso de ferramentas moleculares, em especial os microssatélites até então extremamente informativos na genotipagem de espécies vegetais (RÖDER *et al.*, 1998) também são capazes de ser altamente informativos na discriminação de indivíduos e, ou populações de fungos fitopatogênicos. Sendo capazes de auxiliar no monitoramento e caracterização dessas populações graças à sensibilidade do marcador em detectar pequenos polimorfismos e possuir caráter co-dominante, além de contribuir para a criação de cultivares resistentes a populações do patógeno de um determinado local.

CAPÍTULO I

VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia grisea* E REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE TRIGO À BRUSONE

Maria Fernanda Antunes da Cruz¹, Ariano Moraes Prestes² & João Leodato Nunes Maciel³

RESUMO- A brusone do trigo, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* foi descrita no Brasil, no estado do Paraná, em 1985. Desde então, busca-se em germoplasma disponível no País, cultivares resistentes à doença, já que o controle químico não tem se mostrado suficientemente eficaz. Os objetivos deste trabalho foram identificar os padrões de virulência de isolados de *P.grisea*, verificar e correlacionar o grau de resistência de genótipos de trigo comum e sintético no estágio de planta jovem e planta adulta. O espectro de virulência dos 18 isolados monospóricos, quando inoculados sobre 70 genótipos de trigo em planta jovem revelou homogeneidade entre os mesmos (75% de similaridade entre si), com exceção dos isolados Py 5002 e Py 5038 que apresentaram um padrão de virulência diferenciado dos demais. Entre os genótipos resistentes em planta jovem (reação e severidade) destacaram-se BRS 229, BRS 179, CNT

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro), FAMV/UPF, área de concentração em Fitopatologia

² Orientador, Eng.-Agr., PhD., Professor do PPGAgro, FAMV/UPF

³ Co-orientador, Eng.-Agr., Dr., Pesquisador da Embrapa Trigo

8, BRS 120, BRS Buriti. Porém, em relação à severidade em folha bandeira e espiga destacaram-se por apresentar menor área foliar e de espiga afetada pela doença o cultivar CNT 8 e os genótipos de trigo sintético: NE 20156-B, PF 844001, PF 964009 e PF 804002. Não houve correlação entre os dados de planta jovem e planta adulta, e a correlação entre reação em espiga e folha bandeira foi de 54%, indicando que a resistência à brusone é controlada por genes que se expressam independentemente da parte da planta afetada.

Palavras-chave: brusone, genes de resistência, resistência de planta jovem, resistência de planta adulta

VIRULENCE OF *Pyricularia grisea* ISOLATES AND REACTION OF WHEAT GENOTYPES TO BLAST

ABSTRACT- The wheat blast caused by *Pyricularia grisea* fungi was described in 1985, in the State of Parana, Brazil. From then on, the researchers seek into wheat Brazilian germoplasma for resistant genotypes to blast disease, once to chemical control have not been efficient. The objectives of this work were to identify virulence pattern of *P. grisea* isolates and, to verify and correlation the level of resistance of synthetic and common wheat genotypes in young and adult stages. The virulence spectra of 18 isolates when inoculated on 70 seedlings genotypes revealed homogeny among isolates (75 %), except the Py 5002 and Py 5038, which presented different virulence

from the others. Among genotypes tested BRS 229, BRS 179, CNT 8, BRS 120, BRS Buriti, in seedling, and CNT 8, NE 20156-B, PF 844001, PF 964009 and PF 804002 in adult plant showed less leaf and head area affected by blast. There was not correlation between young plant and adult plant. The correlation between flag leaf and heads was 54%. The dates indicate that blast resistance is controlled by genes that are expressed according with growth stages and parts plant affected.

Key-words: blast, resistance genes, seedling resistance, adult resistance

1 INTRODUÇÃO

A brusone do trigo causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., foi diagnosticada no Brasil em 1985, no estado do Paraná (IGARASHI *et al.*, 1986) e atingiu níveis epidêmicos no Cerrado brasileiro no ano de 2004 (GOULART, 2004). Entretanto, a brusone em arroz é uma das principais doenças e tem sido intensamente pesquisada nos últimos anos.

Na cultura do arroz, uma das principais medidas para o controle da brusone é o uso de cultivares resistentes. Porém, o fungo possui a capacidade de superar a resistência do cultivar, dois a três anos após o seu lançamento. Segundo Levy *et al.* (1993) a superação da resistência do cultivar se dá pela ocorrência de trocas genéticas entre isolados do patógeno, que produz variantes de virulência, ou pelo aumento da frequência de patótipos de ocorrência rara. Dessa forma, ensaios de inoculação têm sido realizados para identificação de variantes do patógeno ao longo dos anos. O uso de uma série diferencial de cultivares que quando submetida à inoculação, apresenta reações distintas a isolados do fungo, permite a identificação da raça fisiológica ou patótipos do patógeno (PRABHU & FILIPPI, 2006).

Alguns critérios têm sido propostos por diferentes autores para o agrupamento de isolados geneticamente relacionados. Os isolados de *P. grisea* do arroz que apresentam mais de 85% de similaridade genética em testes moleculares têm sido denominados linhagens (FILIPPI & PRABHU, 2001). Essa estratégia também tem

sido utilizada para caracterização do espectro de virulência da população do fungo (MACIEL *et al.*, 2004). É uma prática eficiente no monitoramento da população do patógeno e, na identificação da resistência de cultivares a serem lançadas a variantes do patógeno. Eleger uma série de cultivares de trigo diferencial é um avanço importante para determinar raças fisiológicas ou patótipos do patógeno em trigo. No entanto, este avanço apenas será eficiente mediante a identificação de cultivares resistentes aos isolados de *P. grisea*.

A busca por cultivares de trigo resistentes à brusone, tem sido feita desde o aparecimento da doença nas principais regiões tritícolas do Brasil (GOULART *et al.*, 1995; GOULART & PAIVA, 1993; GOULART & PAIVA, 1992; GOULART *et al.*, 1992; GOULART *et al.*, 1990). Em condições de campo, os cultivares de trigo comercial BH 1146, IAC 8, IAC 24, IAC 28, IAC 162 foram considerados resistentes no estado de São Paulo (BARROS *et al.*, 1989). No Mato Grosso do Sul, destacou-se como resistente na safra de 2004 o cultivar BR 18 com menos de 30% de espigas infectadas, enquanto que os genótipos suscetíveis apresentaram mais de 80% de espigas infectadas: Alcover, Ônix, Taurus, OR-1, IPR 85, BRS 208, BRS 209, BRS 210 E BR 40 (GOULART, 2004). Nas inoculações em casa-de-vegetação os cultivares: BR 18, BRS 120, BRS 220, BRS 49, IAPAR 53, PF 980571, IA 0310 foram considerados resistentes com menos de 25% da espiga infectada (PRESTES *et al.*, 2007). Entretanto, a reação desses cultivares não se confirma em diferentes regiões geográficas, ou em, condições controladas.

De acordo com Urashima *et al.* (2004), as diferenças entre os resultados obtidos nos experimentos conduzidos até hoje, podem ser atribuídas à variabilidade do patógeno. Os autores responsáveis por esses experimentos enfatizam a necessidade de submeter os cultivares de trigo a inoculações com patótipos que representem diferentes populações do patógeno, para que seja possível a identificação de genótipos resistentes. Dessa forma, constata-se que as informações inerentes aos cultivares resistentes ou possíveis fontes de resistência à brusone em trigo ainda são insuficientes. Assim como, a relação de resistência nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta, ambos carecem de estudos adicionais.

A busca de fontes de resistência à brusone em trigo tem sido apontada como prioritária em programas de melhoramento de trigo para a região de Cerrados do Brasil e as espécies afins aparecem como alternativa. Germoplasma de espécies afins ao trigo cultivado, como *Triticum tauschii* (sinonímia *Aegilops squarrosa*, *Aegilops tauschii*) já foi explorado como fonte de resistência a manchas foliares (PRESTES *et al.*, 1994) e apresentou resultados satisfatórios. Acessos dessa espécie também apresentaram reação de resistência a isolados de *P. grisea*, em ensaios conduzidos por Urashima & Kato (1994), demonstrando a importância da utilização dessa espécie em programas de melhoramento que visem resistência a doenças de trigo.

Além da busca de genótipos resistentes à brusone, a fase de desenvolvimento da planta na qual a resistência é expressa, ainda é uma incógnita para a cultura do trigo. Resultados obtidos com a cultura do arroz mostram que a relação entre reação de resistência à

brusone em planta jovem e planta adulta têm sido discrepantes ao longo dos vários anos de pesquisa. Genótipos de arroz que apresentam resistência em folha de planta jovem, não manifestam resistência à infecção nas panículas, mas a relação inversa também tem ocorrido (BONMAN *et al.*, 1989; HWANG, *et al.*, 1987). De acordo com Prabhu & Filippi (2006), a expressão da resistência nas panículas é menos completa e mais complexa que nas folhas. A reação nas folhas e nas panículas são controlados por diferentes genes herdados independentemente. Entretanto, Arruda *et al.* (2005) evidenciaram correlação positiva entre suscetibilidade de folhas no estágio vegetativo e de espigas no estágio reprodutivo de trigo.

O esclarecimento dos mecanismos que controlam a resistência de genótipos de trigo à brusone em folha e espiga e nos diferentes estádios de desenvolvimento, certamente representa um avanço significativo para programas de melhoramento. Tendo em vista que, possibilitará a partir da resposta de diferentes genótipos, a formulação de estratégias que visem aproveitar as peculiaridades de cada um para a obtenção de germoplasma que apresente algum nível de resistência à brusone. Além de possibilitar a determinação do melhor momento para seleção de genótipos resistentes a essa doença.

Os objetivos deste trabalho foram identificar os padrões de virulência de isolados de *P.grisea* do trigo, verificar o grau de resistência de genótipos de trigo comum e sintético no estágio 14 e 60,61 da escala de Zadoks *et al.*(1974), e comparar a resposta dos estádios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia e casa-de-vegetação na Embrapa Trigo, Passo Fundo.

2.1 Isolados

Utilizou-se 18 isolados monospóricos de *Pyricularia 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 utilizadas folhas, ráquis e glumas de trigo com sintomas de brusone. Realizou-se a assepsia do material, que permaneceu em câmara úmida por 24 horas. 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 horas, apenas os conídios germinados foram transferidos para o meio aveia-água até o desenvolvimento da colônia.

A preservação dos isolados foi realizada através do preenchimento de placas de petri, contendo meio aveia-água, com pedaços de papel filtro (1x1 cm). As colônias do fungo crescidas foram raspadas com uma espátula, e o micélio transferido para placas de petri contendo meio de cultura e pedaços de papel filtro. As placas permaneceram em câmara de crescimento por 10 dias, à temperatura de 23 ± 2 °C, e fotoperíodo 12 horas. 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 à temperatura de – 20 °C.

Tabela 1- Relação de isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizados no experimento. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Nº	Designação	Origem	Cultivar	Segmento da planta ¹	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

¹ Estrutura vegetal da qual foi obtido o isolado

2.2 Genótipos

Para a primeira etapa do trabalho foram escolhidos, no Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Trigo, 70 genótipos de trigo, os quais foram utilizados nas inoculações no estágio de planta jovem (estádio 14 da escala de ZADOKS *et al.*, 1974). Desses, 50 são cultivares comerciais e linhagens de trigo hexaplóide e 20 genótipos

de trigo hexaplóide sintético, resultante do cruzamento entre *Triticum durum* e *Aegilops squarrosa*. Os genótipos foram escolhidos através de uma seleção que procurou estabelecer um grupo com ampla diversidade genética (Tabela 2). Para a avaliação da reação de planta adulta (estádio 60,61 da escala de ZADOKS *et al.*, 1974) foram selecionados 12 genótipos entre os 70 genótipos utilizados nas inoculações no estágio de planta jovem. Sendo cinco desses de trigo sintético (NE 20156-B; PF 844001; PF 844002; PF 964009; PF 804002) e sete cultivares de panificação (CNT8; BRS 120; BRS 194; BRS Buriti; BR 18; BRS Camboatá e BRS Louro).

Para os testes em planta jovem, os genótipos utilizados foram semeados em copos plásticos com capacidade de 0,5 Kg, preenchidos com solo de lavoura, em três repetições com 8 plantas por repetição. Na etapa de planta adulta os genótipos foram semeados em vasos com capacidade de 3 Kg, preenchidos com solo de lavoura, em quatro repetições com quatro plantas.

2.3 Preparação do inóculo

Os isolados mantidos em papel filtro foram repicados em placas de petri com meio de aveia-ágar, e incubados 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. O volume de suspensão para cada inoculação em planta jovem foi de 500 mL e para planta adulta, 300 mL, numa concentração de 2×10^5 conídios/mL.

Tabela 2- Relação de genótipos utilizados no experimento na fase de planta jovem. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Nº	Origem	Genótipos	Nº	Origem	Genótipos
1*	2	NE 20156-B	36	65	EMBRAPA 40
2	5	NE 20157-X	37	66	FRONTANA
3	6	NE 20160-C	38	67	IAC 5
4	8	PF 844001	39	68	IAC 24
5	9	PF 844002	40	69	IAPAR 6
6	23	PF 964009	41	71	IAS 54
7	25	PF 804001	42	72	JACUÍ
8	26	PF 804002	43	73	KLEIN
9	31	NE 20158-X	44	74	LA 1549
10	32	NE 20159-B	45	75	OCEPAR 16
11	33	NE 20159-C	46	76	PELADINHO
12	34	NE 20159-X	47	77	PG 1
13	36	NE 20159-Z	48	79	TOROPI
14	37	NE 20160-A	49	80	OR 1
15	38	NE 20160-B	50	81	NOBRE
16	39	NE 20160-Y	51	82	ALIANÇA
17	40	NE 20160-Z	52	83	BRS 120
18	43	IPF 71404	53	84	BRS 177
19	102	SINTÉTICO 01	54	85	BRS 179
20	47	NE 20168-P	55	86	BRS 194
21	50	ANAHUAC	56	87	BRS 208
22	51	BH 1146	57	88	BRS 209
23	52	BR 12	58	89	BRS 210
24	53	BR 14	59	90	BRS 220
25	54	BR 18	60	91	BRS 229
26	55	BR 23	61	92	BURITI
27	56	BR 33	62	93	CAMBOATÁ
28	57	BR 35	63	94	GUABIJU
29	58	CEP 14	64	95	LOURO
30	59	CEP 19	65	96	TIMBAÚVA
31	60	CEP 24	66	97	BRILHANTE
32	61	CNT 8	67	98	IAPAR 53
33	62	CNT 10	68	99	IPR 85
34	63	EMBRAPA 16	69	100	PF 001102
35	64	EMBRAPA 27	70	101	BRS 49

* genótipos numerados de 1 a 20 são trigo sintético, os demais são genótipos de trigo comum

2.4 Inoculação

Antes da inoculação, as plantas foram climatizadas por 24 horas à temperatura de 24 °C. A inoculação em folha nas plantas jovens foi executada de acordo com a escala de Zadoks *et al.* (1974) no estágio 14, ou seja, no momento em que a planta apresentava quatro folhas expandidas, e no estágio de planta adulta no estágio 60,61 da mesma escala, ou seja, no início da antese. Utilizou-se um pulverizador De Vilbiss, ligado a um compressor de ar. Após a inoculação as plantas foram incubadas por 24 horas em escuro total, numa temperatura de 24 °C sob nebulização de 120 s em intervalos de 60s. Após 24 horas, o fotoperíodo foi ajustado para 12 horas de luz e a nebulização para 60 s a cada 1800 s.

