

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESPECTRO DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *PYRICULARIA GRISEA* DO RIO GRANDE DO SUL

João L. N. Maciel⁽¹⁾, Paula Caroline S. Rodrigues⁽¹⁾, Marcelo Gravina de Moraes⁽²⁾. 1. IRGA/EEA. Caixa Postal 29, CEP 94930-030. Cachoeirinha, RS, E-mail: irgamelh@via-rs.net 2. Faculdade de Agronomia/UFRGS. Caixa Postal 776, CEP 90001-970-Porto Alegre, RS.

A utilização de cultivares resistentes tem sido a principal recomendação de manejo da brusone no Estado, sendo que a obtenção de genótipos com essas características é um dos principais objetivos do Programa de Melhoramento de Arroz Irrigado do IRGA (PMAI). No entanto, a maior dificuldade para a aplicação dessa estratégia de controle tem sido a “quebra” ou “perda” da resistência das cultivares, o que ocorre normalmente 3 a 4 anos após seu lançamento (CORREA-VICTORIA & ZEIGLER, 1993). De acordo com ZEIGLER *et al.* (1994), a principal causa para que os genótipos passem a se tornar suscetíveis é a variabilidade do fungo. Com isso, os programas de melhoramento tem procurado obter genótipos que sejam resistentes a todos os variantes predominantes no local a que se destinam as novas cultivares.

A classificação do fungo em raças, as quais são determinadas de acordo com a reação à doença de um grupo de cultivares, tem sido a forma mais utilizada para estudar e compreender toda a diversidade do patógeno (OU, 1985). De outra forma, técnicas moleculares também tem sido utilizadas para verificar e entender a variabilidade existente na população do fungo (CORREA-VICTORIA & ZEIGLER, 1993). Com o uso dessas técnicas foi possível caracterizar a população de *P. grisea* na Colômbia, nos Estados Unidos e nas Filipinas (CHEN *et al.*, 1995; CORREA-VICTORIA & ZEIGLER, 1993; LEVY *et al.*, 1991). Os marcadores moleculares tem tornado possível simplificar a variabilidade patogênica do fungo de uma determinada região em um número de variantes ou tipos menor do que o de raças.

Assim, foi realizado um conjunto de procedimentos em laboratório e em casa-de-vegetação com os objetivos de verificar (1) a variabilidade genética de isolados de *P. grisea* obtidos no Rio Grande do Sul e (2) o seu espectro de virulência em genótipos de arroz com diferentes genes de resistência.

Os isolados monospóricos de *P. grisea* foram obtidos de plantas de arroz coletadas de lavouras do interior do Rio Grande do Sul e de parcelas experimentais que foram instaladas em 10 regiões arrozeiras do Estado nas safras agrícolas de 1999/2000 e 2000/01, onde se plantou 28 genótipos distintos. Do micélio dos isolados de *P. grisea*, crescido em meio líquido enriquecido, extraiu-se o DNA genômico para ser utilizado em reações de PCR com iniciadores baseados na sequência dos elementos repetitivos *Pot2* (KACHROO *et al.*, 1994). Utilizou-se o programa estatístico NTSYS para construção das matrizes de similaridade e dos dendrogramas, os quais foram feitos pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, respectivamente (SNEATH & SOKAL, 1973).

A determinação do espectro de virulência dos isolados de *P. grisea* foi realizada através da inoculação em plantas das cultivares diferenciadoras de patótipos Caloro, Dular, Kanto 51, NP 125, Raminad STR 3, Shao Tiao Tsao, Usen e Zenith, e nas linhagens isogênicas (NILs, “near isogenic lines”) C104 LAC, C101 A51, C101 PKT, C104 PKT, C105 TTP e IR 1529. As cultivares Fanny e Oryzica Llanos 5 também foram utilizadas no experimento como controles da eficiência das inoculações. De cada isolado monospórico, foi utilizado 30 ml de suspensão com $1,8 \times 10^5$ conídios/ml para ser inoculado nas plantas. De cada genótipo e para cada isolado, 20 plantas, com 4 a 5 folhas, acondicionadas em câmara úmida, foram submetidas à inoculação. As plantas permaneceram em câmara úmida por 24 h, à 25 °C, e depois, por 14 dias, em casa-de-vegetação, à 28 °C, até serem avaliadas de acordo com escala descrita por LEVY *et al.* (1993).

