

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À BRUSONE (*Magnaporthe
grisea*) EM CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa*)
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES**

MARILUCI SOUZA DISCONZI
Engenheira Agrônoma /PUC-RS

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do
Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro, 2002

AGRADECIMENTOS

A Deus...

A minha família, especialmente aos meus pais Artêmio e Eni pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Marcelo Gravina de Moraes, pela orientação e amizade.

Ao pesquisador João Maciel pela disponibilidade e colaboração constante durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular e do Laboratório de Fitobacteriologia do Departamento de Fitossanidade.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, tornaram possível a realização deste trabalho.

À Capes, pelo apoio financeiro.

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A BRUSONE (*Magnaporthe grisea*) EM CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa*) UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ^{1/}

Autora: Mariluci Souza Disconzi

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

A brusone, causada por *Magnaporthe grisea*, é a doença mais importante do arroz. Uma vez que, o uso de cultivares resistentes é o método mais efetivo para o controle da doença, a pesquisa visa a identificação de novos genes que confirmam resistência mais durável. O objetivo deste trabalho foi a identificação de cultivares que contenham os genes de resistência *Pi-1*, *Pi-2* e *Pi-11* utilizando marcadores moleculares. RG64, um marcador RFLP baseado em PCR, foi utilizado para verificar a presença do gene *Pi-2* em 250 cultivares de arroz. Trinta e três cultivares apresentaram o mesmo perfil eletroforético da linha-quase-isogênica (NIL) C101A51, que contém o gene *Pi-2*. Verificou-se que 28 cultivares foram resistentes aos isolados inoculados, indicando que RG64 possui alta eficiência para a seleção de cultivares que contêm o gene *Pi-2*. Três marcadores microssatélites (RM) foram utilizados para verificar a presença do gene *Pi-1* em 104 cultivares de arroz. Trinta cultivares, analisadas com RM254, apresentaram o mesmo perfil da NIL C104LAC, que contém o gene *Pi-1*. Verificou-se que 19 cultivares foram resistentes aos isolados inoculados. Três marcadores microssatélites foram utilizados para verificar a presença do gene *Pi-11* em 104 cultivares de arroz. Oito cultivares, analisadas com RM210, apresentaram o mesmo perfil da NIL IR1529, que contém o gene *Pi-11*, mas somente uma foi resistente. Com exceção do RM254, os demais marcadores microssatélites tiveram baixa eficiência de seleção de cultivares com o mesmo perfil das NILs. Estes resultados indicam que o uso de marcadores moleculares pode ser útil para acelerar o processo de lançamento de cultivares com resistência à brusone. No entanto, ainda é preciso aumentar a eficiência de seleção, através de marcadores microssatélites com localização cromossomal mais próxima dos genes *Pi-1* e *Pi-11*. Em um futuro próximo, isto poderá ser possível com a disponibilização de mapas moleculares de maior resolução.

1/ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. (75p.) Fevereiro, 2002.

IDENTIFICATION OF BLAST (*Magnaporthe grisea*) RESISTANCE GENES IN RICE (*Oryza sativa*) CULTIVARS USING MOLECULAR MARKERS ^{1/}

Author: Mariluci Souza Disconzi

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Rice blast, caused by *Magnaporthe grisea*, is the most important disease of the rice crop. The use of resistant cultivars is the most effective method to control the disease, therefore the research aims the identification of new genes that confer a more durable resistance. The purpose of this work was to identify cultivars that contain the *Pi-1*, *Pi-2* and *Pi-11* resistance genes using molecular markers. RG64, a PCR-based RFLP marker, was used to verify the presence of *Pi-2* gene in 250 rice cultivars. Thirty three cultivars have shown the same electrophoretic pattern of the near-isogenic-line (NIL) C101A51, that carries *Pi-2* gene. Twenty eight cultivars were resistant to the blast isolates inoculated, indicating that RG64 has high efficiency to select cultivars carrying the *Pi-2* gene. Three microsatellite markers (RM) were used to verify the presence of *Pi-1* in 104 rice cultivars. Thirty cultivars, analyzed by RM254, showed the same pattern of NIL C104LAC, which carries the *Pi-1* gene. Nineteen cultivars were resistant to the blast isolates inoculated. Three microsatellite markers were used to verify the presence of *Pi-11* in 104 rice cultivars. Eight cultivars, analyzed by RM210, showed the same pattern of NIL IR1529, that carries the *Pi-11* gene, but only one was resistant. With exception of RM254, the use of microsatellite markers has shown low efficiency in the selection of cultivars with the same pattern of the NILs. These results point out that the use of molecular markers may be useful to increase the process of releasing new cultivars that are resistant to rice blast. However, it is necessary to increase the selection efficiency, by using microsatellite markers closely linked to *Pi-1* and *Pi-11* genes. In the near future, it will be possible to increase efficiency with the use of molecular maps with higher resolution.

^{1/} Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (76p.) February, 2002.

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO I - Introdução	01
1.1. Aspectos gerais da cultura do arroz.....	02
1.2. A brusone do arroz.....	03
1.2.1. Agente causal.....	04
1.2.2. Sintomatologia.....	05
1.2.3. Efeitos do ambiente na interação patógeno-hospedeiro...	06
1.2.4. Gama de hospedeiros.....	07
1.2.5. Controle.....	08
1.3. Interação patógeno-hospedeiro.....	09
1.4. Variabilidade genética do patógeno.....	11
1.5. Genes de Resistência.....	13
1.6. Marcadores moleculares.....	15
1.6.1. Vantagens de utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético.....	19
1.6.2. Utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento visando à resistência a doenças.....	21
2. CAPÍTULO II.....	25
Identificação do gene de resistência <i>Pi-2</i> à brusone (<i>Magnaporthe grisea</i>) em cultivares de arroz (<i>Oryza sativa</i>) utilizando um marcador de RFLP baseado em PCR.....	24
2.1. Introdução.....	24
2.2. Materiais e Métodos.....	28
2.2.1. Material genético.....	28
2.2.2. Extração de DNA.....	28
2.2.3. RFLP baseado em PCR.....	29
2.2.4. Teste de virulência.....	30
2.3. Resultados e discussão.....	33
2.3.1. Análise molecular.....	33
2.3.2. Teste de virulência.....	36
3. CAPÍTULO III.....	40
Seleção de marcadores microssatélites para a identificação dos genes de resistência <i>Pi-1</i> e <i>Pi-11</i> à brusone (<i>Magnaporthe grisea</i>) em cultivares de arroz.....	40