2.5 Avaliações

A reação à doença, dos diferentes genótipos 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 cinco tipos de infecção presentes na folha, 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. As reações correspondentes às notas 0, 1 e 2 foram classificadas como de resistência e aquelas correspondentes a 3 e 4, como de suscetibilidade conforme ilustrado na Figura 1.



Figura 1- Tipos de lesões de *Pyricularia grisea* em trigo. (A) Lesões tipo 1 (a) e 2 (b), coloração amarronzada e não esporulativas. (B) Lesão tipo 4, manchas elípticas com centro discernível esporulativas. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

A severidade da doença nas folhas de cada genótipo de trigo, quando submetidos à inoculação nos estádios de planta jovem e planta adulta foi avaliada com o auxílio da escala diagramática preconizada pelo sistema internacional de avaliações de doenças do arroz (INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 1996) com algumas modificações. Zero significa ausência de sintomas; 1 (um), 0,1 a 4 % da área foliar infectada (AFI); 2 (dois), 5 a 10% AFI; 3 (três), 11 a 25% AFI; 4 (quatro), 26 a 50% AFI; 5 (cinco), 51 a 100% da área foliar afetada. Para a avaliação nas espigas, utilizou-se

a mesma escala, considerando simplesmente a área da espiga afetada pela doença. No estágio de planta jovem foi avaliada a segunda folha de cada planta, totalizando 24 folhas por genótipo (8 folhas/repetição). No estágio de planta adulta avaliou-se a folha bandeira e a espiga de cada planta/genótipo. No total foram avaliadas 16 plantas/ genótipo (4 plantas/repetição). Em ambas as etapas o delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado.

2.6 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados da fase de planta jovem construiu-se uma matriz binária. Nessa matriz substituiu-se os valores das reações de resistência pelo valor 0 e as reações de suscetibilidade pelo valor 1. Ou seja, quando duas das três repetições apresentavam mais de 50% de plantas com notas 0, 1 e 2, atribuía-se ao genótipo o valor 0, caso contrário atribuía-se o valor 1 (URASHIMA *et al.*, 1993). A partir da matriz binária foi possível gerar um dendrograma com base na reação dos genótipos de trigo quando submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *P. grisea*. Para construção do dendrograma utilizou-se o programa NTSYSpc 2.02 (ROHLF, 1997). Para a estimativa da similaridade genética entre os isolados foi utilizado o coeficiente de Jaccard. Um coeficiente binário, que expressa a proporção de caracteres que dois objetos possuem mutuamente quando comparados com o número total de caracteres possuídos por um dos objetos, ou por ambos, mas desconsidera a ausência em ambos os objetos.

Coeficiente de Jaccard= $a/(a+b+c)$ em que:

a= presença do caráter em ambos os objetos;

b= caráter presente em um dos objetos e ausente no outro;

c=caráter ausente em um objeto e presente no outro;

Para o agrupamento hierárquico dos isolados utilizou-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group method Using Arithmetic Averages*). Esse método não considera a estrutura de subdivisão do grupo, atribui pesos iguais a cada indivíduo do grupo e calcula a similaridade média de um indivíduo que pretende se juntar ao grupo (MEYER, 2002).

Para o agrupamento dos 70 genótipos de acordo com a severidade das lesões de suscetibilidade apresentado, pelos mesmos no estádio de planta jovem, os dados utilizados foram as notas médias da escala que cada genótipo apresentou quando inoculado com cada um dos 18 isolados. Esses dados serviram para a construção de um dendrograma, utilizando o método UPGMA e o programa computacional Darwin (PERRIER & JACQUEMOUD-COLLET, 2006). Para a estimativa de dissimilaridade genética utilizou-se a Distância Euclidiana (D). A Distância Euclidiana é considerada uma medida de dissimilaridade, interpretada como a distância entre dois indivíduos, cujas posições são determinadas em relação às suas coordenadas definidas com referência a um grupo de eixos cartesianos, os quais possuem ângulos retos entre si, dada pela fórmula:

$$d_{ij} = [(x_{ia} - x_{ja})^2 + (x_{ib} - x_{jb})^2]^{1/2} \text{ na qual:}$$

x_{ia} e x_{ib} = as características a e b do indivíduo i

x_{ja} e x_{jb} = as características a e b do indivíduo j

O programa SAS (*Statistical Analysis System*) foi utilizado para análise dos dados de severidade em folha bandeira e espiga. Os dados utilizados foram as notas médias da escala, que cada genótipo apresentou quando submetido à inoculação com cada um dos 18 isolados do patógeno. Procedeu-se a análise da variância e as médias dos isolados e genótipos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A correlação entre a severidade em espiga e folha bandeira foi calculada através do coeficiente de correlação, entre as variáveis. Os valores utilizados nesse caso, não foram transformados para escala.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, em planta jovem em relação ao tipo de lesão predominante, nenhum genótipo foi resistente a todos os isolados, sendo que seis acessos foram suscetíveis aos dezoito isolados testados. Entre os genótipos classificados como resistentes destacaram-se BRS 229 e BRS Buriti que foram resistentes a seis e cinco isolados respectivamente. Os genótipos NE 20159-C, NE 20160-A, NE 20160-B, NE 20160-Z, Anahuac, IAC 5, Toropi, OR 1 e Jacuí foram suscetíveis a todos os 18 isolados testados (dados não apresentados). Todos os isolados testados foram patogênicos em trigo, mas os isolados Py 5001, Py 5005, Py 5025, Py 5029, Py 5039, Py 6010 foram virulentos a todos os genótipos testados. Esses isolados foram coletados de diferentes cultivares de trigo cultivado nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais (Tabela 1). Segundo

Urashima *et al.* (2004) os isolados de *P. grisea* devem possuir um grande número de genes de virulência capazes de vencer os possíveis genes de resistência dos genótipos.

O dendrograma baseado na análise hierárquica dos dados de reação em planta jovem (Figura 2) permitiu classificar os isolados em três linhagens, com número diferente de componentes, identificados pelas letras a', b', c', considerando a similaridade mínima de 75% entre isolados (FILIPPI & PRABHU, 2001). Quinze dos 18 isolados testados apresentaram mais de 85% de similaridade entre si. Desse grupo, um conjunto de isolados com 100% de similaridade destacou-se dos demais, por agrupar indivíduos de diferentes origens, mas que propiciaram uma reação de suscetibilidade em todos os genótipos testados. O isolado Py 5002 apresentou cerca de 32% de similaridade com os demais isolados e destacou-se por ser o menos virulento a todos os genótipos testados, embora possua a mesma origem que Py 5001 (Tabela 1). O isolado Py 5038 (linhagem b') juntamente com o isolado Py 5002 apresentaram um padrão de virulência diferente dos demais isolados, que compuseram a linhagem a'. No grupo de virulência a' encontram-se isolados de todas as regiões geográficas amostradas, sendo que com exceção de Py 5020, os demais isolados apresentaram no mínimo 85% de similaridade entre si.

Embora, os isolados de *P. grisea* tenham apresentado um estreito espectro de virulência por serem compatíveis com a maioria dos cultivares testados; os cultivares resistentes diferiram entre os isolados. A partir dessa reação diferencial dos cultivares foi

possível selecionar 14 genótipos de trigo sintético e comum (Tabela 3), o que sugere a diferenciação dos isolados em patótipos. Da mesma forma que, na cultura do arroz as raças de *P. grisea* são identificadas a partir da reação de uma série diferencial de cultivares, a série diferencial de trigo proposta neste trabalho, permite a identificação de 13 patótipos a partir de 18 isolados testados. Com exceção dos isolados que foram patogênicos a todos os cultivares e foram denominados como pertencentes ao patótipo I, os demais isolados foram pertencentes a patótipos distintos.

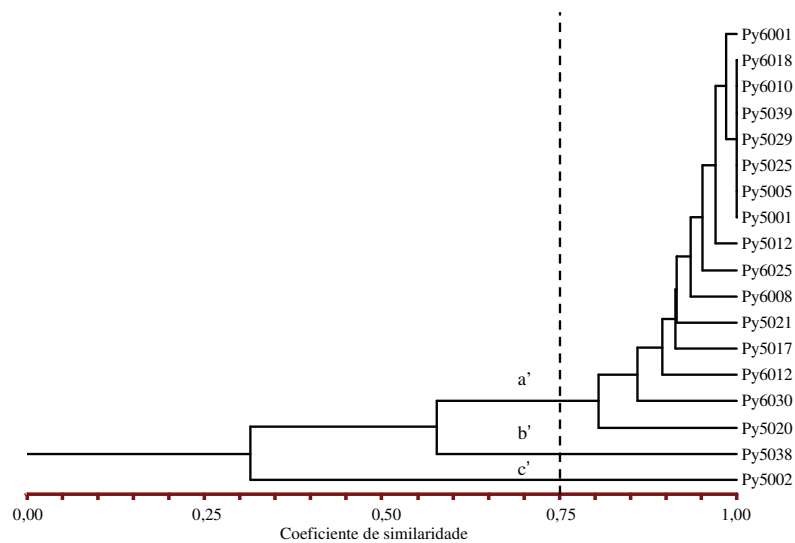


Figura 2- Dendrograma baseado na reação de 70 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

Tabela 3- Chave de identificação de patótipos de *P. grisea* a partir da reação diferencial de 14 genótipos de trigo. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Isolados	Reação diferencial de variedade														Nº do patótipo
	2*	5	8	23	34	39	50	55	61	68	91	92	93	101	
Py 5001	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Py 5005	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Py 5025	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Py 5029	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Py 5039	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Py 6010	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Py 5002	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	II
Py 5012	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	III
Py 5017	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	IV
Py 5020	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	V
Py 5021	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	VI
Py 5038	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	VII
Py 6001	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	VIII
Py 6008	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	IX
Py 6012	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	X
Py 6018	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	XI
Py 6025	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	XII
Py 6030	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	XIII

* Número correspondente à origem do genótipo (Tabela 2)

A partir dos dados de severidade em planta jovem foi possível separar os genótipos em três grupos (Figura 3) com respectivamente 52, 13 e 5 genótipos utilizando-se os valores da Distancia Euclidiana ($D= 3,00$). O grupo “a” apresentou a maior média de severidade (%): 31,45, com amplitude de 16,07 a 61,65, desvio padrão 10,30. Nesse grupo estão os genótipos com os maiores índices de severidade como Brs Aliança, Iapar 6, LA 1549 e Anahuac. No grupo “b” a média foi 14,94, amplitude 9,15 a 24,02 e desvio padrão 5,05, nesse grupo encontram-se os genótipos que apresentaram as menores médias de severidade como: Brs 229, Brs 179, NE 20158-X, CNT 8, Brs 120 e Brs Buriti (Tabela 4). No grupo c a média de

Tabela 4- Agrupamento dos 70 genótipos de planta jovem de acordo com a similaridade dos dados de severidade para os 18 isolados de *P. grisea* testados. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Grupo de severidade	Genótipos	X1 ¹	X2 ²
	CNT 10	28,77	2,90
	Cep 24	22,27	2,70
	Brs 220	29,68	2,79
	Brs 210	26,07	2,70
	Ias 54	24,38	2,39
	Frontana	21,85	2,50
	Cep 14	16,38	2,30
	Iac 5	29,50	2,80
	Embrapa 16	26,81	2,70
	Br 35	21,12	2,34
	Brilhante	22,02	2,43
	PF 804002	16,07	2,20
	PF 964009	17,27	2,20
	PF 804001	21,34	2,30
	Br 23	18,74	2,02
	IAC 24	28,99	2,50
	Jacuí	24,43	2,50
	NE 20159-X	28,66	2,61
	PF 844002	18,21	2,03
	NE 20168-P	28,52	2,62
	IPF 71404	25,45	2,47
	Br 18	22,99	2,54
	Ocepar 16	35,69	2,94
	Embrapa 40	31,43	2,80
	NE 20156-B	18,51	2,18
a	Br 14	38,85	3,20
	Br 12	45,99	3,30
	BH 1146	33,48	2,82
	Sintético 01	31,29	2,87
	Toropi	28,76	2,91
	NE 20160-Z	36,90	3,06
	NE 20160-C	44,12	3,20
	NE 20159-B	34,32	2,79
	PG 1	20,84	2,53
	Peladinho	38,85	3,24
	NE 20160-Y	31,66	2,91
	NE 20159-C	25,61	2,71
	NE 20160-B	42,16	3,18
	NE 20160-A	38,08	3,01
	NE 20159-Z	27,74	2,57
	Brs Camboatá	32,39	2,76
	Brs Guabijú	30,33	2,83
	PF 001102	47,97	3,54
	IPR 85	30,97	2,99
	Brs Nobre	40,98	3,22
	Iapar 6	53,99	3,50
	LA 1549	50,64	3,34
	Klein	31,59	2,83
	Brs Aliança	61,55	4,01
	Br 33	45,61	3,50
	Anahuac	44,96	3,60
	Brs 208	40,86	3,10

continua....

Continuação...