Duzentos e cinquenta e seis amostras de plantas, oriundas de 26 municípios gaúchos produtores de arroz, foram submetidas aos procedimentos para o isolamento do fungo. De 319 isolados obtidos, 167 foram utilizados nos procedimentos para caracterização

molecular da população de *P. grisea* do Rio Grande do Sul através de rep-PCR. Identificou-se a existência de polimorfismo entre os perfis de amplificação de DNA obtidos, que foi confirmado através da formação de pelo menos 5 grupos distintos no dendrograma construído (dados não mostrados). Após, selecionou-se, ao acaso, 20 isolados que foram submetidos à análise hierárquica e aos procedimentos de inoculação nas cultivares diferenciadoras e nas linhagens isogênicas (Figura 1 e Tabela 1). Os resultados obtidos indicam a ocorrência de dois grupos, sendo que os isolados de cada um desses grupos apresentaram características moleculares e de virulência bastante homogêneas entre si. Um grupo foi formado pelos isolados 11, 15, 16, 20, 18 e 17, e o outro, pelos isolados 5, 8, 10, 6 e 9. Os demais isolados provavelmente pertencem a, no mínimo, três outros grupos, que, para serem melhor estabelecidos e definidos, será necessário que mais isolados do fungo, já submetidos aos procedimentos de caracterização molecular, tenham sua caracterização fenotípica determinada. Deve-se considerar, também, que, embora as reações dos dois conjuntos de genótipos tenham fornecido informações importantes sobre o espectro de virulência dos isolados, as reações das linhagens isogênicas foi mais esclarecedora do que das cultivares diferenciadoras.

Apesar do número de reações de incompatibilidade das cultivares Dular, Kanto 51 e NP 125, dentre as 20 possíveis, ter sido de 10, 8 e 9, respectivamente, verificou-se que a maioria, em cada uma das cultivares diferenciadoras, foi de compatibilidade. Tal situação demonstra a baixa eficiência dos genes de resistência ocorrentes nesses genótipos para promoverem reações de incompatibilidade aos isolados testados e, possivelmente, à população de *P. grisea* do Rio Grande do Sul. Pela dificuldade de obtenção de sementes, não foi possível submeter as linhagens isogênicas C104 LAC e IR 1529 a inoculações com todos os isolados. A importância desses dois genótipos se deve aos genes de resistência que possuem, *Pi-1(t)* e *Pi-11*, respectivamente, os quais tem sido mencionados como eficientes para promover o controle da brusone causada por isolados do fungo de várias regiões orizícolas do mundo (ZEIGLER *et al.*, 1994; ZEIGLER *et al.*, 1995). Entretanto, nas inoculações feitas nas duas linhagens isogênicas mencionadas acima, a maior parte das reações foi de incompatibilidade. Além disso, na linhagem C101 A51, que possui o gene *Pi-2(t)*, também relatado como muito eficaz para promover reações de incompatibilidade, a proporção de reações de compatibilidade foi baixa. As informações obtidas são úteis para que se possa fazer, nos genótipos gerados pelo PMAI, combinações de genes de resistência que sejam eficientes para promover o controle da doença causada por todos os variantes ocorrentes no Estado. No entanto, deve-se ressaltar que esses variantes devem ser bem caracterizados e identificados, procurando-se, principalmente, associar padrões obtidos com o uso de marcadores moleculares com as reações de linhagens isogênicas a isolados monospóricos. Considera-se, também, importante que a população do fungo seja constantemente avaliada para verificar a possível ocorrência de novos tipos ou variantes. Além disso, o uso de marcadores moleculares no PMAI permitirá que se faça seleção assistida de genótipos que apresentem os genes de resistência realmente associados a um possível controle da doença na cultura do arroz no Rio Grande do Sul.