	Página
3.1. Introdução.....	40
3.2. Materiais e Métodos.....	43
3.2.1. Material genético.....	43
3.2.2. Extração do DNA.....	43
3.2.3. Análise por amplificação dos microssatélites.....	44
3.2.4. Eletroforese em gel desnaturante.....	44
3.2.5. Coloração com nitrato de prata.....	45
3.2.6. Teste de virulência.....	46
3.3. Resultados e discussão.....	48
3.3.1. Análise molecular e teste de virulência.....	48
3.3.1.1. Gene de resistência <i>Pi-1</i>	48
3.3.1.2. Gene de resistência <i>Pi-11</i>	53
4. CONCLUSÕES.....	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
6. APÊNDICES.....	70

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO II

	Página
1. Genes de resistências encontrados em cultivares de arroz com as respectivas localizações cromossomais e cultivares doadoras.....	27
2. Escala de avaliação de brusone e sua conversão para tipos de reação.....	32
3. Reação à brusone de 33 cultivares e linhas avançadas de arroz, que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C101A51 quando submetidas à inoculação com 6 diferentes isolados de <i>Magnaporthe grisea</i>	39

CAPÍTULO III

1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos marcadores microssatélites.....	45
2. Escala de avaliação de brusone e sua conversão para tipos de reação.....	47
3. Características dos marcadores microssatélites e suas posições cromossomais nos mapas genéticos de consenso e IR64/Azucena.....	49
4. Reação à brusone de 24 cultivares e linhas avançadas de arroz, que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC quando submetidas à inoculação com 10 isolados de <i>Magnaporthe grisea</i>	52
5. Reação à brusone de 5 cultivares e linhas avançadas de arroz, que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 quando submetidas à inoculação com 10 isolados de <i>Magnaporthe grisea</i>	56

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO II

	Página
1. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RG64 do DNA de 12 cultivares de arroz.....	34
2. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RG64 digerido com a enzima de restrição <i>RsaI</i> do DNA de 13 cultivares de arroz.....	34
3. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RG64 digerido com a enzima de restrição <i>HaeIII</i> do DNA de 12 cultivares de arroz.....	35
4. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RG64 digerido com a enzima de restrição <i>TaqI</i> do DNA de 12 cultivares de arroz.....	35

CAPÍTULO III

1. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM254 do DNA de 10 cultivares de arroz.....	48
2. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM206 do DNA de 13 cultivares de arroz.....	50
3. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM473E do DNA de 10 cultivares de arroz.....	51
4. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM210 do DNA de 12 cultivares de arroz.....	53
5. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM223 do DNA de 10 cultivares de arroz.....	55
6. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM556 do DNA de 8 cultivares de arroz.....	55

APÊNDICES

	Página
1. Cultivares e linhas avançadas de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC após amplificação dos marcadores microssatélites RM254, RM206 e RM473E.....	70
2. Cultivares e linhas avançadas de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 após amplificação dos marcadores microssatélites RM210, RM223 e RM556.....	73

1. CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa L.*) é um dos cereais mais cultivados no mundo e constitui-se em uma das principais fontes de alimento da população. No Brasil, cerca de 1,3 milhões de hectares são cultivados anualmente, dos quais 800 mil hectares estão no Estado do Rio Grande do Sul, com uma produtividade média de 5 ton/ha.

Um dos graves obstáculos para a manutenção da produtividade do arroz reside na suscetibilidade à brusone das cultivares atualmente em uso, considerada a doença mais importante da cultura. A brusone é causada pelo fungo *Pyricularia grisea* Sacc., estado anamorfo de *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr. Este fungo ataca as folhas, os nós dos colmos e as diferentes partes da panícula, podendo ocasionar perdas completas na colheita.

O uso de cultivares resistentes é o método mais econômico e efetivo para o controle da doença. A pesquisa visando resistência à brusone busca a identificação de genes de resistência que confirmam resistência mais durável. Entretanto, a resistência das cultivares tem sido perdida devido a diversidade e a instabilidade da virulência do fungo causador da brusone e ao uso extensivo de determinadas cultivares com alta similaridade genética. Por sua vez, os

programas de melhoramento genético do arroz não são bem sucedidos no acompanhamento das frequências gênicas na população do patógeno, pois os métodos de seleção baseiam-se principalmente em características fenotípicas da planta.

Técnicas modernas de biologia molecular poderiam contribuir decisivamente para acelerar o processo de melhoramento de cultivares resistentes à brusone através do uso de marcadores moleculares. A disponibilidade de mapas moleculares de alta resolução no arroz, com marcadores moleculares próximos a genes alvo, e o rápido desenvolvimento de marcadores baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm facilitado o emprego da seleção assistida em programas de melhoramento genético.

Considerando a importância da cultura do arroz para o Rio Grande do Sul e a dificuldade dos programas de melhoramento genético em selecionar cultivares com resistência mais durável, o presente trabalho teve como objetivo a identificação de genes de resistência à brusone em cultivares de arroz utilizando marcadores moleculares.

1.1. Aspectos gerais da cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, especialmente na Ásia, onde se constitui a base alimentar da população. Aproximadamente 150 milhões de hectares são plantados anualmente e a produção atinge aproximadamente 500 milhões de toneladas (Nedel et al., 1998). No Brasil, a cultura do arroz ocupa um papel destacado, tanto do ponto de vista

econômico como social. O arroz é responsável por 18% das calorias e 11% das proteínas da cesta básica do brasileiro que consome, em média, 70 kg/habitante/ano, o que corresponde a 12 milhões de toneladas por ano. Atualmente, os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina são responsáveis por 55% da produção nacional, contribuindo o Rio Grande do Sul com cerca de 46% da produção, apesar de possuir apenas 25% da área cultivada (referência).