Grupo de severidade	Genótipos	X1 ¹	X2 ²
b	Iapar 53	13,03	1,91
	CNT 8	10,64	1,76
	PF 844002	18,88	2,20
	PF 844001	20,97	2,20
	NE 20157-X	21,41	2,25
	Brs 179	10,48	2,20
	NE 20158-X	10,49	1,73
	Brs 229	9,15	1,50
	Brs Buriti	11,91	1,56
	Brs 177	24,02	2,30
	Embrapa 27	13,44	1,90
	Brs 120	11,47	1,73
	Brs 194	18,36	2,39
	c	Brs Timbaúva	24,87
Brs Louro		18,92	2,20
Brs 49		22,30	2,34
Brs 209		35,33	2,90
OR 1		36,25	3,00

¹ Dados da severidade média da área foliar afetada sem transformação

² Dados da severidade média da área foliar afetada transformados para escala preconizada pelo IRRRI com algumas alterações

Na análise dos dados de severidade em espiga o isolado mais virulento foi Py 5005, que não diferiu estatisticamente de Py 6001, Py 6008, Py 6030 (Tabela 5). Quanto aos genótipos, o que apresentou menor área afetada foi CNT 8 que não diferiu do genótipo sintético PF 844001 (Tabela 5). Em folha bandeira os isolados mais virulentos foram Py 6001, Py 5002, Py 6030 e Py 5039. As menores médias de severidade foram observadas nos genótipos de trigo sintético: NE 20156-B, PF 844001, PF 964009, PF 804002, os quais não diferiram estatisticamente do cultivar CNT 8 (Tabela 6). Em comparação com as inoculações em fase vegetativa, merece destaque o isolado Py 5002 que na fase de planta jovem foi o menos virulento, já na fase de planta adulta comportou-se como o mais virulento. Não foi possível diferenciar os isolados quanto a sua agressividade pela

região geográfica da qual foram coletadas as amostras, muito menos fazer alguma relação com a porção da planta da qual o isolado foi obtido para nenhuma das avaliações.

Tabela 5- Severidade de brusone na espiga de 12 genótipos de trigo, submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pycularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2007

Isolados	Genótipos*																		Média							
	2	8	9	23	26	54	61	83	86	92	93	95	2	8	9	23	26	54		61	83	86	92	93	95	
Py 5001	2,0 ¹	2,0	5,0	2,9	4,3	2,6	2,1	2,9	2,8	1,1	4,7	2,7	2,9 ²	2,3	4,2	5,0	5,0	4,3	3,7	4,2	5,0	4,6	3,9bc	3,9bc		
Py 5002	2,3	4,2	5,0	5,0	3,9	4,8	0,3	4,3	3,7	4,2	5,0	4,6	4,3ab	4,8	4,8	5,0	4,5	5,0	4,4	4,3	5,0	5,0	4,5	4,6a		
Py 5005	4,8	4,8	5,0	5,0	4,5	5,0	3,1	5,0	4,4	4,3	5,0	4,6	4,3ab	4,1	2,5	4,5	2,6	1,9	1,1	2,1	3,5	4,9	5,0	3,0ef		
Py 5012	4,1	2,5	4,5	3,2	1,3	2,6	1,9	1,1	2,1	3,5	4,9	5,0	3,0ef	2,3	1,3	3,5	3,3	4,0	3,6	3,0	4,7	4,6	3,9	3,1def		
Py 5017	2,3	1,3	3,5	3,3	3,5	4,0	3,6	3,0	0,3	4,7	4,6	3,9	3,1def	4,5	2,8	4,9	3,3	3,2	3,4	2,0	4,1	3,6	4,6	3,5cde		
Py 5020	4,5	2,8	4,9	3,3	3,2	3,4	2,0	1,7	4,2	4,1	3,6	4,6	3,5cde	3,0	2,1	5,0	2,1	2,0	3,8	3,5	4,8	2,9	4,8	3,5cde		
Py 5021	3,0	2,1	5,0	2,1	2,0	3,8	3,5	5,0	3,2	4,8	2,9	4,8	3,5cde	3,4	2,6	5,0	3,6	3,5	5,0	2,2	4,1	4,2	3,6	3,8bc		
Py 5025	3,4	2,6	5,0	3,6	3,5	5,0	2,2	4,1	4,2	2,6	4,6	3,6	3,8bc	3,3	3,0	4,6	3,0	1,6	4,0	3,3	4,5	4,0	3,8	3,6cd		
Py 5029	3,3	3,0	4,6	3,0	1,6	4,0	3,3	4,5	3,5	4,0	4,7	3,8	3,6cd	0,8	0,1	4,7	0,0	0,1	1,0	0,1	0,0	1,2	2,1	1,0h		
Py 5038	0,8	0,1	4,7	0,0	0,1	1,0	0,1	0,0	1,2	2,1	0,7	1,0	1,0h	2,3	2,7	2,4	1,4	2,1	5,0	3,0	4,8	2,0	5,0	3,4cdef		
Py 5039	2,3	2,7	2,4	1,4	2,1	5,0	3,0	4,8	2,0	5,0	5,0	5,0	3,4cdef	4,7	4,5	5,0	3,4	4,0	4,0	2,7	4,6	5,0	3,8	4,3ab		
Py 6001	4,7	4,5	4,6	4,5	4,5	4,6	3,3	4,8	4,6	4,6	4,3	4,5	4,3ab	4,4	4,0	4,6	4,5	3,8	4,6	3,3	4,8	4,6	4,3	4,3ab		
Py 6010	0,5	1,6	4,7	0,2	0,1	1,3	0,8	3,8	0,2	4,3	3,6	4,2	2,1g	0,5	1,6	4,7	0,2	0,1	1,3	0,8	3,8	0,2	4,3	2,1g		
Py 6012	0,1	0,6	1,8	1,2	1,5	0,6	0,3	2,0	0,8	1,5	0,6	1,0	1,0h	0,0	1,0	0,9	0,0	2,1	0,5	1,3	3,2	1,5	2,5	1,4h		
Py 6018	0,0	1,0	0,9	0,0	2,1	0,5	1,3	3,2	1,5	2,5	1,7	2,4	1,4h	1,3	0,3	4,8	0,0	0,7	0,5	0,9	2,5	0,9	1,4	1,3h		
Py 6025	1,3	0,3	4,8	0,0	0,7	0,5	0,9	2,5	0,9	1,4	2,7	0,5	1,3h	4,8	3,0	4,6	3,1	4,5	5,0	1,8	4,8	4,4	4,9	4,2ab		
Py 6030	4,8	3,0	4,6	3,1	4,5	5,0	1,8	4,8	4,4	4,9	5,0	4,7	4,2ab	Média	2,7D ²	2,4DE	4,2A	2,5D	2,6D	3,2C	2,0E	3,4BC	2,7D	3,5BC	3,8AB	3,7B

*Numeração correspondente à origem dos genótipos (Tabela 2)

¹ Valores correspondentes a s notas da escala utilizadas para classificar a severidade da doença nos diferentes genótipos de trigo

² Valores seguidos da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo testes de Tukey a 5%

Tabela 6- Severidade de brusone na folha bandeira de 12 genótipos de trigo, submetidos a inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pycularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Isolados	Genótipos*														Média
	2	8	9	23	26	54	61	83	86	92	93	95			
Py 5001	3,2 ¹	1,7	2,2	2,7	4,8	2,0	1,8	4,4	5,0	4,6	1,0	3,5	3,0 b ²		
Py 5002	3,0	4,0	5,0	5,0	4,1	5,0	2,8	3,7	4,0	4,8	5,0	5,0	4,3 a		
Py 5005	2,2	2,8	3,8	2,5	2,1	2,5	1,8	5,0	0,7	2,3	3,5	3,3	2,7 b		
Py 5012	3,6	0,1	0,4	3,5	1,4	0,1	2,9	0,7	4,0	0,2	2,7	2,9	1,8 c		
Py 5017	0,4	0,0	1,5	1,1	1,7	0,1	2,6	1,5	1,8	2,3	2,3	0,0	1,2 cde		
Py 5020	1,0	0,4	1,3	1,7	1,1	0,4	0,2	0,1	4,2	0,3	1,2	2,1	1,1 de		
Py 5021	0,6	2,8	4,6	1,5	1,5	4,4	3,9	4,1	0,4	4,8	2,9	4,5	3,0 b		
Py 5025	1,5	3,3	1,6	1,3	2,5	2,6	2,6	3,9	1,7	3,5	2,8	4,8	2,7 b		
Py 5029	2,4	3,8	4,7	1,0	1,0	2,5	2,7	4,6	2,1	4,0	3,2	3,0	2,8 b		
Py 5038	0,1	0,2	0,4	0,0	0,0	1,9	2,7	1,7	2,8	3,2	0,4	0,1	1,1 de		
Py 5039	4,1	3,7	4,6	0,4	0,2	5,0	4,7	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	3,9 a		
Py 6001	4,5	3,9	3,8	3,1	4,7	4,8	2,8	4,8	4,3	4,0	4,8	4,4	4,1 a		
Py 6008	2,0	3,1	2,7	3,6	2,4	1,7	3,6	5,0	0,8	2,7	1,7	1,9	2,6 b		
Py 6010	0,1	1,2	3,0	0,5	0,0	0,3	0,0	1,6	0,2	0,5	2,3	0,2	0,8 e		
Py 6012	0,0	0,8	1,5	0,1	0,0	3,3	0,1	1,9	0,4	0,2	0,3	1,2	0,8 e		
Py 6018	0,0	1,5	3,0	0,0	2,5	3,0	0,2	1,7	0,6	0,2	1,6	0,0	1,2 de		
Py 6025	2,8	0,6	1,2	0,0	0,1	1,1	1,5	3,4	4,4	2,2	0,2	0,1	1,4 cd		
Py 6030	4,6	2,2	4,2	4,0	4,8	5,0	3,2	5,0	4,1	4,6	5,0	4,8	4,3 a		
Média	2,0 D ²	1,9 D	2,7 B	1,8 D	1,9 D	2,5 BC	2,2 CD	3,2 A	2,6 BC	2,7 B	2,5 BC	2,6 BC	2,6 BC		

*Numeração correspondente à origem dos genótipos (Tabela 2)

¹ Valores correspondentes as notas da escala utilizadas para classificar a severidade da doença nos diferentes genótipos de trigo testados

² Valores seguidos da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo testes de Tukey a 5%

Os dados de severidade média em planta jovem e adulta foram expostos na forma de gráficos. Através da disposição dos pontos nos mesmos foi possível constatar a inexistência de correlação entre as variáveis: espiga x folha jovem e folha jovem x folha bandeira (Figuras 4 e 5). Embora não seja indicado realizar uma correlação entre a reação dos genótipos em planta jovem e planta adulta, observou-se uma tendência dos genótipos resistentes em planta jovem apresentarem suscetibilidade em planta adulta. A ocorrência da reação inversa foi menos freqüente.

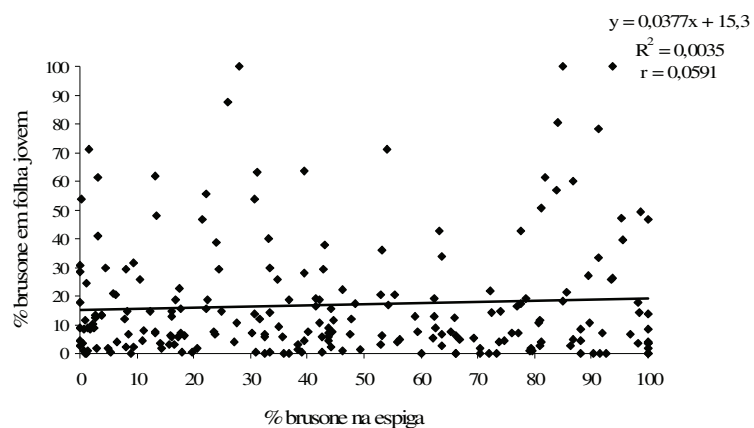


Figura 4- Severidade de brusone em folha jovem e espiga de 12 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

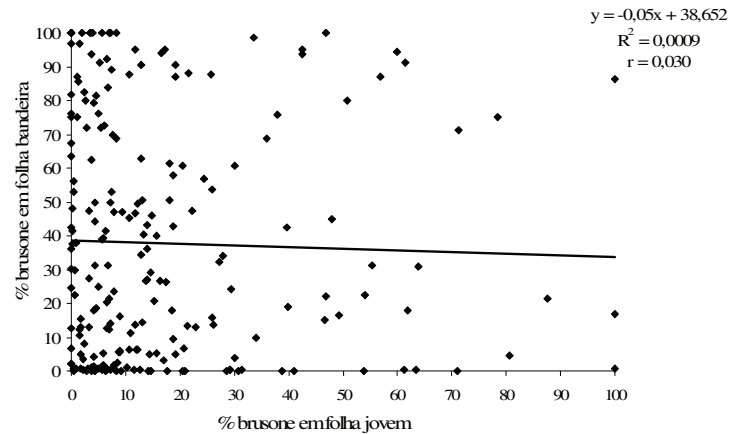


Figura 5– Severidade de brusone em folha bandeira e folha jovem de 12 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

A análise dos coeficientes de correlação e de determinação, obtidos através da comparação dos graus de severidade da doença observados na espiga e na folha bandeira dos genótipos testados, evidenciou que o genótipo PF 804002 (Tabela 7) apresenta maior compatibilidade nas suas respostas às inoculações nos dois tipos de avaliações realizadas. Uma análise similar à anterior, mas para os 18 isolados utilizados no trabalho indicou que a maior compatibilidade entre as respostas foi promovida pelo isolado Py 6010 (Tabela 8). Porém, os valores de correlação variam entre genótipos e isolados. Esse fato explica o baixo valor da correlação verificado no experimento, através da comparação de severidade na folha bandeira e espiga de todos os genótipos e isolados 54% (Figura 6).