BIBLIOGRAFIA

- CHEN, D.H.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG, H.; NELSON, R.J. Population structure of *Pyricularia grisea* in two screening sites in Philippines. **Phytopathology**, 85: 1011-1020. 1995.
- CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot spot" breeding site in eastern Colombia. **Plant Disease**, 77: 1029-1035. 1993.
- KACHROO, P.; LEONG, S. A.; CHATHOO, B.B. *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular General Genetics**, 245:39-48. 1994.
- LEVY, M.; ROMAO, J. MARCHETTI, M.A.; HAMER, J.E. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequences resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. **Plant Cell**, 3: 95-102. 1991.
- 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**, 83,1427-1433. 1993.
- OU, S. H. **Rice diseases**. 2nd ed. Commonw. Mycol. Institute, C.A.B., Kew, Surrey, England. p.109-201. 1985.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. W.H. Freeman and Company. 1973
- ZEIGLER, R.S.; CUOC, L.X.; SCOOT, 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**, 85:443-451. 1995.
- ZEIGLER, R.S.; THOME, J.; NELSON, R.; LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F.J. Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. **In Rice blast disease**. Zeigler, R.S., Leong, S.A. e Teng, P.S. eds. Cab International, Manila, 1994.

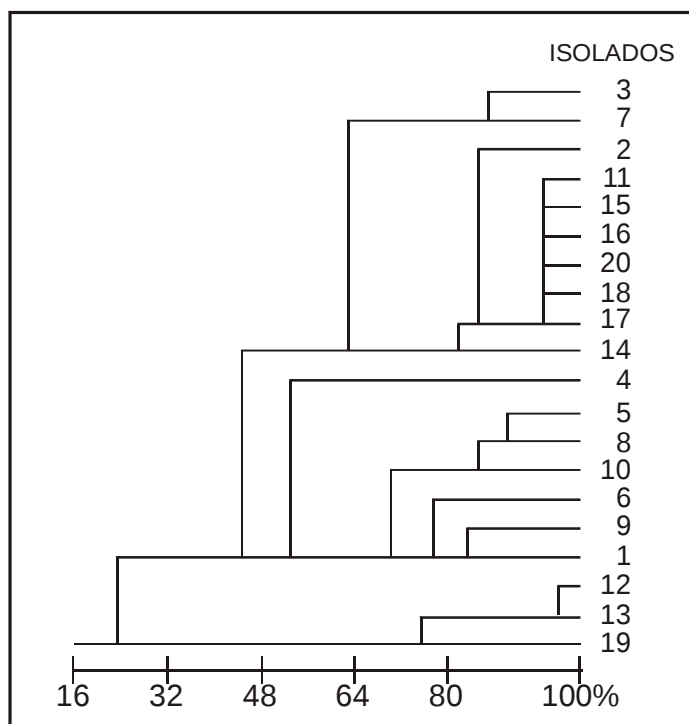


Figura 1 - Dendrograma baseado no perfil de amplificação do DNA de 20 isolados de *Pyricularia grisea* através de rep-PCR utilizando os iniciadores *Pot2*. IRGA/EEA, Cachoeirinha, 2000-2001.

Tabela 1 - Reação à brusone de genótipos de arroz submetidos à inoculação com isolados de *Pyricularia grisea*. IRGA/EEA, Cachoeirinha, 2000-2001.

Genótipos	Genes de resistência	Isolados																			
		3	7	2	11	15	16	20	18	17	14	4	5	8	10	6	9	1	12	13	19
Cultivares																					
Caloro	Pi-k ^s	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dular	Pi-k ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kanto 51	Pi-k	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NP 125		-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Raminad STR 3		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Shao Tiao Tsao	Pi-k ^s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Usen	Pi-a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Zenith	Pi-a, Pi-z, Pi-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linhagens																					
C104 LAC	Pi-1(t)	-		-	-	-	-	-	-		+	-						+	+	+	+
C101 A51	Pi-2(t)	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
C101 PKT	Pi-4 ^a (t)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
C104 PKT	Pi-3(t)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
C105 TTP	Pi-4 ^b (t)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
IR 1529	Pi-11	+		-	-	-	-	-	-	-	-	+						-	+	-	-
Controle																					
Fanny		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oryzica Llanos 5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*, + e – significam reações de compatibilidade e incompatibilidade, respectivamente.