Além de constituir-se em uma cultura de grande importância econômica, recentes avanços no conhecimento da genética do arroz vêm ocorrendo, em função do aprimoramento de técnicas de cultura de tecidos, da disponibilidade de mapas moleculares de alta resolução e, principalmente devido ao projeto de seqüenciamento do genoma do arroz. Estes avanços fazem da cultura o modelo mais importante para o estudo de monocotiledôneas e proporcionam informações importantes que podem ser utilizadas por diversos sistemas biológicos.

1.2. A brusone do arroz

Os primeiros registros sobre a ocorrência de brusone datam de 1637 e foram feitos na China (Ou, 1972). Desde então, a brusone tem sido relatada em quase todas as regiões do mundo que cultivam arroz, sendo considerada a doença mais importante da cultura (Ribeiro & Terres, 1987). A brusone afeta diretamente a formação dos grãos diminuindo a produtividade e o rendimento durante o beneficiamento. A intensidade de seus prejuízos é proporcional ao ataque nas folhas e nas panículas, sendo que, quando o ataque nas folhas for muito intenso, ou se as panículas forem atacadas no momento da emissão, pode

ocorrer perdas completas na colheita. Em regiões de clima temperado ou subtropical como no RS, a ocorrência de brusone é tipicamente epidêmica, ocorrendo apenas em alguns anos. Porém, pode causar uma redução de 70 a 80% da produção de algumas lavouras localizadas em áreas mais críticas como no Litoral Norte (responsável por 10% da área cultivada no Estado). No restante da área, os prejuízos são menores (10 a 15%) (Irga, 1997).

1.2.1. Agente causal

O agente causal da brusone é conhecido na fase anamórfica como *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc e na fase teleomórfica como *Magnaporthe grisea* (Herb.) Barr. *M. grisea* é um ascomiceto que produz ascosporos hialinos, fusiformes e septados (três septos) em uma asca unitunicada (Herbert, 1971). O fungo é heterotático com controle bipolar para compatibilidade de cruzamento, possuindo genes adicionais que controlam o ciclo sexual (Webster & Gunnel, 1994). A existência de somente isolados macho-férteis na maioria das regiões orizícolas distantes dos centros de origem do arroz, impede a ocorrência de reprodução sexuada, resultando no predomínio de populações clonais do patógeno (Mekwatanakarn et al., 1999). O conídio geralmente germina a partir da célula apical ou basal, sendo a germinação da célula central pouco freqüente (Ou, 1972). A germinação dos conídios e a formação do apressório são controlados por estímulos ambientais não havendo, por exemplo, emissão do tubo germinativo enquanto os conídios são mantidos em suspensão aquosa, pois provavelmente isto evita a germinação antecipada (Lee & Dean, 1993). O principal estímulo ambiental está ligado a hidrofobicidade da superfície da planta. Segundo Hamer

et al. (1988), à medida que aumenta a cerosidade na superfície sobre as quais os conídios são depositados, mais efetiva é a formação do apressório.

O patógeno atravessa as estações de cultivo como micélio e conídios sobre a palha, sementes e, possivelmente, sobre invasoras hospedeiras. O fungo produz e libera conídios durante períodos de alta umidade relativa. Sob o tecido hospedeiro, o conídio germina e produz um apressório através do qual o fungo penetra através da superfície da planta ou dos estômatos. Após a penetração, sob condições favoráveis, as primeiras lesões são observadas dentro de 4 - 5 dias. Na presença de alta umidade relativa, os conídios são produzidos e liberados poucas horas (em menos de 24h) depois do aparecimento das lesões, sendo a maior produção de conídios entre 3 - 8 dias após o início da esporulação. Plântulas de arroz, hastes e folhas jovens são mais predispostas do que tecidos de plantas mais velhas (Agris, 1998).

1.2.2. Sintomatologia

A brusone causa manchas nas folhas, colmos, panículas e grãos. Nas folhas os sintomas iniciam por pequenas manchas azul-esverdeadas ou castanho-esverdeadas, circundados por um halo amarelo. Após, evoluem para manchas alongadas, com bordos irregulares e de coloração marrom, com centro acinzentado (Bedendo, 1997). Contudo, o tamanho, a forma e a coloração das lesões dependem muito das condições climáticas, da idade da lesão e do grau de suscetibilidade da cultivar (Webster & Gunnel, 1994). Nas bainhas das folhas, principalmente na região da lígula da folha bandeira, é comum o surgimento de lesões circundantes, que pode levar até a queda da folha. Este tipo de sintoma

serve de fonte de inóculo para o ataque na região do “pescoço” e das panículas (Agrios, 1998). Nos colmos, mais precisamente na região dos entre-nós, os sintomas evidenciam-se na forma de manchas elípticas escuras, com centro cinza e bordos avermelhados. As manchas crescem no sentido do comprimento do colmo, podendo atingir grandes proporções (Ribeiro, 1988). Nas panículas, o fungo pode atacar o nó basal, o raque e as ramificações. Caso a infecção ocorrer logo após a emissão da panícula, os grãos não são formados e a panícula permanecerá ereta. Quando a panícula é infectada tardiamente, há um enchimento parcial dos grãos e por causa de seu peso, em alguns casos ocorre a quebra da base da panícula (Agrios, 1998).