Tabela 7- Coeficientes de determinação e correlação dos dados de severidade de brusone na espiga e folha bandeira por genótipo de trigo em relação a todos os isolados de *Pyricularia grisea* testados. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Genótipos	R ²	r	Genótipos	R ²	r
NE 20156-B	0,38	0,62	CNT 8	0,33	0,58
PF 844001	0,18	0,42	BRS 120	0,52	0,72
PF 844002	0,35	0,59	BRS 194	0,49	0,70
PF 964009	0,02	0,15	BURITI	0,04	0,20
PF 804002	0,60	0,77	CAMBOATÁ	0,14	0,37
BR 18	0,46	0,67	LOURO	0,51	0,71

Tabela 8- Coeficientes de determinação e correlação dos dados de severidade de brusone na espiga e folha bandeira por isolado de *Pyricularia grisea* em relação a todos os genótipos de trigo testados. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Isolados	R ²	r	Isolados	R ²	r
Py 5001	0,00	0,05	Py 5038	0,29	0,54
Py 5002	0,51	0,71	Py 5039	0,27	0,52
Py 5005	0,22	0,47	Py 6001	0,39	0,62
Py 5012	0,03	0,18	Py 6008	0,05	0,23
Py 5017	0,04	0,20	Py 6010	0,77	0,88
Py 5020	0,04	0,22	Py 6012	0,64	0,80
Py 5021	0,67	0,81	Py 6018	0,37	0,61
Py 5025	0,09	-0,30	Py 6025	0,00	-0,06
Py 5029	0,75	0,86	Py 6030	0,85	0,92

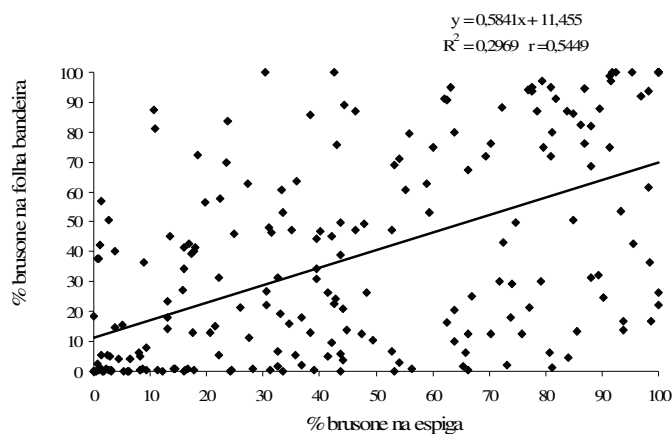


Figura 6– Severidade de brusone em folha bandeira e espiga de 12 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

A similaridade de 75% entre os isolados de *Pyricularia grisea* no espectro de virulência, mesmo com o uso de 70 genótipos de trigo escolhidos para o trabalho pela sua suposta diversidade, revelou uma baixa variabilidade fenotípica entre os isolados amostrados. Em contraste, ampla variabilidade genética é verificada em *P. grisea* na cultura do arroz, responsável pela constante superação da resistência dos cultivares de arroz após seu lançamento (PRABHU & FILIPPI, 2006). Essa estreita variabilidade no patógeno do trigo já foi relatada por Urashima & Kato (1994) e Urashima *et al.* (1999) entre isolados obtidos do Paraná e Mato Grosso do Sul.

Os dados obtidos sobre o espectro de virulência evidenciaram uma estreita similaridade fenotípica entre os isolados,

embora os mesmos tenham sido obtidos em diferentes circunstâncias. Os isolados obtidos no Paraná foram originários de diferentes cultivares diferentes em um mesmo campo, no ano de 2005. Já, os isolados de Minas Gerais e Goiás foram obtidos do cultivar BRS 208 no ano de 2006. Dessa forma, os isolados testados fazem parte de uma pequena amostra representativa de um importante segmento da população de *P. grisea* existente em pelo menos quatro estados brasileiros, em um determinado período de tempo. A divisão dos isolados de acordo com o critério utilizado por Filippi & Prabhu (2001), permitiu identificar três linhagens do fungo: a', b' e c' com respectivamente 16; 1; 1 isolados. Porém, não foi possível estabelecer uma tendência do espectro de virulência dessas linhagens em relação aos genótipos utilizados no experimento, devido ao número reduzido de isolados nas linhagens b' e c', e na reação similar apresentada pela maioria dos genótipos para os isolados pertencentes à linhagem a'.

Mesmo sabendo que, para a identificação de raças de um patógeno é necessário que os genes de resistência na planta sejam conhecidos a sugestão de alguns genótipos utilizados no presente trabalho, como cultivares diferenciais de trigo é um primeiro passo para a identificação de patótipos de *P. grisea* nessa cultura. A estreita base genética apresentada pelo trigo hexaplóide cultivado (BERED *et al.*, 2000) torna a possibilidade de existência de genes de resistência à brusone rara, levando-se em consideração os relatos de cultivares suscetíveis nas principais regiões tritícolas do Brasil (GOULART, 2004). Dessa forma a resposta apresentada pelos genótipos sintéticos à doença os torna promissoras fontes de resistência à doença. Os genótipos sintéticos são originários de diferentes acessos de *T.*

tauschii que são geneticamente distintos e apresentam diferentes graus de resistência a doenças foliares (ALMEIDA, 2006; PRESTES *et al.*, 1994), e são capazes de herdar genes de resistência do parental diplóide (COX *et al.*, 1995). A identificação de patótipos de *P. grisea* será extremamente útil no monitoramento da diversidade de patótipos em uma região, e na constatação do surgimento de novas raças, as quais são informações importantes para os programas de melhoramento de trigo, visando resistência à brusone.

No presente trabalho, as avaliações em planta jovem não confirmaram a resistência dos cultivares BR 18 e BH 1146 (TRINDADE *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2005) que se comportaram como suscetíveis para a maioria dos isolados testados. Porém os cultivares BRS 229 (BRUNETTA *et al.*, 2006) e BRS 120 (PRESTES *et al.*, 2007) considerados moderadamente resistentes em planta adulta, também foram considerados na presente pesquisa resistentes em planta jovem.

A variação no grau de suscetibilidade apresentado pelos genótipos de 9,15% a 61,55% da área foliar afetada (Tabela 4) é um indicativo da presença de resistência parcial entre os genótipos testados. Embora a resistência qualitativa tenha sido o objetivo da maioria dos programas de melhoramento ao longo dos anos, essa prática não é duradoura para a brusone do arroz, devido à capacidade do patógeno em superar a resistência de cultivares dois a três anos após seu lançamento. Dessa forma, a não confirmação da resistência qualitativa para os genótipos componentes desta pesquisa sugere a resistência parcial que envolve muitos genes de pequeno efeito, e que

supostamente é mais durável do que a resistência qualitativa, como um dos melhores métodos para aumentar a diversidade ao nível de genótipo (PRABHU & FILIPPI, 2006; RIBEIRO DO VALE *et al.*, 2001).

Não houve confirmação da resistência verificada em planta jovem, com resistência em planta adulta para a maioria dos genótipos, com exceção de CNT 8, que foi um dos genótipos menos suscetíveis em todas as avaliações (planta jovem, folha bandeira e espiga), fato semelhante foi observado por Arruda *et al.* (2005) para o cultivar BH 1146. Os genótipos sintéticos destacaram-se tanto na reação em folha quanto na reação em espiga por apresentar menor área afetada pela doença, já em planta jovem a maioria dos genótipos sintéticos se comportou como suscetível. Porém, vale ressaltar a presença do genótipo NE 20158-X entre os genótipos que apresentaram menos de 12% de área foliar afetada no estágio de planta jovem. Não foram encontrados na literatura registros sobre a resistência de genótipos de trigo sintético à brusone no Brasil, sugerindo pesquisas de maior profundidade sobre este tema, uma vez que, esse germoplasma é derivado da espécie afim *Aegilops tauschii* (*Triticum tauschii*) ancestral do trigo de panificação e considerada fonte promissora de resistência à brusone e a outras doenças do trigo (ALMEIDA, 2006; PRESTES *et al.*, 1994). Urashima & Kato (1994) verificaram resistência em acessos de *Aegilops* em planta jovem, o mesmo não foi confirmado entre os genótipos de trigo sintético testados neste trabalho, que na sua maioria mostraram-se suscetíveis. Esses dados estão de acordo com Urashima & Kato (1998), para os quais, a resposta diferencial do trigo em relação a alguns isolados de

P. grisea varia conforme o estágio de desenvolvimento da planta. Porém Arruda *et al.*, (2005) verificaram correlação positiva entre suscetibilidade nas folhas no estágio vegetativo e na espiga.

A discordância em relação à resposta dos genótipos conforme o estágio de desenvolvimento da planta já foi relatada por inúmeros autores, especialmente para brusone do arroz (PRABHU & FILIPPI, 2006; PRABHU & BENDENDO, 1991; VILLAREAL *et al.*, 1980). De acordo com Ou (1985) linhagens de arroz, resistentes em planta jovem, seriam resistentes em planta adulta. Mas, a perda da correspondência em alguns cultivares foi atribuída entre outros fatores às diferenças ambientais e período de florescimento dos genótipos (BONMAN, 1992). Roumen (1992 ab), Hwang *et al.* (1987) e Koh *et al.* (1987), constataram que as plantas tornavam-se resistentes com o aumento da idade da planta. À medida que a idade da planta aumenta, o número e tamanho das lesões são reduzidos, ou seja, o fungo acaba por diminuir sua capacidade de penetração na cutícula da planta (MURAKAMI *et al.*, 2006).

A não correspondência da reação dos genótipos à brusone em folha e ráquis foi verificada, entre outros, por Bonman *et al.* (1989) e Puri *et al.* (2006) para os quais linhagens classificadas como intermediárias ou suscetíveis em folhas comportavam-se como resistentes à infecção do ráquis da panícula do arroz. Dessa forma, as informações indicam que a resistência à brusone na panícula pode ser expressa, em alguns genótipos de arroz, independentemente da brusone em folha, da mesma forma que foi verificado no presente experimento para brusone do trigo, quando se considera

individualmente a resposta dos genótipos por isolado para as duas variáveis analisadas (severidade em folha bandeira e espiga). De acordo com Hashiota apud Prabhu & Filippi (2006), a reação da brusone nas folhas e no pescoço de panículas é controlada independentemente por genes diferentes. A identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) localizados em cromossomos diferentes em arroz, associados a resistência de brusone nas folhas e pescoço da panícula indica a complexidade da doença e do controle genético (SIRITHUNYA *et al.*, 2002). No Brasil não há relatos de altos índices de severidade de brusone em folhas jovens de trigo, dessa forma a importância epidemiológica da suscetibilidade em folha para um possível dano na espiga ainda não foi constatada. Pois, como foi relatado no trabalho, há uma diferença de reação conforme o órgão atacado pelo fungo.

A correlação de 65% entre brusone nas folhas e panículas de arroz, em condições de campo foi verificada por Prabhu *et al.* (1996). No presente trabalho constatou-se uma correlação média de 54% entre brusone nas folhas e na espiga de trigo, inferior a verificada na cultura do arroz em condições de campo. Entretanto, a correlação por isolado apresentou valores mais elevados (Tabela 8), indicando que a mesma é dependente do isolado utilizado e que, portanto, não deve ser generalizada. De acordo com a resposta dos genótipos de trigo na fase vegetativa e reprodutiva na presente pesquisa é possível postular a existência de genes diferentes, expressos nos diferentes estádios de desenvolvimento do trigo. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho poderão contribuir para identificação do melhor momento para a seleção de genótipos de trigo, que possam servir

como fontes de resistência à brusone, e auxiliem na elaboração de diferentes estratégias de melhoramento em programas de melhoramento de trigo que visem resistência à brusone.

4 CONCLUSÕES

Nas condições em que a pesquisa foi desenvolvida, os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) o padrão de virulência da maioria dos isolados de *Pyricularia grisea* do trigo testados é homogêneo (75% de similaridade);
- b) os genótipos BRS 229, BRS 179, CNT 8, BRS 120 e BRS Buriti, NE 20158-X apresentam resistência à brusone em planta jovem;
- c) os genótipos sintéticos: NE 20156-B, PF 844001, PF 964009, PF 804002 e o cultivar CNT 8 apresentam resistência em planta adulta à brusone;
- d) há baixa correlação de resistência à brusone entre espigas e folha de trigo.

CAPÍTULO II

PADRÃO MOLECULAR E DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia grisea* DO TRIGO

**Maria Fernanda Antunes da Cruz¹, Ariano Moraes Prestes² &
João Leodato Nunes Maciel³**

RESUMO- O uso de ferramentas moleculares e avaliações da virulência de *Pyricularia grisea*, agente causal da brusone do arroz e do trigo, tem 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 31 isolados de *P. grisea* do trigo com o auxílio de 8 *primers* de microssatélites e relacionar os dados da análise molecular com os dados do espectro de virulência de 18 desses isolados, inoculados em plantas jovens de 70 genótipos de trigo. Dos 8 *loci* analisados, o *primer* mais informativo foi PG 5, que apresentou 5 alelos. Além disso, os *primers* MGM 21 e PG 12 permitiram separar os isolados Py 5020 e Py 5038 em um grupo bastante distinto, com

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro), FAMV/UPF, área de concentração em Fitopatologia

² Orientador, Eng.-Agr., PhD., professor do PPGAgro, FAMV/UPF

³ Co-orientador, Eng.-Agr., Dr., Pesquisador da Embrapa Trigo

menos de 50% de similaridade em relação aos demais isolados. A similaridade genética variou de 14% (isolado de arroz) a 100%, sendo que a maioria dos isolados apresentou mais de 75% de similaridade entre si. Não foi possível agrupar os isolados conforme sua origem geográfica. Na análise de virulência, 15 dos 18 isolados testados apresentaram mais de 85% de similaridade entre si. 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, com exceção do isolado Py 5002, que apresentou uma relação distinta dos demais isolados de acordo com o critério adotado para classificá-los, o padrão molecular ou de virulência.

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

MOLECULAR PATTERN AND VIRULENCE OF ISOLATES

Pyricularia grisea WHEAT

ABSTRACT- The use of molecular tools and virulence evaluations of *Pyricularia grisea*, causal agent of rice and wheat blast, permitted to identify strains of the pathogen, especially those occurring in the rice crop. Microsatellites already demonstrated efficiency to classify *P. grisea* isolates by the genetic similarity groups. The objectives of this work were: to characterize the genetic diversity of 31 isolates of *P. grisea* collected from wheat applying 8 primers microsatellites; and to compare the molecular and virulence results of 18 isolates, when

inoculated in seedlings of 70 wheat genotypes. The most informative primer was PG 05 with 5 alleles. The primers MGM21 and PG 12 permitted separate the Py 5020 and Py 5038 in distinct groups, with less than 50% similarity in relation to others. The genetic similarity varied from 14% (rice isolate) to 100%, but most of isolates presented more than 75% similarity among them. It was not possible to cluster the isolates according to geographic source. In the virulence analysis, fifteen among eighteen tested isolates showed more than 85% of similarity. The molecular pattern and virulence were similar for the isolates, except for Py 5002 isolate, which presented a distinct relationship with the others isolates, according to the criteria adapted by classification.

Key-words: microsatellites markers, allele, resistance, blast

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., agente causal da brusone caracteriza-se por apresentar uma ampla gama de hospedeiros, dentre estes estão o arroz no qual o fungo foi descrito inicialmente, além de outras espécies de gramíneas de interesse econômico como trigo, cevada, triticale (ZEIGLER, 1998; PURCHIO-MUCHOVEJ & MUCHOVEJ, 1994).

Até o momento não foram identificados genótipos de trigo que apresentassem reações diferenciadoras a ponto de permitir o agrupamento do fungo em raças fisiológicas ou patótipos. Urashima & Kato (1994), sugeriram a existência de diferentes raças fisiológicas de *Pyricularia grisea*, devido às reações diferenciais de cultivares originárias de regiões geográficas distintas para vários isolados do fungo. A busca por genótipos de trigo que apresentassem uma resposta diferencial à doença, também foi objeto de pesquisa de Urashima *et al.* (2004). Vinte genótipos de trigo foram submetidos à inoculação com 72 isolados originários dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, produziram 54 padrões distintos de virulência. Nenhum cultivar foi resistente a todos os isolados, mas o cultivar BR 18 destacou-se por apresentar um amplo espectro de resistência.

Há pelo menos 15 anos, a variabilidade de *Pyricularia grisea* tem sido avaliada com o uso de marcadores moleculares (LEVY *et al.*, 1991). Foram desenvolvidas estratégias como as sondas de DNA que detectavam seqüências repetitivas no genoma do fungo como MGR-586; retrotrasposon *grasshopper* (*grh*); transposon invertido *Pot-2* e o retrotrasposon MAGGY (*Magnaporthe Gypsy*

element) os quais permitiram a revelação de extensivo polimorfismo entre isolados de *P. grisea* de arroz e baixo número de cópias dessas repetições em isolados do fungo de outros hospedeiros (ZEIGLER, 1998). Em 1994 foi desenvolvido, a partir da seqüência *Pot-2* um marcador, que permite caracterizar de forma eficiente a variabilidade do fungo do arroz (KACHROO *et al.*, 1994). Entretanto, esta estratégia não demonstrou a mesma eficiência quando utilizada para estabelecer análises comparativas entre isolado de *P. grisea*, que não sejam obtidos de plantas de arroz devido à pequena quantidade de bandas geradas.

A partir do final dos anos 90, os marcadores moleculares têm sido utilizados de forma mais intensa na caracterização de isolados de *P. grisea* de espécies diferentes do arroz. Dentre os marcadores moleculares empregados para avaliação da variabilidade genética, entre isolados de *P. grisea*, obtidos de cereais de inverno está: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) em trigo e triticale (BUSSO, 2005), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) em triticale (URASHIMA *et al.* 2007) e SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou também conhecidos como microssatélites, em trigo (GARRIDO, 2001; BRONDANI *et al.*, 2000). Entre essas alternativas, os marcadores microssatélites merecem destaque pela eficiência em detectar polimorfismo entre espécies e dentre 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 marcadores microssatélites são seqüências repetidas, que consistem de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem (CAIXETA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Esses marcadores apresentam algumas vantagens em relação aos demais marcadores moleculares: são co-dominantes, específicos para um determinado *locus* no cromossomo, e revelam elevado polimorfismo, fato que os torna uma das técnicas mais utilizadas para detecção de baixa variabilidade genética (MILACH, 1998).

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.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Fitopatologia e Biologia Molecular da Embrapa Trigo.

2.1 Isolados

Os isolados monospóricos foram obtidos de ráquis, folhas e glumas de espigas de trigo com sintomas de brusone nos anos de 2005 e 2006. As amostras foram obtidas de cultivares originárias de lavouras de diferentes regiões geográficas brasileiras (Tabela 1), os

quais passaram a fazer parte da Coleção de isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* da Embrapa Trigo.

Tabela 1- Relação de isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizados no experimento. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Nº	Designação	Origem	Cultivar	Segmento da planta ²	Ano
1	Py 5001*	São Borja-RS	BRS Angico	Ráquis	2005
2	Py 5002*	São Borja-RS	BRS Angico	Ráquis	2005
3	Py 5003	Londrina-PR	BRS 248	Ráquis	2005
4	Py 5005*	Londrina-PR	BRS 248	Ráquis	2005
5	Py 5012*	Londrina-PR	BRS 229	Ráquis	2005
6	Py 5015	Londrina-PR	BRS 230	Ráquis	2005
7	Py 5017*	Londrina-PR	BRS 193	Ráquis	2005
8	Py 5020*	Londrina-PR	BR 18	Ráquis	2005
9	Py 5021*	Londrina-PR	BR 18	Ráquis	2005
10	Py 5022	Londrina-PR	BR 18	Ráquis	2005
11	Py 5025*	Londrina-PR	BRS 249	Ráquis	2005
12	Py 5029*	Londrina-PR	CD 105	Ráquis	2005
13	Py 5031	Londrina-PR	CD 105	Ráquis	2005
14	Py 5034	Londrina-PR	BRS 220	Ráquis	2005
15	Py 5038*	Londrina-PR	BRS 220	Ráquis	2005
16	Py 5039*	Londrina-PR	BRS 208	Ráquis	2005
17	Py 5042	Londrina-PR	BRS 208	Ráquis	2005
18	Py 5047	Londrina-PR	BRS 208	Ráquis	2005
19	Py 6001*	Coromandel-MG	BRS 208	Folha	2006
20	Py 6008*	Coromandel-MG	BRS 208	Folha	2006
21	Py 6010*	Coromandel-MG	BRS 208	Folha	2006
22	Py 6012*	Coromandel-MG	BRS 208	Gluma	2006
23	Py 6015	Coromandel-MG	BRS 208	Gluma	2006
24	Py 6018*	Coromandel-MG	BRS 208	Ráquis	2006
25	Py 6025*	Coromandel-MG	BRS 208	Folha	2006
26	Py 6028	Goiânia-GO	BRS 208	Ráquis	2006
27	Py 6030*	Goiânia-GO	BRS 208	Ráquis	2006
28	Py 6032	Goiânia-GO	BRS 208	Ráquis	2006
29	Py 6041	Goiânia-GO	BRS 208	Ráquis	2006
30	Py 6044	Goiânia-GO	BRS 208	Ráquis	2006
31	Py 6048	Goiânia-GO	BRS 208	Ráquis	2006
32	Py 3.3.1 ¹	Cachoeirinha-RS	Dular-arroz	Folha	1996

¹ Isolado gentilmente cedido pelo Instituto Rio-Grandense do Arroz

² Refere-se à parte da planta da qual o isolado foi obtido

* Isolados utilizados nos testes de avaliação da virulência

2.2 Cultivo de isolados para produção de micélio

Os isolados foram repicados para 70 mL de meio líquido completo (PONTECORVO *et al.* 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973), (NaNO₃ 6 g, KH₂PO₄ 1,5 g, KCl 0,5 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, NH₄Cl 3 g, FeSO₄ 0,01 g, ZnSO₄ 0,01 g, glicose 10 g, sacarose 5 g, peptona 2 g, extrato de levedura 0,5 g, caseína hidrolisada 1,5 g, água destilada 1L). O pH do meio líquido foi ajustado para 6,8, e os meios de cultivo nos Erlenmeyers de 250 mL foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos (min). No momento da repicagem foi acrescido a cada Erlenmeyer 70 µL do antibiótico ampicilina na concentração de 100 mg/mL. Após a repicagem do fungo os Erlenmeyers foram incubados durante cinco dias a 25 °C, sob agitação de 130 rpm. Após esse período o micélio foi filtrado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a - 80 °C até o momento da extração do DNA.

2.3 Extração do DNA

Para extração do DNA foi utilizado o protocolo de Specht *et al.* (1982), com algumas modificações. O micélio do fungo foi triturado em nitrogênio líquido e transferido para tubos Eppendorf de 2 mL, e suspenso em 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; EDTA 20 mM pH 8.0; SDS 2%; = 5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0 + 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8.0 + 10 mL de SDS 20% + 81 mL de água milli-Q) por 30 minutos a 70 °C. Em seguida adicionou-se 400 µL de acetato de potássio 5 M (29,44 g de acetato de potássio + 11,5 mL de ácido acético glacial + completar o volume para 100 mL com água milli-Q) e incubou-se em gelo por 30 minutos. A solução

foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para um tubo Eppendorf. Adicionou-se 500 µL de fenol-clorofórmio e por cinco minutos alternou-se temperatura ambiente e gelo. Em seguida o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida e acrescida de 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), alternando temperatura ambiente e gelo. Posteriormente a solução foi novamente centrifugada e a fase aquosa transferida para outro Eppendorf e acrescida de 250 µL de acetato de amônio 7,5 M e 550 µL de isopropanol e incubada a menos 20 °C por 2 horas para formação do grumo de DNA. Passado esse período o material foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado 500 µL de etanol 70% gelado, e realizou-se a última centrifugação de 5.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 50 µL de solução de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM pH 8,0) + RNase A (46 µL de TE + 4 µL de RNase A 10 mg/mL) e incubou-se o material a 37 °C por 30 minutos, para posterior checagem e quantificação de DNA em gel de agarose 0,8%.

2.4 Otimização da reação PCR de microsatélites

O DNA dos isolados foi amplificado utilizando os *primers* dos marcadores PG3, PG5, PG12, PG20, PG15, PG21, desenvolvidos por Garrido (2001), e os *primers* MG1 e MG21 (BRONDANI *et al.*, 1998). A reação de amplificação foi composta de: DNA 25ng/µL, Tampão 10x, MgCl₂ 20 mM, dNTP 10 mM, *primer* 5 µM, Taq polimerase 5 U/mL e H₂O. O programa utilizado no termociclador

PTC-100 *Perner Thermal Cycler* foi: 94 °C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos (s), 60 °C/ 30s, 72 °C/ 30 s e extensão final de 72 °C/ 3 min. Após a amplificação as reações permaneceram a 4 °C até a utilização. A seqüência de cada *primer* e o *mix* utilizado para cada reação estão registrados nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. As seqüências “*Forward*” receberam uma cauda com a seqüência complementar reversa do oligonucleotídeo M13 para que posteriormente, as reações de PCR fossem acrescidas do M13 marcado com fluoróforo e seus produtos discriminados no seqüenciador.

Tabela 2-Primers e suas respectivas seqüências utilizadas para amplificação do DNA dos isolados de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

<i>Primers</i>	Seqüência (5'-3')	Tamanho (pb)	<i>Mix</i>
M13-20F	TGTA AACGACGGCCAGT	18	-
MGM 01F	TGTA AACGACGGCCAGTGC GACAATGCTTTTTTTTT	38	
MGM 01R	TTTCGTACAATCCCGATG	18	D
MGM 21F	TGTA AACGACGGCCAGTATATCTCGTGCAGGCCGGT	37	
MGM 21R	GCAGGTGAGCAAACAGCAAGA	21	C
PG 03F	TGTA AACGACGGCCAGTGGTTCGAGTGTGAGTCTGTGAGT	41	
PG 03R	AACACATGGCGGCCGTATCC	20	C
PG 05F	TGTA AACGACGGCCAGTATGCTGTGCTGCGACGTGGT	38	
PG 05R	ACTGGTCCGCTTGTCCGCTT	20	B
PG 12F	TGTA AACGACGGCCAGTACAGTATTTGCTCTCTCTC	38	
PG 12R	CAGAGTCAGAAAGTGTGTGT	20	A
PG 15F	TGTA AACGACGGCCAGTCCGAGGACATCCAGAGTT	37	
PG 15R	CTTGACACGCCCATGTTTTA	20	D
PG 20F	TGTA AACGACGGCCAGTCTGTGAGTTGGGTTGAGT	38	
PG 20R	TCAAACACATGGTCCGGTCAG	20	C
PG 21F	TGTA AACGACGGCCAGTGAGGTGACGAGGGGAATAG	38	
PG 21R	AGCATATTCACCAGGCGTTC	20	B
PG 42F	TGTA AACGACGGCCAGTGCTTCTTCTCTGCGCATA	38	
PG 42R	GGGTGTCAGCCTTTTTCATT	20	A

Tabela 3- Concentrações dos reagentes utilizados nos diferentes *mixes* para reação de PCR de otimização dos *primers*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

MIX A	Concentração final	Volume por reação (µL)
H ₂ O		14,525
Tampão (10X)	1x	2,5
Mg (20mM)	1,5 mM	1,875
dNTP's (10 mM)	0,2 mM cada	2
Primer F(5µM)	0,2 mM	1
Primer R(5µM)	0,2 mM	1
Taq polimerase (5U/mL)	0,5 U	0,1
DNA (ng/µL)	50 ng	2
MIX B	Concentração final	Volume por reação (µL)
H ₂ O		12,975
Tampão (10X)	1x	2,5
Mg (20mM)	1,5 mM	1,875
dNTP's (10 mM)	0,35 mM cada	3,5
Primer F(5µM)	0,2 mM	1
Primer R(5µM)	0,2 mM	1
Taq polimerase (5U/mL)	0,75 U	0,15
DNA (ng/µL)	50 ng	2
MIX C	Concentração final	Volume por reação (µL)
H ₂ O		13,225
Tampão (10X)	1x	2,5
Mg (20mM)	2,5 mM	3,125
dNTP's (10 mM)	0,2 mM cada	2
Primer F(5µM)	0,2 mM	1
Primer R(5µM)	0,2 mM	1
Taq polimerase (5U/mL)	0,75 U	0,15
DNA (ng/µL)	50 ng	2
MIX D	Concentração final	Volume por reação (µL)
H ₂ O		15,3
Tampão (10X)	1x	2,5
Mg (20mM)	1,5 mM	2
dNTP's (10 mM)	0,2 mM cada	1
Primer F(5µM)	0,2 mM	1
Primer R(5µM)	0,2 mM	1
Taq polimerase (5U/mL)	1 U	0,2
DNA (ng/µL)	50 ng	2

2.5 Genotipagem dos isolados com marcadores microssatélites

Para a genotipagem dos isolados de *Pyricularia grisea* em seqüenciador automático foram feitas as seguintes modificações na reação de PCR: o *mix* de cada reação foi diminuído de 1µL 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 (Tabela 4).

O programa no termociclador para as reações de PCR que foram submetidas ao seqüenciador foi: 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 termociclagem, 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.