1.2.3. Efeitos do ambiente na interação patógeno-hospedeiro

A ocorrência da brusone depende de uma série de fatores que atuam conjuntamente independente da fase de desenvolvimento das plantas e da suscetibilidade das cultivares. O surgimento da doença é favorecido pelo clima e solo, e pela interação de ambos. A temperatura favorável à doença situa-se na faixa compreendida entre 20 a 30°C, sendo a temperatura ótima entre 26 e 28°C. Acima de 32°C, as plantas de arroz são menos predispostas a brusone, enquanto que abaixo de 17°C são mais predispostas, mas o fungo possui menor agressividade. No entanto, quando as plantas são mantidas sob temperaturas amenas e posteriormente inoculadas e mantidas sob temperatura acima de 20°C, a doença torna-se mais severa (Ribeiro & Sperandio, 1998). O patógeno é favorecido pelas condições de umidade relativa do ar acima de 90% durante a noite e período da manhã. Esta condição representa um aumento do período de

molhamento da folha, podendo ser avaliada pela presença de orvalho, neblina ou precipitações freqüentes. (Ou, 1972).

A luz desempenha um papel fundamental na produção e acúmulo de melanina na parede celular do apressório. Isolados mutantes incapazes de produzir melanina não conseguem penetrar a superfície do hospedeiro ao menos que a mesma já apresente ferimentos. De acordo com Howard (1994), a camada de melanina da parede celular do apressório é necessária para sua função normal, isto é, a penetração no hospedeiro.

A severidade de brusone é favorecida pela ocorrência de níveis elevados de matéria orgânica no solo ou pela aplicação excessiva de adubos nitrogenados (50-120 kg de N/ha). Os níveis elevados de fósforo e calcário também favorecem a doença, enquanto que o aumento de potássio tende a diminuir a sua intensidade (Webster & Gunnel, 1994).

1.2.4. Gama de hospedeiros

Além do arroz, *M. grisea* também é encontrado em outras espécies de interesse econômico, entre os quais, *Avena sativa* (aveia), *A. bysantina*, *A. sterilis*, *Hordeum vulgare* L. (cevada), *Lolium multiflorum* (azevém), *L. italicum*, *L. perene*, *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar), *Secale cereale* (centeio), *Sorghum vulgare* (sorgo), *Triticum aestivum* (trigo) e *Zea mays* (milho) (Metha & Baier, 1998). O fungo também infecta espécies não cultivadas, muitas das quais são invasoras de lavouras de arroz como, *Cynodon dactylon* (L.) Pers. *Cyperus rotundus* L., *C. brevifolius* (Rottb.) Hassk., *Panicum repens* L., *Digitaria horizontalis* Wild., *D. ciliares* (Retz.) Koel., *Eleusine indica* (L.) Gaertn., *E.*

corocana L., *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc., *B. mutica* (Forsk.) Stapf, *B. distachya* (L.) Staf., *Cenchrus echinatus* L., *Setaria geniculata* (Lam.) Beauv., *Echinochloa colona* (L.) Link, *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd., *Leersia hexandra* Sw. e *Rottboellia exaltata* L. (Mackill & Bonman, 1986; Urashima & Kato, 1998). Embora existam muitas espécies hospedeiras de *P. grisea*, são raros os casos de infecção cruzada (Borromeo et al., 1993). Entre as espécies cultivadas, Kang et al. (2001) observaram que isolados obtidos de cevada foram virulentos ao arroz, sendo o mesmo observado quando isolados de arroz foram inoculados no trigo. No entanto, isolados provenientes de trigo não são virulentos ao arroz (Metha & Baier, 1998). Com relação às espécies invasoras, nas Filipinas, ocorre infecção cruzada entre isolados de *R. exaltata*, *B. distachya* e arroz, induzindo à especulação que populações do patógeno que infectam estas espécies poderiam ser uma fonte de inóculo para o arroz (Mackill & Bonman, 1986).

1.2.5. Controle

O uso de cultivares resistentes é o método mais efetivo para o controle da doença (Prabhu & Bedendo, 1991). Entretanto, mudanças na composição das raças de *M. grisea* têm resultado em uma rápida “quebra” da resistência. Por esta razão os programas de melhoramento genético buscam aumentar a durabilidade da resistência diversificando a base genética das novas cultivares (Ahn, 1994).

A adoção de um manejo adequado das práticas culturais contribui para o controle da doença. Entre essas medidas destaca-se a semeadura em épocas recomendadas, evitando-se a semeadura tardia que provoca modificações no

ciclo das cultivares, tornando-as mais predispostas à doença, além de coincidir os períodos de emborrachamento e floração com a ocorrência de temperatura e umidade favoráveis à doença. Outras medidas importantes incluem: o controle de ervas daninhas, impedindo que estas atuem como hospedeiros intermediários do fungo ou mesmo tornem o microclima da cultura favorável ao patógeno; e a adubação equilibrada, para evitar o crescimento vegetativo exagerado que favorece a doença (Fomba & Taylor, 1994; Embrapa, 1999).

O controle químico da brusone pode ser realizado através do tratamento das sementes e da pulverização da parte aérea. A aplicação de fungicidas durante os estádios de emborrachamento e floração é um método complementar eficiente no controle da doença, principalmente em áreas com histórico de danos freqüentes e nos anos em que ocorrem condições climáticas favoráveis ao aparecimento da doença (Embrapa, 1999). Entretanto, esse controle é mais eficiente e econômico sempre que for precedido pela melhoria no manejo das práticas culturais e no uso de cultivares mais resistentes à brusone (Epagri, 1998).

1.3. Interação patógeno-hospedeiro

O primeiro modelo de interação patógeno-hospedeiro foi proposto por Flor (1947), como resultado de seus estudos com o patossistema linho x *Melampsora lini*, agente causal da ferrugem do linho. A partir desses resultados, o autor formulou a teoria gene-a-gene, na qual a resistência de determinada cultivar de linho a uma raça do fungo é o resultado da interação dos produtos de um gene de

avirulência dominante (*Avr*) no patógeno e de um gene de resistência correspondente (*R*), também dominante, na planta hospedeira (Agrios, 1998).