Tabela 4- Concentrações dos reagentes para as reações de PCR analisadas no seqüenciador automático. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

MIX A	Concentração final	Volume por reação (µL)
H ₂ O		15,025
Tampão (10X)	1x	2,5
Mg (20mM)	1,5 mM	1,875
dNTP's (10 mM)	0,2 mM cada	2
Primer F(0,5µM)	0,01 µM	0,5
Primer R(5µM)	0,1 µM	0,5
Primer M13-20F(5µM)	0,1 µM	0,5
Taq polimerase (5U/µL)	0,5 U	0,1
DNA (25ng/µL)	50 ng	2
MIX B	Concentração final	Volume por reação (µL)
H ₂ O		13,475
Tampão (10X)	1x	2,5
Mg (20mM)	1,5 mM	1,875
dNTP's (10 mM)	0,35 mM cada	3,5
Primer F(0,5µM)	0,01 µM	0,5
Primer R(5µM)	0,1 µM	0,5
Primer M13-20F(5µM)	0,1 µM	0,5
Taq polimerase (5U/µL)	0,75 U	0,15
DNA (25ng/µL)	50 ng	2
MIX C	Concentração final	Volume por reação (µL)
H ₂ O		13,725
Tampão (10X)	1x	2,5
Mg (20mM)	2,5 mM	3,125
dNTP's (10 mM)	0,2 mM cada	2
Primer F(0,5µM)	0,01 µM	0,5
Primer R(5µM)	0,1 µM	0,5
Primer M13-20F(5µM)	0,1 µM	0,5
Taq polimerase (5U/µL)	0,75 U	0,15
DNA (25ng/µL)	50 ng	2
MIX D	Concentração final	Volume por reação (µL)
H ₂ O		15,8
Tampão (10X)	1x	2,5
Mg (20mM)	2,5 mM	2
dNTP's (10 mM)	0,2 mM cada	1
Primer F(0,5µM)	0,01 µM	0,5
Primer R(5µM)	0,1 µM	0,5
Primer M13-20F(5µM)	0,1 µM	0,5
Taq polimerase (5U/µL)	1 U	0,2
DNA (25ng/µL)	50 ng	2

2.6 Análise estatística

Os dados de polimorfismo de DNA dos isolados do fungo detectados via marcadores microssatélites 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* utilizado. Atribuiu-se o valor 0 para ausência do alelo e valor 1 para presença do alelo. A ausência de amplificação de bandas por um isolado foi considerada como alelo nulo, e isolados que amplificaram bandas em gel de agarose, mas não apresentaram amplificação no seqüenciador foram considerados como dado perdido. A partir da matriz de similaridade genética foi possível gerar dois dendrogramas com base na análise molecular. Um terceiro dendrograma foi gerado a partir dos dados de virulência de 18 desses isolados quando inoculados sobre 70 genótipos de plantas jovens de trigo conforme descrito no Capítulo I. Para construção dos dendrogramas utilizou-se o programa NTSYSpc 2.02 (ROHLF, 1997). Para a estimativa da similaridade genética entre os isolados foi utilizado o coeficiente de Jaccard, que se baseia na comparação entre o número de atributos comuns para um par de objetos e o número total de atributos envolvidos, desconsiderando a ausência em ambos os objetos. Próprio para análise de dados do tipo ausência e presença.

Coeficiente de Jaccard= $a/(a+b+c)$ onde:

a= presença do caráter em ambos os objetos;

b= caráter presente em um objeto e ausente no outro;

c=caráter ausente em um objeto e presente no outro;

Para o agrupamento hierárquico dos isolados utilizou-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*). Nos métodos de agrupamento com base na média aritmética, os coeficientes de similaridade (ou dissimilaridade) médios entre o indivíduo que se pretende agrupar e os indivíduos do grupo já existente são calculados. O método UPGMA não considera a estrutura de subdivisão do grupo, dá pesos iguais a cada indivíduo do grupo e calcula a similaridade média de um indivíduo que pretende se juntar ao grupo já existente (MEYER, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em géis de agarose verificou-se que os *primers* utilizados no experimento formaram tanto bandas polimórficas (Figuras 1a e c) quanto monomórficas (Figura 1b), para todos os isolados, inclusive o do arroz.

A amplificação do DNA dos isolados através do seqüenciador também confirmou a formação de fragmentos polimórficos e monomórficos. Nesse sentido, na Figura 2, é possível verificar o polimorfismo gerado pelo *primer* MGM 21 para os isolados Py 5001, Py 5020 e Py 3.3.1. Conforme pode ser observado na Tabela 5, considerando todos os isolados utilizados no experimento isto é, incluindo o isolado obtido do arroz, os únicos *primers* monomórficos foram o PG 03a e o PG 20. Os demais foram polimórficos.

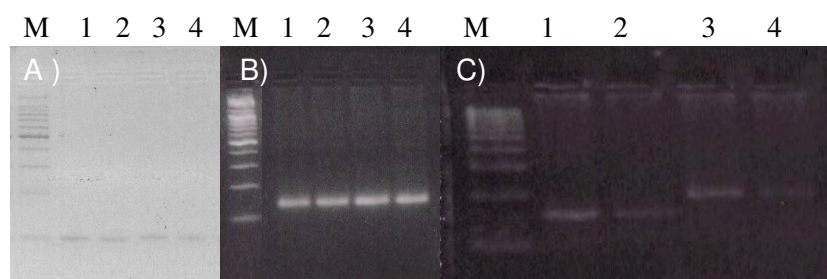


Figura 1- Amplificação do DNA dos isolados: (1) Py 5001, (2) Py 5002, (3) Py 5003, (4) Py 5005, com os *primers* (A) MGM01, (B) MGM21 e (C) PG05. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. Marcador molecular Ladder 100 pb (M). Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

Com exceção do isolado Py 6025, todos os isolados de MG e GO apresentaram o mesmo padrão molecular não havendo distinção entre regiões e partes vegetais dos quais os esporos foram isolados. Vale lembrar que esses isolados são oriundos do mesmo cultivar BRS 208 em regiões geográficas diferentes, mas no mesmo ano (2006). A presença de alelos nulos foi verificada apenas nos isolados do cultivar BRS 208 do PR e GO. O *primer* PG 03 apresentou dois *loci*, em um deles foi possível amplificar um fragmento de 113 pb comum a todos os isolados, no segundo *locus* foram produzidos fragmentos de 126 e 127 pb. Embora a PCR com microssatélites geralmente produza uma banda, a presença de bandas adicionais é o produto do escorregamento da fita de DNA durante a replicação. O deslocamento das fitas do fragmento de DNA desnaturado e o erro no pareamento das bases complementares no lugar de uma seqüência já existente resulta na

produção de um fragmento maior que o existente e serve de base para futuros escorregamentos (GARRIDO, 2001).

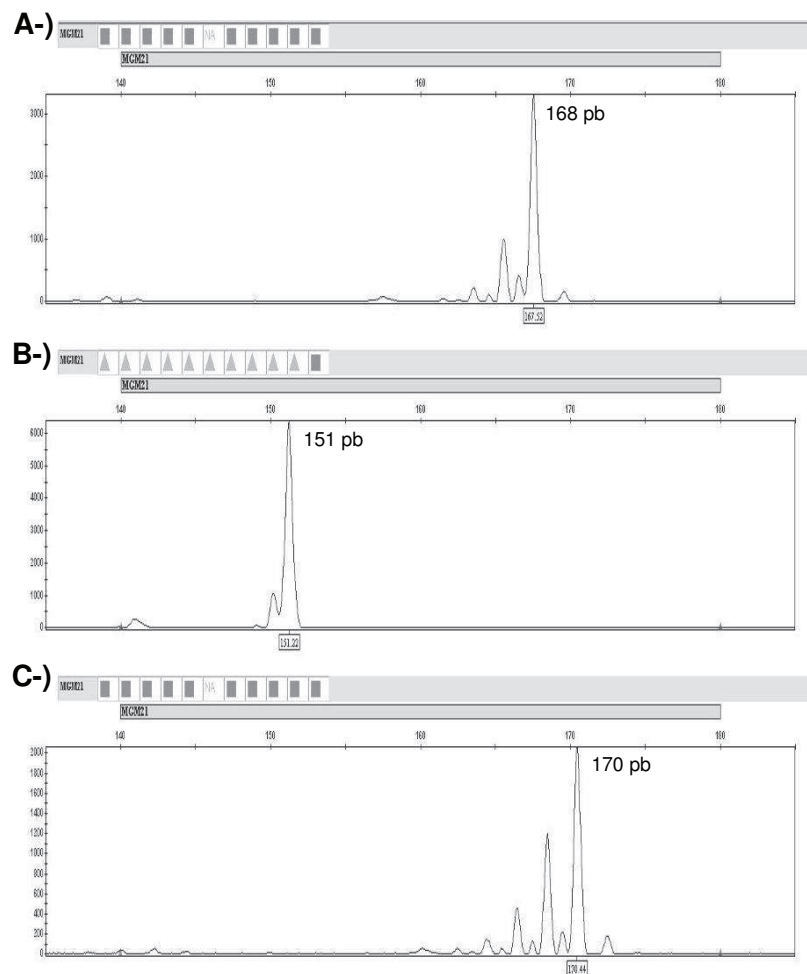


Figura 2- Análise do perfil de amplificação dos genótipos (A) Py 5001, (B) Py 5020, e (C) Py 3.3.1 com os *primers* MGM21 e M13F1 (marcado com 6-FAM). O número ao lado de cada pico indica o tamanho do produto amplificado em pares de base (pb). Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2007.

Tabela 5- Sequências de DNA de *Pyricularia grisea* amplificadas em seqüenciador automático a partir de 8 *primers* microssatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007

Isolados	<i>Primers</i>								
	MGM01	MGM21	PG03a	PG03b	PG05	PG12	PG15	PG20	PG21
Py 5001	97	168	113	127	149	107	126	144	205
Py 5002	97	168	113	127	149	107	126	144	205
Py 5003	100	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5005	100	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5012	100	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5015	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5017	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5020	97	151	113	127	185	101	126	144	205
Py 5021	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5022	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5025	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5029	97	168	113	127	197	107	126	144	235
Py 5031	97	168	113	127	197	107	126	144	235
Py 5034	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 5038	97	151	113	127	185	101	126	144	205
Py 5039	100	168	113	126	AN	107	126	144	205
Py 5042	97	168	113	127	195	107	126	144	AN
Py 5047	100	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6001	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6008	97	168	113	127	DP	107	126	144	205
Py 6010	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6012	97	168	113	127	DP	107	126	144	205
Py 6015	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6018	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6025	97	168	113	126	195	107	126	144	205
Py 6028	97	168	113	127	195	107	126	144	AN
Py 6030	DP	168	113	127	AN	107	126	144	AN
Py 6032	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6041	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6044	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 6048	97	168	113	127	195	107	126	144	205
Py 3.3.1	144	170	113	126	183	121	121	144	226

DP= dado perdido; AN= alelo nulo

O *primer* mais polimórfico foi o PG 05, o único que permitiu a diferenciação dos isolados do Rio Grande do Sul dos demais. Esse *primer* apresentou 5 padrões de bandas (197, 195, 185, 183, 149 pb). Os isolados Py 5029 e Py 5031 oriundos do mesmo cultivar puderam ser distinguidos dos demais pelos *primers* PG 05 e PG 21. Os isolados Py 5020 e Py 5038 foram diferenciados dos demais isolados pela eficiência dos *primers*: MGM 21, PG 05 e PG 12. Os *loci* MGM 01, MGM 21, PG 03a, PG 03b, PG 05, PG 12, PG 15, PG 20, PG 21, apresentaram respectivamente: 3, 3, 1, 2, 5, 3, 2, 1 e 3 alelos. O isolado do arroz com exceção dos *loci* PG 03a e PG 20 apresentou um padrão de bandas diferente dos isolados de trigo (Tabela 5; Figura 2). Este resultado demonstra a sensibilidade que os *primers* utilizados apresentaram na análise da variabilidade dos isolados testados.

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, triticales e espécies daninhas. Esse fato evidenciou a conservação dos *loci* testados em isolados de diferentes hospedeiros, obtidos de regiões geográficas distintas (BRONDANI *et al.*, 2000; GARRIDO, 2001). 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 05 e PG 21. O *locus* PG 03 apresentou mais que uma banda, 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 3). Já o isolado proveniente de arroz apresentou 14 % de similaridade em relação aos isolados de trigo. O conjunto dos 31 isolados de *P.grisea* do trigo foi dividido em quatro grupos, caracterizados pelas letras A, B, C e D. Os isolados pertencentes a cada grupo apresentaram uma similaridade mínima entre si de 75%. O grupo A foi formado por 22 isolados, 18 desses apresentaram, no mínimo, 90% 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) e os isolados de Goiás que apresentaram mais de 85% de similaridade. De um mesmo centro comum com 75% de similaridade ocorreu uma ramificação que uniu isolados de todas as regiões amostradas. O grupo B foi composto por cinco isolados. O grupo C foi formado pelos isolados Py 5031 e Py 5029 (63% de similaridade) ambos originários do cultivar CD 105 (Tabela 1). O grupo D apresentou menor similaridade genética em relação ao restante dos isolados, foi composto pelos isolados: Py 5038 e Py 5020 (47%).

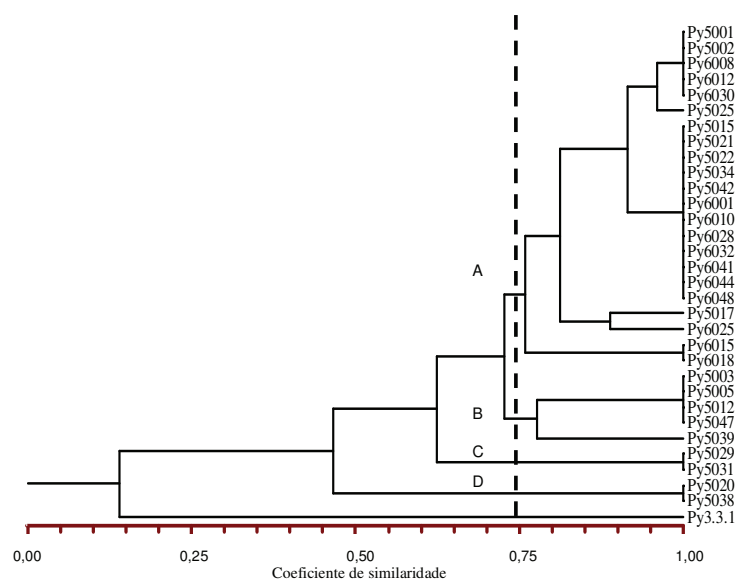


Figura 3- Dendrograma baseado no perfil de amplificação do DNA de 32 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizando 8 *primers* microssatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

Um segundo dendrograma (Figura 4) foi construído para avaliar separadamente as relações de similaridade dos 18 isolados que foram utilizados em inoculações e fizeram parte do Capítulo I desta dissertação. De maneira geral não foi observada diferença acentuada em relação à distribuição dos isolados e no próprio formato do novo dendrograma. Entre os 18 isolados também foi possível formar quatro grupos (a, b, c, d) com no mínimo 75% de similaridade entre si (Figura 4). Os isolados que apresentaram menor similaridade genética em relação ao resto do grupo foram Py 5020 e Py 5038 (47%).

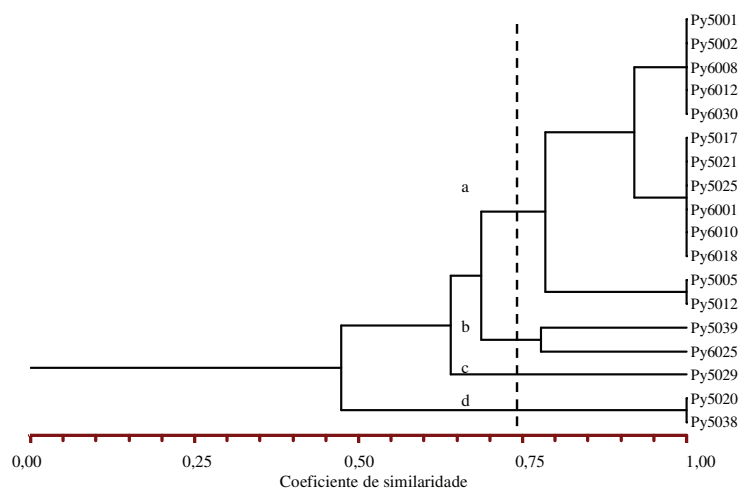


Figura 4- Dendrograma baseado no perfil de amplificação do DNA de 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizando 8 *primers* microssatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

Dessa forma, um terceiro dendrograma (Figura 5) 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 a' até c', 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).

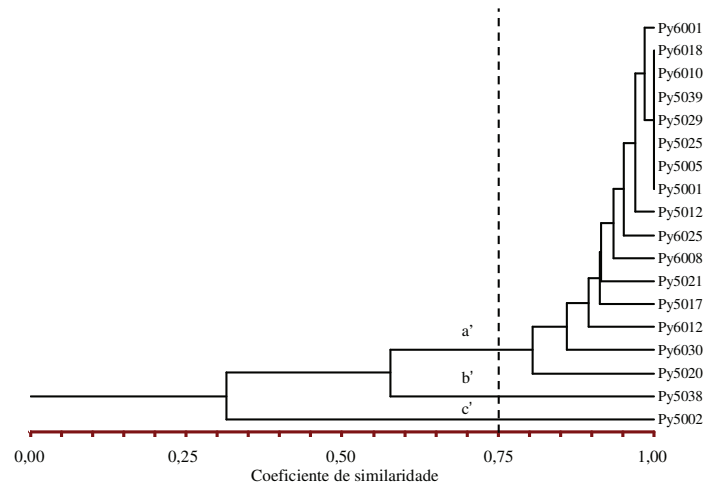


Figura 5- Dendrograma baseado na reação de 70 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

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 a' de virulência é o que mais se difere dos demais isolados.

Os dados obtidos evidenciaram uma estreita similaridade molecular entre os isolados utilizados no experimento, mesmo tendo sido obtidos de locais, cultivares, estruturas vegetais e períodos diferentes. Os isolados coletados no estado do Paraná, embora tenham sido obtidos de cultivares diferentes são originários de um mesmo campo, num mesmo momento. Já os isolados de Minas Gerais e Goiás foram coletados em regiões distintas, mas são originários do mesmo cultivar, BRS 208 no ano de 2006.

Embora o número de isolados utilizados no trabalho não tenha sido muito amplo, com um número restrito de municípios onde foi realizada a coleta de plantas com sintomas de brusone, estes isolados representam um importante segmento da população de *P. grisea* que ocorre no Brasil, se for considerado, por exemplo, que os mesmos foram obtidos de plantas coletadas de um número representativo de estados brasileiros (4). Para classificação desses isolados, com suas respectivas particularidades, os *primers* foram eficientes, pois geraram polimorfismo que permitiu separar os 18 isolados utilizados no experimento em grupos distintos. Estes resultados estão de acordo com a observação de Chada & Gopalakrishna (2005), segundo os quais, isolados que apresentam um padrão semelhante de regiões amplificadas constituem agrupamentos genéticos, que podem ser identificados por índices de similaridade.

Observando-se os dendrogramas construídos, pôde-se verificar que a variabilidade genética detectada foi bastante compatível com a variabilidade apresentada pelos isolados em relação às suas respectivas capacidades infectivas e de virulência. Essa era a expectativa inicial do trabalho, ou seja, estabelecer uma característica única que contemplasse aspectos relacionados à variabilidade genética e fenotípica, esta última apresentada pela questão da virulência. Embora inicialmente já tenha sido proposto, para *P. grisea* do arroz, que a relação entre as características moleculares e de virulência fosse relativamente simples (LEVY *et al.*, 1991), avaliações realizadas em períodos posteriores demonstraram que existe 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.

Apesar das discrepâncias mencionadas, a estratégia de se utilizar marcadores para monitorar a população e os próprios genes de avirulência de *P. grisea* de arroz já demonstrou sua eficiência. Filippi *et al.* (1999), por exemplo, utilizando o marcador MGR-586, determinaram a prevalência de dois variantes moleculares distintos de *P. grisea* capazes de infectar cada um dos cultivares de arroz: Cica-8 e Metica-1. Além disso, o uso de marcadores moleculares continuam sendo avaliados quanto à sua utilidade para caracterizar *P. grisea* em diferentes países (ADREIT *et al.*, 2007; PRABHU *et al.*, 2007; URASHIMA *et al.*, 2007; BUSSO, 2005;; PRABHU *et al.*, 2002; GARRIDO, 2001; BRONDANI *et al.*, 2000; CORREL *et al.*, 2000)

Assim, o presente trabalho representa uma das primeiras iniciativas realizadas no Brasil de avaliações de *P. grisea* do trigo em nível molecular e de virulência. É um dos primeiros passos para identificação e monitoramento da variabilidade fenotípica e genética da população do patógeno existente no País.

4 CONCLUSÕES

Nas condições em que a pesquisa foi desenvolvida, os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) existe compatibilidade nos agrupamentos baseados em padrões moleculares e de virulência a que os isolados foram submetidos;
- b) a avaliação dos isolados utilizados no experimento, que apresenta uma amostra da população do patógeno, indica que *P. grisea* no Brasil é bastante homogênea em relação às suas características genéticas e de virulência;
- c) há uma maior similaridade genética entre isolados de um mesmo cultivar (BRS 208) obtidos de regiões geográficas distintas (PR, MG e GO);
- d) devido à eficiência que demonstraram para agrupar os isolados utilizados, os *primers* MGM21 e PG12, são os que apresentam maior potencial para estudos de avaliação da população do fungo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados no trabalho são um indicativo da complexidade dos fatores envolvidos no patossistema *Pyricularia grisea* - trigo, que permitem a formulação de novos questionamentos como:

- há resistência qualitativa à brusone do trigo?
- os genótipos de trigo sintético são realmente resistentes a populações de *P. grisea* de diferentes regiões?
- quais os fatores envolvidos na resistência em planta jovem e planta adulta?
- por que alguns genótipos apresentam reações contrastantes nas diferentes fases de desenvolvimento da planta?
- quais são as melhores combinações genéticas para que a obtenção de resistência à brusone de acordo com a área geográfica de interesse, ou, uma combinação seria eficiente para todas as regiões?
- a variabilidade genética de *P. grisea* é realmente tão estreita como apresentado no trabalho quando se analisa um número maior de isolados? Dentre outros.....

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADREIT, H.; ANDRIANTSIMALONA, D.; UTAMI, D.W.; NOTTEGHEM, J.L.; LEBRUN, M.H.; THARREAU, D. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology*, Oxford, v.7, p. 667-670. 2007.

ALMEIDA, A.B. *Identificação e caracterização de fontes de resistência à ferrugem da folha em Triticum tauschii Coss. Schmal*. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

ARAÚJO, L.G.; SILVA, G.B.; PRABHU, A.S. Virulence pattern of *Pyricularia grisea* isolates from farmers' fields on newly released upland rice cultivars. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.30, n.6, p. 623-628, nov-dec. 2005.

ARRUDA, M.A.; BUENO, C.R.N.C.; ZAMPROGNO, K.C.; LAVORENTI, N.A.; URASHIMA, A. S. Reação do trigo à *Magnaporthe grisea* nos diferentes estádios de desenvolvimento. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.30, n.2, p.121-126.mar-abr. 2005.

AZEVEDO J.L.; COSTA S.O.P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, EDUSP: Editora Nacional, 1973, 288 p.

BACALTCHUK, B.; SILVA, H.R.C. *Nasce uma nova era: o trigo recupera sua nobreza*. 1. ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001.172 p.

BARROS, B.C.; FELÍCIO, J.C.; CAMARGO, C.E.O.; FERREIRA FILHO, A.W.P. Reação de cultivares de trigo à brusone em condições de campo. CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 12,

1989, Araras. *Resumos...* Araras: Summa Phytopathologica, 1989.p. 21.

BERED, F.; CARVALHO, F.I.F.; BARBOSA NETO, J.F. Variabilidade genética em trigo. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Jaboticabal, n.14, p. 22-25. maio-jun. 2000.

BONMAN, J.M. Durable resistance to rice blast disease-environmental influences. *Euphytica*, Wageningen, v. 63, p.115-123.1992.

BONMAN, J.M.; ESTRADA, B.A.; BANDONG, J.M. Leaf and neck blast resistance in tropical lowland rice cultivars. *Plant Disease*, St. Paul, v. 73, n.5, p.388-390.1989.

BRAMMER, S.P. *Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal*. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/pdo03.htm>> Acesso em: 2005.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; GARRIDO, L.; FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers for genetic analysis of *Pyricularia grisea*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 31, 1998, Fortaleza. *Resumos...*, Fortaleza: Fitopatologia Brasileira, 1998. p. 230.

_____. Development of microsatellite markers for genetic analysis of *Pyricularia grisea*. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 753-762. 2000.

BRUNETTA, D.; BASSOI, M.C.; DOTTO, S.R.; SCHEEREN, P.L.; MIRANDA, M.Z.; TAVARES, L.C.V.; MIRANDA, L.C. Características e desempenho agrônômico do cultivar de trigo BRS 229 no Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 5, p. 889-892, maio 2006.

BRUNO, A. C; URASHIMA, A.S. Interrelação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo e de outros hospedeiros. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.26, n.1, p.21-26.mar.2001.

BUSSO, C. *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 (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: editora UFV. 2006. p.09-78.

CÁRDENAS, R. M; HERNÁNDEZ, M.M. Caracterización morfológica de un aislamiento de *Pyricularia grisea* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Cultivos Tropicales*, Habana, v.18, n.2, p. 40-43, 1997.

CAVALLI, S.M. Polimorfismos moleculares. In: FREITAS, L.B.; BERED, F.(Org.). *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2003.p.311-332.

CHADA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Retrotransposon-icosatellite amplified polymorphism (REMAP) markers for genetic diversity assessment of the rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*). *Genome*, Ottawa, v.48, p.943-945. 2005.

CORRELL, J.C.; HARP, T.L.; GUERBER, J.C.; ZEIGLER, R.S.; LIU, B.; CARTWRIGHT, R.D.; LEE, F.N. Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology*, St. Paul, v. 90, n.12, p.1396-1404.2000.

COX, T.S.; SEARS, R.G.; BEQUETTE, R.K.; MARTIN, T.J. Germplasm enhancement in winter wheat x *Triticum tauschii* backcross populations. *Crop science*, Madison, v.35, p.913-919, 1995.

CUNHA, G.R. *Trigo no Brasil: História e tecnologia de produção*. 1. Ed. Passo Fundo: Embrapa trigo, 2001. 208 p.

EMBRAPA CERRADOS. *Embrapa Cerrados: conhecimento, tecnologia e compromisso ambiental*. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/unidade/informaçõesgerais.pdf>>. "Acesso em: fev.2008."

FEDERIZZI, L. C.; CANCI, P.C.; MILACH, S.C.K.; BARBOSA NETO, J.F.; PACHECO, M.T. Hibridação em trigo. In: BORÉM, A.(Org.). *Hibridação Artificial de Plantas*. Viçosa: editora UFV, 1999 a .p. 481- 497.

FEDERIZZI, L. C.; SCHEEREN, P.L.; BARBOSA NETO, J.F.; MILACH, S.C.K.; PACHECO, M.T. Hibridação em trigo. In: BORÉM, A.(Org.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: editora UFV, 1999 b. p. 535-571.

FILIPPI, M.C.; PRABHU, A.S. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from brazilian upland rice cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.36, n.1, p.27-35, jan. 2001.

FILIPPI, M.C.; PRABHU, A.S.; ARAUJO, L.G.; BARATA, G. Análise da estrutura genética de isolados de *Pyricularia grisea* provenientes do cultivar de arroz irrigado, Metica-1. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22, 1999, Jaboticabal. *Resumos...* Jaboticabal: Summa Phytopathologica, 1999.p. 42.

FREITAS, L. B. *Variabilidade genética e defesa contra doenças de trigo: comparações intra e interespecífica*. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

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 (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

GEORGE, M.L.C.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG, H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequence. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, p. 223-229. 1998.

GOULART, A.C.P. Hora certa de proteger. *Cultivar: grandes culturas*, Pelotas, n.52, p.28-31, jul.2003.

_____. *Perdas em trigo causadas pela brusone*. Disponível em: <<http://www.Ufv.br/dfp/workshop/Resumos/perdas%20trigo%20brusonepdf>> Acesso em : 09 set.2004.

GOULART, A.C.P; MESQUITA, A.N.; PAIVA, F.A. Eficiência do tratamento químico de sementes de trigo no controle de *Pyricularia oryzae* e *Cochliobolus sativus* (*Helminthosporium sativum*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.15, n.4, p.302-304, dez. 1990.