O modelo da interação gene-a-gene assume a existência de uma interação do tipo receptor-elicitor, no qual o gene de resistência do hospedeiro codifica uma proteína receptora que reconhece especificamente uma molécula elicitora produzida pelo patógeno (Camargo, 1995). Os genes *Avr* podem codificar proteínas que são reconhecidas diretamente pelo produto do gene *R* correspondente, ou ainda, podem codificar enzimas envolvidas na produção de pequenas moléculas ligantes que servem como fatores de reconhecimento (Orbach et al., 2000), ambas levando à incompatibilidade (ausência de doença). Geralmente essa resposta de defesa ocorre pela ativação da reação de hipersensibilidade (HR), que consiste na morte rápida de um número limitado de células em torno do sítio inicial de infecção. Por outro lado, caso o patógeno não possua um gene de avirulência, este não será reconhecido pela planta hospedeira, resultando em uma interação compatível (presença de doença) (Johal et al., 1995). A eficiência dos genes *R*, conseqüentemente, depende da função que os genes *Avr* exercem em cada caso, sendo influenciada pelo efeito que mutações nos genes *Avr* podem provocar na habilidade do patógeno em sobreviver e competir sob condições de campo (Orbach et al., 2000).

A hipótese de que o patossistema *M. grisea*–arroz representa um sistema gene-a-gene, conforme definido por Flor (1971), foi demonstrada por diversos grupos de pesquisa (Valent & Chumley, 1994; Leung et al., 1988).

M. grisea é um patógeno hemibiotrófico que cresce intracelularmente, ocupando as células da planta individualmente, antes de mover-se para a célula

subseqüente. Não é conhecido se a hifa intracelular é envolvida pela membrana plasmática, como no caso de haustórios produzidos por fungos biotróficos, ou se ocorre um rompimento da membrana. É também desconhecido o modo pelo qual o fungo libera as proteínas AVR no citoplasma das células da planta (Jia et al., 2000). Estudos envolvendo o sistema *M. grisea*-arroz demonstram a existência de genes *Avr* governando a especificidade com o hospedeiro. O cruzamento entre isolados de *M. grisea* virulentos e avirulentos para *Eragrostis curvula* permitiu a identificação do gene *Pwl1*, que governa a patogenicidade para esta espécie (Kang et al., 1995). Membros dessa família gênica também são encontrados em isolados que infectam arroz, como o gene *Pwl2* (Kang et al., 1995). Segundo Valent & Chumley (1994), genes *Avr* específicos para cultivares de arroz são comuns em isolados que infectam outras espécies. Além desses, são conhecidos em *M. grisea* ainda os genes *Avr2-Yamo* e *Avr1-Tsuy* (Sweigard et al., 1993), *Pwl3* e *Pwl4* (Kang et al., 1995), *Avr1-Co39* (Farman & Leong, 1998), *Avr1-Mara* (Mandel et al., 1997), *Avr1-ku86* e *Avr1-MedNoi* (Dioh et al., 2000) e *Pi-ta* (Orbach et al., 2000).

1.4. Variabilidade genética do patógeno

M. grisea se notabiliza por possuir um grande número raças (Ou, 1985), embora se reproduza assexuadamente. Esta variabilidade do fungo é responsável pela chamada “quebra” da resistência das cultivares, que ocorre normalmente poucos anos após seu lançamento, quando passam a ser cultivadas comercialmente (Correa-Victoria & Zeigler, 1993).

O mecanismo pelo qual novas raças do patógeno emergem é um problema de grande interesse da pesquisa. Embora a extensão dos determinantes da instabilidade das raças ainda esteja sendo investigado, parece claro que novas raças surgem no campo quando novas cultivares de arroz resistentes à brusone são introduzidas (Valent & Chumley, 1994).

Entre os mecanismos envolvidos na variabilidade de *M. grisea* estão, a mutação, recombinação sexual e parassexual, deleções de genes *Avr* e inserções de elementos de transposição (transposons e retrotransposons), sendo estes os mais estudados atualmente. Foram identificados em *M. grisea* 7 transposons, incluindo retrotransposons, que se transpõem através de um RNA intermediário e transposons de DNA que se transpõem diretamente por clivagem e inserção (Nishimura et al., 2000; Kang et al., 2001). A diversidade destes elementos pode contribuir para rearranjos no genoma envolvendo genes que controlam a variabilidade deste fungo (Kachroo et al., 1997). O estudo de mutantes espontâneos que sofreram ganho de virulência para cultivares com o gene de resistência *Pi-ta*, revelou que a perda de função do gene *Avr* correspondente foi devido à inserção de um transposon da família *Pot-3*. Isto demonstra que a transposição pode mudar o espectro de virulência em *M. grisea*, podendo ser um importante mecanismo de variabilidade. (Kang et al, 2001).

No que se refere aos resultados obtidos em levantamentos populacionais do patógeno, Ribeiro et al. (1987) ao analisar 127 isolados coletados entre os anos 1979 e 1986 encontrou 36 raças no Estado do Rio Grande do Sul através de testes fenotípicos baseados em reações do patógeno em hospedeiros diferenciais. Porém, notou-se que muitas dessas raças apresentaram reações

semelhantes quando inoculadas nas principais cultivares de arroz semeadas no Rio Grande do Sul (Ribeiro & Sperandio, 1998).

Trabalhos realizados em regiões tropicais, mostraram que o fungo possui uma grande variabilidade de virulência e que as suas raças não são estáveis, mesmo quando são obtidas a partir de uma única lesão (Ribeiro & Sperandio, 1998). Porém nos EUA, obtiveram-se resultados que contestam em parte a importância da variabilidade do patógeno. Segundo esses resultados, em condições de clima temperado como ocorre no sul dos EUA, o fungo não sofre tanta variação como nos trópicos e predominam apenas poucas raças do patógeno. Devido as semelhanças entre as condições do Sul dos EUA com as encontradas no Rio Grande do Sul, pode-se esperar que aqui também poderia ocorrer fenômeno semelhante (Ribeiro & Sperandio, 1998).

1.5. Genes de Resistência

A existência de dois tipos de resistência em plantas, específica e não específica à raça, é bem conhecida. A resistência específica à raça é condicionada por genes de efeito maior, apresenta resistência a uma, ou poucas raças fisiológicas do fungo, e baseia-se na herança mendeliana. A resistência não específica à raça é condicionada por genes de efeito menor, tais como os QTLs (loci de características quantitativas), e confere resistência parcial contra todas as raças do fungo (Notteghem et al., 1994; Camargo, 1995).

Pelo menos 30 loci de resistência à brusone foram identificados em arroz, sendo que destes, 20 são genes de efeito maior, e os 10 restantes são QTLs

(Wang et al., 1994). Os genes de efeito maior foram confirmados serem não-alélicos (Kinoshita, 1991). Dentro deste grupo, diversos loci são conhecidos por possuírem mais de um alelo para resistência. Por exemplo, no locus *Pi-k* existem cinco alelos distintos, e cada locus *Pi-z* e *Pi-ta* possuem dois alelos (Kiyosawa, 1989). A posição cromossômica dos loci para resistência, determinada por marcadores moleculares, demonstrou que os loci ocorrem em grupos localizados em diversas regiões do genoma do arroz. Oito loci foram identificados no cromossomo 11, incluindo o locus *Pi-k* e um QTL. Quatro genes de resistência à brusone encontram-se no cromossomo 6, sendo que destes, *Pi-z* e *Pi-2* podem ser alélicos (Inukai et al., 1992). Do mesmo modo, possivelmente 4 genes encontram-se em uma mesma região do cromossomo 12, incluindo o gene *Pi-ta*, que pode ser um alelo de *Pi-4* (Ise, 1993).

Análises genéticas da resistência à brusone indicam que muitas cultivares possuem múltiplos genes para resistência. Em 51 combinações de cultivar/isolado examinadas em um estudo no International Rice Research Institute (IRRI), verificou-se que em 30 casos, a resistência foi condicionada por 2 genes dominantes, em 15 casos por um gene dominante, e em 6 casos por genes recessivos. (Yu et al., 1987). A avaliação fenotípica de linhas-quase-isogênicas (NILs) indicou que 4 genes de resistência foram identificados na cultivar Tetep, 3 na cultivar Pai-Kan-Tao, e 2 na cultivar LAC23. A complexidade da base genética da resistência à brusone nestas e em outras cultivares, tem tornado difícil a identificação e a análise de genes individuais quando utilizam-se técnicas convencionais (Mackill & Bonman, 1992).

1.6. Marcadores moleculares

Mapas genéticos foram construídos com base em marcadores morfológicos e isoenzimáticos para espécies importantes como o arroz, milho, trigo, tomate e cevada (Mohan et al., 1997). Estes foram úteis para a transferência de poucos genes com grande efeito no fenótipo, entretanto, tiveram impacto relativamente menor devido ao pouco polimorfismo apresentado. Atualmente, estão disponíveis tecnologias que permitem mapear diretamente o polimorfismo do DNA podendo utilizá-las para o desenvolvimento de novos genótipos em programas de melhoramento genético (Federizzi, 1998).

Com o avanço da biologia molecular, técnicas baseadas em marcadores moleculares tem sido desenvolvidas. As principais técnicas são: polimorfismo baseado no tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), e amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) como as técnicas de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), RFLP baseado em PCR e amplificação de microssatélites. No RFLP, o polimorfismo observado ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita de DNA (Grant & Shoemaker, 1998). A presença ou ausência de seqüências específicas entre 4 e 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas por enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismos. Diferenças nas seqüências de DNA dos indivíduos pode também ser resultado de inserções, deleções ou outros rearranjos (ex: translocações, inversões) que alterem a distância entre sítios de restrição (Grant & Shoemaker,

1998). As diferenças são detectadas pela hibridização de um fragmento (sonda) com o DNA genômico digerido com enzimas de restrição. A similaridade entre a seqüência de nucleotídeos da sonda e a seqüência complementar de nucleotídeos de um fragmento revela o polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O RAPD, desenvolvido por Williams et al. (1990), assim como as técnicas baseadas em RFLP, permitem gerar uma grande quantidade de polimorfismos de segmentos de DNA distribuídos por todo o genoma do organismo. A diferença metodológica entre ambas é que os marcadores RFLP se baseiam na hibridização de DNA, já o RAPD se baseia na amplificação de DNA. Além disso, a técnica RAPD não requer o desenvolvimento prévio de sondas específicas para o organismo de interesse. A grande vantagem do RAPD é a utilização de um conjunto único de oligonucleotídeos iniciadores arbitrários para qualquer organismo (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Comparado ao RFLP, a técnica de RAPD, por se basear na PCR, é muito mais sensível na detecção de polimorfismo em nível de DNA. A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação por locus (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O AFLP tem sido bastante utilizado para caracterização molecular, mapeamento genético e construção de mapas genéticos. A análise de AFLP consiste de 4 etapas. Na primeira etapa, o DNA genômico do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição. Na segunda etapa, adaptadores de DNA específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente, através de PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores

especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores. Na quarta e última etapa, a sub-população de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução. De forma análoga aos marcadores RAPD, a principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por locus (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Com a crescente facilidade no seqüenciamento de fragmentos de DNA, uma alternativa é a conversão de RFLP em marcadores baseados em PCR. Para isso, as extremidades das sondas utilizadas para a detecção de RFLP (genômicas ou de cDNAs) são seqüenciadas e, com esta informação, são construídos pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar os fragmentos polimórficos (Saiki et al., 1988). Uma desvantagem da conversão de marcadores RFLP para PCR é a redução do polimorfismo genético. Neste processo, o polimorfismo em cada locus convertido passa a depender, em um primeiro momento, de variações no comprimento do fragmento amplificado, ou seja, exclusivamente de eventos de inserção/deleção na região coberta pela PCR (Ghareyazie et al., 1995). Uma das formas de verificar polimorfismos adicionais é através da clivagem dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição. Busca-se desta forma, identificar perdas ou ganhos de sítios de restrição gerados por mutações de ponto (Williams et al., 1991).