GOULART, A.C.P; PAIVA, F.A. Incidência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.17, n.3, p.321-325, set. 1992.

_____. Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, n.2, p.167-173, jun. 1993.

GOULART, A.C.P; PAIVA, F.A; ANDRADE, P.J.M. Relação entre a incidência da brusone em espigas de trigo e a presença de *Pyricularia grisea* nas sementes colhidas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, n.2, p.184-189, jun.1995.

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F.A.; MESQUITA, A.N. Perdas em trigo (*Triticum aestivum*) causadas por *Pyricularia oryzae*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.17, n.1, p.115-117, abr.1992.

GOULART, A.P.; AMABILI, R.F.; NASSER, L.C.B.; FREITAS, M.A. Detecção de *Pyricularia grisea* em sementes de cevada produzida em sistema irrigado por pivô central no Cerrado brasileiro. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.28, n.5, p.566, set-out.2003.

GUTIÉRREZ, S.A.; CASTAÑÓN, M.M.A.; GALMARINI, M.R. Avances el conocimiento de hospedantes espontáneos de *Pyricularia grisea* en Argentina. Disponível em: <http://www.lunne.edu.ar/cyt/2000/5_agrarias/a_pdf/a_043.p>. Acesso em: 2007.

HAMER, J.E.; FARRAL, L.; ORBACH, M.J.; VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. Host species-specific conservation of family of repeat DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proceedings of the National Academy of sciences of United States of America*, Washington, v. 86, p. 9981-9985, 1989.

HEBERT, T.T. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*, St. Paul, v.61, n.1, p. 83-87, 1971.

HWANG, B.K.; KOH, Y.J.; CHUNG, H.S. Effects of adult-plant resistance on blast severity and yield of rice. *Plant Disease*, St. Paul, v. 71, n.11, p.1035-1038. nov.1987.

IGARASHI, S. Brusone no trigo- histórico e distribuição geográfica no Paraná. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 15, Passo Fundo. *Resumos...*Passo Fundo: Embrapa, 1988 a. p.157.

_____. “Brusone” do trigo- sintomatologia. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 15, Passo Fundo. *Resumos...*Passo Fundo: Embrapa, 1988 b. p.158.

_____. “Brusone” do trigo- controle. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 15, Passo Fundo. *Resumos...*Passo Fundo: Embrapa, 1988 c. p.159.

IGARASHI, S.; UTIAMADA, C.M.; IGARASHI, L.C.; KAZUMA, A.H.; LOPES, R.S. *Pyricularia* sp. Em trigo. I. Ocorrência de *Pyricularia* sp. No estado do Paraná. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 14, 1986, Londrina. *Resumos...* Londrina: IAPAR, 1986.p.57.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. Standart evaluation system for rice. 4nd ed. Manila. 1996.

KACHROO, P.; LEONG, S.A.; CHATHOO, B.B. *Pot-2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular General Genetics*, New York, v. 245, p. 39-48.1994.

KOH, Y.J.; HWANG, B.K.; CHUNG, H.S. Adult-plant resistance of rice to leaf blast. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.2, p. 232-236.1987.

KRANZ, J; SCHMUTTERER, H; KOCH, W. *Enfermedades, Plagas y Malezas de los Cultivos Tropicales*, Berlín: GTZ, 1982.

LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F.S.; ZEIGLER, R.S.; XU, S.; HAMER, J.E. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, p. 1427-1433.1993.

LEVY, M.; ROMAO, J.; MARCHETTI, M.A.; HAMER, J.E. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *The Plant Cell*, Rockville, v.3, p.95-102.1991.

LUCCA FILHO, O. A.; PORTO, M.D.M.; PIEROBOM, C.R.; DUTRA, L.M.D. *Pyricularia grisea* em sementes fiscalizadas de

azevém- anual (*Lolium multiflorum* Lam.). *Revista Científica Rural*, Bagé, v. 5, n. 2, p. 21-26, 2000.

MACIEL, J.L.N.; RODRIGUES, P.C.S.; AVOZANI, O, A.; MORAES, M.G. Padrão molecular e de virulência de isolados de *Pyricularia grisea* do estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.29, n.5, p.504-510, set-out. 2004.

MACIEL, J.L.N.; PRESTES, A.M. Teste negativo. *Cultivar: grandes culturas*, Pelotas, n.72, p.06-09, abr.2005.

MARTINS, T.D.; LAVORENTI, N.A; URASHIMA, A.S. Comparação entre métodos de avaliação de transmissão de *Pyricularia grisea* através de sementes em triticales. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.29, n.4, p.425-428, jul-ago. 2004.

MEHTA, Y.R. Enfermedades de la espiga. In: _____. *Manejo Integrado de Enfermedades del trigo*. Santa Cruz de La Sierra: CIAT, 1993. p.112.

MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D. Importância da semente na disseminação de *Pyricularia sp.* na cultura do trigo. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 11, 1988, Campinas. *Resumos...* Campinas: Summa Phytopathologica, 1988.p. 53.

MEYER.A.S. *Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes*. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. (Ed.). *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.p.17-28.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Domesticar o grão. *Ciência Hoje*, São Paulo, v.3, n. 17, p.36-45. mar-abr.1985.

MUNDSTOCK, C. M. *Planejamento e manejo integrado da lavoura de trigo*. 1. ed. Porto Alegre: Evangraf, 1999.

MURAKAMI, J.; HAU, V.T.B.; MAYAMA, S.; TOSA, Y. Reduction in aggressiveness among hybrids between host-specific pathotypes of *Magnaporthe oryzae* is caused by reduced ability to overcome adult resistance at the level of penetration. *Journal of General Plant Pathology*, v.72, p.284-291. 2006.

NUNES, C.D.M.; CARVALHO, F.I.F.; PIEROBOM, C.R.; OLIVEIRA, A.C. Genética da resistência de cultivares de arroz à raça IA-1 de *Pyricularia grisea*. *Fitopatologia Brasileira*, Lavras, v.32, n. 1, p.64-69, jan-fev.2007.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, jan. 2006.

OU, H.S.; AYAD, M.R. Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesions and monoconidial cultures. *Phytopathology*, St. Paul, v.58, n.1, p. 179-182, feb.1968.

OU, S.H. *Rice diseases*. 2. ed. Kew: Commonwealth Mycology Institute, 1985. 380p.

PAPPAS, A; PAPLOMATAS, E. J. *Pyricularia* leaf spot: A new disease of ornamental plants of the family Marantaceae. *Plant Disease*, St. Paul, v.82, n.5, p.465-469, maio.1998.

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P. *Darwin software*. Disponível em: < <http://darwin.cirad.fr/darwin> >. 2006.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, v.5, p.141-238. 1953.

PRABHU, A.S.; ARAÚJO, L.G.; SILVA, G.B.; TRINDADE, M.G. Virulence and rep-PCR analysis of *Pyricularia grisea* isolates from two brazilian upland rice cultivars. *Fitopatologia Brasileira*, Lavras, v.32, n.1, p.013-020, jan-fev.2007.

PRABHU, A.S.; BEDENDO, I.P. Avaliação de resistência horizontal a brusone em cultivares de arroz. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.16, n.1, p. 34-39, mar. 1991.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. *Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 388p.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; ARAÚJO, L.G.; FARIA, J.C. Genetic and phenotypic characterization of isolates of *Pyricularia grisea* from the rice cultivars Epagri 108 and 109 in the state of Tocantins. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.27, n.6, p.566-673, nov-dec.2002.

PRABHU, A.S.; SOAVE, J.; ZIMMERMANN, F.J.P.; FILIPPI, M.C.; SOUZA, N.R.G.; CURVO, R.C.V.; LOPES, A.M.; SOBRAL, C.A.M.; FERREIRA, R.P.; TOBAYASHI, T.; GALVÃO, E.U.P. Genetic variability for disease resistance in brazilian upland rice native germplasm. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 31, n. 6, p. 413-424, jun. 1996.

PRESTES, A. M; ANGRA, D. C.; BARBOSA, M. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Fontes de resistência a *Stagonospora nodorum* em *Aegilops squarrosa*, espécie afim ao trigo cultivado. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 4, p. 510-513, dez. 1994.

PRESTES, A. M. ; ARENDT, P. F. ; FERNANDES, J. M. C. ; SCHEEREN, P. L. Resistance to *Magnaporthe grisea* among Brazilian wheat genotypes. In: BUCK, H.T.; NISI, J.E.; SALOMÓN,N. (Org.). *Wheat Production in Stressed Environment*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007, v. 12, p. 119-124.

PRESTES, A.M.; GOULART, L.R. Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. *Revisão anual de patologia de plantas*, Passo Fundo, v.3, p.315-363, 1995.

PURCHIO-MUCHOVEJ, A; MUCHOVEJ, J.J. O gênero *Pyricularia* e seus teleomorfos. *Revisão anual de patologia de plantas*, Passo Fundo, v.2, p.175-208, 1994.

PURI, K.D.; SHRESTHA, S.M.; JOSHI, K.D.; KC, G.B. Reaction of different rice lines against leaf and neck blast under field condition of Chitwan Valley. *Journal Institute of Agriculture and Animal Sciences*, Rampur, v.27, p.37-44. 2006.

PUTZKE, J; PUTZKE, M.T.L. *Os reinos dos fungos*. Santa Cruz do Sul, EDUNISC, 1998, v.1.

QUAMARUZZAMAN, M.; OU, H.S. Monthly changes of pathogenic races of *Pyricularia oryzae* in a blast nursery. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, n. 2, p. 1266-1269, aug.1970.

RIBEIRO DO VALE, F.X.; PARLEVLIE, J.E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v. 26, n.3, p. 577-589. set.2001.

RIEDE, C.R. Alerta no PR. *Cultivar: grandes culturas*, Pelotas, n.65, p.13. set.2004.

RÖDER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M.; LEROY, P.; GANAL, M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, Baltimore, v.149, p.2007-2023. aug.1998.

ROHLF, F.J. NTSYS-PC ver. 2.02. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Publishing, Setauket, New York. 1997.

ROSSMAN, A. Y; HOWARD, R. J; VALENT, B. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia*, New York, v.82, n.4, p. 509-512, 1990.

ROUMEN, E.C. Partial resistance to neck blast influenced by stage of panicle development and rice genotype. *Euphytica*, Wageningen, v.63, p.173-182.1992a.

ROUMEN, E.C. Effect of leaf age on components of partial resistance in rice to leaf blast. *Euphytica*, Wageningen, v.63, p.271-279.1992b.

SHULL, V.; HAMER, J.E. Genomic structure and variability in *Pyricularia grisea*. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds.). *Rice blast disease*. Wallingford: CAB International, 1994. p. 65-86.

SILVA, G.B.; ZAMBOLIM, L.; PRABHU, A.S.; ARAÚJO, L.G.; ZIMMERMANN, F.J.P. Estimation of phenotypic diversity in field populations of *Magnaporthe grisea* from two upland rice cultivars. *Fitopatologia Brasileira*, Lavras, v.32, n.1, p. 05-12, jan-fev. 2007.

SIRITHUNYA, P.; TRAGOONRUNG, S.; VANAVICHIT, A.; PA-IN, N.; VONGSAPROM, C.; TOOJINDA, T. Quantitative trait loci associated with leaf and neck blast resistance in recombinant inbred line population of rice (*Oryza sativa*). *DNA Research*, Oxford, v.9, p.79-88, 2002.

SPECHT, C.A.; DIRUSSO, C.C.; NOVOTNY, C.P.; ULLRICH, R.C. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 119, p.158-163. 1982.

TRINDADE, M.G.T.; PRABHU, A.S.; SÓ E SILVA. *Resistência parcial de genótipos de trigo a brusone nas folhas*. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co201.htm> Acesso em : nov.2006.

URASHIMA, A.S.; GIGLIOT, E.A.; LAVORENTI, N.A.; GOULART, A.C.P. Diversidade patogênica da brusone (*Magnaporthe grisea*) do trigo (*Triticum aestivum*) de regiões geograficamente distintas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 32, 1999, Curitiba. *Resumos...* Curitiba: Fitopatologia Brasileira, 1999.p. 339.

URASHIMA, A.; IGARASHI, S; KATO; H. Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. *Plant disease*, St. Paul, v.77, n.12, p.1211-1216, dec.1993.

URASHIMA, A.; KATO; H. Pathogenic relationship between isolates of *Pyricularia grisea* of wheat and other host at different host developmental stages. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.23, n.1, p.30-35, mar. 1998.

URASHIMA, A.; KATO; H. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.20, n.2, p.107-112, mar. 1994.

URASHIMA, A.; LEITE, S. F.; GALBIERI, R. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.33, n.3, p.275-279, jul-set. 2007.

URASHIMA, A.S. Genetic analysis of *Magnaporthe grisea* pathogenicity on wheat. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.24, n. 4, p.567-569, dec.1999.

URASHIMA, A.S., BRUNO, A.C.; LAVORENTI, N.A. Análise da segregação de avirulência de *Magnaporthe grisea* do trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.26, n. 3, p.644-648, set.2001.

URASHIMA, A.S., LAVORENTI, N.A. GOULART, A.C.P.; MEHTA, Y.R. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.29, n. 5, p.511-518, set-out.2004.

VALENT, B.; CRAWFORD, M.S.; WEAVER, C.G.; CHUMLEY, F.G. Genetic studies of fertility and pathogenicity in *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*). *Iowa State Journal of Research*, Ames, v.60, n.4, p.569-594, May 1986.

VILLAREAL, R.L.; MCKENZIE, D.R.; NELSON, R.R.; COFFEMAN, W.R. Apparent infection rates of *Pyricularia oryzae* on different rice cultivars. *Phytopathology*, St. Paul, v.70, p. 1224-1226.1980.

WANG, Z.; MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. Inheritance of partial resistance to blast in indica rice cultivars. *Crop science*, Madison, v.29, n.4, p.848-853, jul-aug. 1989.

ZADOKS, J.C.; CHANG, T.T.; KONZAK, C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, Amsterdam, v.4, n.14, p.415-421, 1974.

ZEIGLER, R.S. Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 36, p. 249-276, 1998.

ZEIGLER, R.S.; COUC, L.X.; SCOTT, R.P.; BERNARDO, M.A.; CHEN, D.H.; VALENT, B.; NELSON, R.J. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology*, St. Paul, v. 85, n. 4, p.443-451, apr.1995.