Mais recentemente, um novo tipo de marcador que detecta um polimorfismo maior que os anteriores foi descrito. Microsatélites ou seqüências simples repetidas (SSR), consistem de pequenas seqüências entre 1 a 4 nucleotídeos, repetidas consecutivamente. Em genomas de eucariotos estas seqüências simples são mais freqüentes, distribuídas ao acaso e formam loci

genéticos mais polimórficos (Beckmann & Soller, 1990). Regiões contendo seqüências simples repetidas são amplificadas individualmente através da PCR utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos complementares às seqüências que flanqueiam o microsatélite (Wu & Tanksley, 1993). A detecção de microsatélites é através de eletroforese em gel de poliacrilamida de alta resolução, uma vez que é necessário uma separação adequada de segmentos que diferem por poucos pares de bases. Microsatélites apresentam estabilidade, possuem expressão co-dominante e são multialélicos. (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Condit & Hubbell (1991), documentaram a presença de microsatélites em plantas pela primeira vez. Em uma busca em bancos de dados de seqüências de DNA publicadas observou-se que os microsatélites são distribuídos com uma freqüência de um a cada 50.000 pares de bases (pb). Sua presença foi constatada em 34 espécies vegetais, sendo que o elemento repetitivo mais comum foi o di-nucleotídeo AT (Morgante & Olivieri, 1993). A presença de microsatélites em arroz foi relatada por Zhao & Kochert (1992). Os microsatélites $(GA)_n$ e $(GT)_n$ são os mais comumente encontrados no genoma do arroz. Uma busca em uma biblioteca genômica de arroz indicou que a freqüência repetida destes microsatélites foi estimada ser em média um microsatélite a cada 225.000pb-380.000pb, e o número total destas repetições foi aproximadamente 3.000. O grau de polimorfismo destes marcadores é significativamente maior que os marcadores RFLP (Wu & Tanksley, 1993).

Até o presente, foram descritos 512 marcadores microsatélites no genoma do arroz (Temnykh et al., 2000; Temnykh et al., 2001). Neste último trabalho,

foram analisados 57,8 milhões de pares de bases de seqüências de DNA de arroz, previamente publicadas, para determinar a freqüência e a distribuição de distintos microssatélites. Microssatélites foram categorizados dentro de dois grupos baseados no comprimento do fragmento repetitivo. A classe I, consiste de microssatélites com mais de ≥ 20 pb, e a classe II, de microssatélites entre 12pb e 20pb. Repetições ricas em trinucleotídeos (GCC ou GGC) foram mais abundantes em porções codificantes de proteínas, enquanto repetições ricas em trinucleotídeos (ATT ou AAT) não mostraram nenhuma preferência. Repetições com di e tetranucleotídeos foram mais freqüentemente encontradas em regiões não codificantes, principalmente intergênicas, do genoma do arroz (Temnykh et al., 2001).

1.6.1. Vantagens da utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético

O desenvolvimento de cultivares resistentes à brusone tem sido o principal objetivo dos programas de melhoramento genético do arroz no RS. O método empregado para a avaliação da doença, tanto em cultivares utilizadas como fontes de resistência quanto em linhas segregantes, é o uso de viveiros de infecção, conduzidos em um único local, e onde as plantas são submetidas a condições epidêmicas severas (Ou, 1965). O uso exclusivo deste método é limitante, pois não permite a detecção de fatores de resistência parcial (baseados em múltiplos genes de efeito menor) que intervêm na taxa de progresso da doença. Além disso, não é capaz de captar a diversidade existente na população do patógeno, proporcionando o fenômeno do “escape” (Buddenhagen, 1983).

O enfoque das pesquisas para aumentar a durabilidade da resistência das cultivares de arroz está direcionado para o melhor manuseio dos genes específicos à raça, e, ao mesmo tempo, evitar a erosão da resistência parcial no processo seletivo de melhoramento (Prabhu & Ferreira, 1991).

Embora a combinação de genes de efeito maior e menor, conferindo resistência completa e parcial, respectivamente, seja desejável ao melhoramento do arroz, isto é difícil de ser alcançado devido a dois problemas. Primeiro, não há certeza de qual constituição genética resulta em resistência durável. Segundo, o método utilizado por programas de melhoramento convencional não permite selecionar para a presença de múltiplos genes, ou para uma combinação específica de genes, devido à interação epistática entre os mesmos. De acordo com McCouch et al. (1994), os marcadores moleculares oferecem uma oportunidade para a superação destes problemas.

Existem várias situações em que marcadores moleculares podem substituir avaliações de doenças através do fenótipo (Melchinger, 1990). Algumas avaliações de doenças são difíceis de serem conduzidas devido à interação genótipo-ambiente, variabilidade na agressividade ou disponibilidade do patógeno, ou ainda devido à sensibilidade da reação da doença às condições do ambiente. Alguns tipos de avaliações são muito demoradas ou somente podem ser conduzidos em locais específicos, certas épocas do ano, ou em determinados estádios de desenvolvimento da planta. Os marcadores podem permitir a seleção de indivíduos resistentes no estágio de semente de modo independente das condições ambientais (Michelmore, 1995). Os marcadores podem auxiliar também na combinação de genes de resistência a patógenos para os quais as avaliações

da doença são mutuamente incompatíveis. Estes permitem que múltiplos genes que são efetivos contra todas as raças conhecidas de um único patógeno sejam combinados. Uma vez que alguns dos genes de resistência já foram clonados, eles poderão ser úteis como um marcador genético para a resistência. Assim que os genes de resistência forem seqüenciados, será possível desenhar marcadores baseados em PCR específico para cada alelo usando oligonucleotídeos iniciadores que anelam nas regiões com seqüências divergentes. Nenhuma recombinação será possível entre tais marcadores e o gene de resistência (Michelmore, 1995).

A seleção assistida por marcadores possui considerável potencial para transferência de QTLs ligados à resistência a doenças. Também permite a seleção de indivíduos portadores de alelos favoráveis dos progenitores e evita a inclusão de indivíduos que são homozigotos para alelos desfavoráveis. Marcadores para importantes QTLs de resistência estão sendo desenvolvidos, e isto permitirá a seleção de genótipos complexos contendo determinados loci, determinando ambos tipos de resistência, qualitativa e quantitativa (Michelmore, 1995).

1.6.2. Utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento visando à resistência a doenças

Diversos trabalhos indicam a aplicação dos marcadores moleculares ligados a genes de resistência com o objetivo de facilitar a seleção de genótipos em programas de melhoramento, através da seleção assistida. Brahm et al. (2000), identificaram 2 marcadores, de RAPD e AFLP, ligados ao gene *PI2* que

confere resistência do girassol à *Plasmopara halstedii*, agente causal do míldio. Um marcador microssatélite e 2 marcadores RFLP proximamente ligados ao gene *Rsv1*, que confere resistência ao vírus do mosaico da soja (VMS), foram identificados por Yu et al. (1996). Em trigo, um marcador RAPD e um microssatélite ligado ao gene *Yr15*, que confere resistência à ferrugem, foram identificados por Chague et al. (1999). Marcadores RAPD foram relatados para as culturas do arroz e do feijoeiro. Em arroz, verificou-se uma ligação próxima do marcador com o gene *Pi-10*, que confere resistência à brusone (Naqvi & Chattoo, 1996); e no feijoeiro, foram observados 3 marcadores ligados aos genes *Ur-4*, *Ur-5* e *Ur-3*, que conferem resistência à ferrugem (Faleiro et al., 2000). Em arroz, 5 marcadores microssatélites (RM21, RM142, RM164, RM254 e RM210) estão localizados próximos aos genes *Pi-7*, *Pi-5*, *Pi-10*, *Pi-1* e *Pi-11*, respectivamente, que conferem resistência à brusone (Akagi et al., 1996). Arruda et al. (2000), identificaram marcadores RAPD ligados ao gene *Co-4*, gene de resistência a *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão. Este gene está presente na cultivar To, uma das 12 diferenciais utilizadas na identificação das raças do fungo em feijão. Esta cultivar é resistente a 22 dos 25 isolados de *C. lindemuthianum* identificados no Brasil. A resistência conferida pelo gene *Co-4* tem se mostrado efetiva contra um grande número de isolados da América Latina e é uma importante fonte de resistência utilizado por diversos programas de melhoramento. Um marcador de RAPD ligado ao gene de resistência *Co-4* está sendo utilizado para o desenvolvimento de cultivares resistentes e para a piramidização de genes em cultivares comerciais de feijão. O marcador microssatélite RM262 em arroz, que está proximamente ligado ao gene de resistência à brusone *Pi-d* foi utilizado para

identificação de cultivares contendo este gene em uma população segregante F2. Os resultados indicaram uma eficiência de mais de 98% na identificação de cultivares resistentes, podendo este marcador ser utilizado na seleção assistida e no melhoramento de novas cultivares com resistência à brusone (Li et al., 2000). RG64, um marcador RFLP baseado em PCR, que está ligado ao gene *Pi-2* (2,8cM) em arroz também foi utilizado na identificação de cultivares que contêm este gene em uma população segregante F2. A eficiência de identificação de indivíduos homozigotos resistentes foi de 96% (Hittalmani et al., 1994).

Após a identificação de marcadores moleculares eficientes para a seleção de genes de resistência em genótipos resistentes, a piramidização de genes pode ser utilizada como estratégia para assegurar uma resistência durável contra o aparecimento de novas raças do patógeno. Esta estratégia baseia-se na combinação de genes de resistência, que excluam toda possível compatibilidade com linhagens genéticas do fungo, e é denominada de “hipótese da exclusão de linhagens” (Zeigler et al., 1994). Três genes de resistência à brusone, *Pi-1*, *Pi-2* e *Pi-4*, foram piramidizados utilizando marcadores RFLP e RFLP baseado em PCR (Hittalmani et al., 2000). As cultivares portadoras de combinações de 2 e 3 genes que foram testadas para a resistência à brusone nas Filipinas e Índia indicaram que combinações incluindo o gene *Pi-2* têm aumentado a resistência quando este encontra-se sozinho. Os genes de linhas piramidizadas estão sendo atualmente introgrididos em cultivares de arroz com características agrônômicas superiores através da seleção assistida por marcadores moleculares (Hittalmani et al., 2000).

2. CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA *Pi-2* À BRUSONE (*Magnaporthe grisea*) EM CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa*) UTILIZANDO UM MARCADOR DE RFLP BASEADO EM PCR

2.1. INTRODUÇÃO

A brusone, causada pelo fungo *M. grisea* (Herbert) Barr. é a doença mais destrutiva da cultura do arroz, podendo ser encontrada em todos os sistemas de cultivo (Ou, 1985). A incorporação de resistência em cultivares comerciais é o método mais econômico e efetivo para o controle da doença (Prabhu & Bedendo, 1991). No entanto, a resistência das cultivares tem sido rapidamente perdida devido à diversidade e à instabilidade da virulência do fungo causador da brusone (Ou, 1980; Correa-Victoria & Zeigler, 1993). Métodos inadequados para a seleção de cultivares resistentes (Chen et al., 1995) e o uso extensivo de determinadas cultivares com alta similaridade genética, contribuem para a curta durabilidade da resistência observada a campo (Zhu et al., 2000).

A maior necessidade da pesquisa em brusone do arroz é a identificação de novos genes que confirmam resistência durável e a incorporação dos mesmos em

cultivares em uso. Quinze genes de resistência específica a determinadas raças de *M. grisea* foram identificados no arroz (Tabela 1).

Um grupo de linhas-quase-isogênicas (NILs) em que os genes de resistência à brusone são conhecidos foi desenvolvido por Mackill & Bonman (1992). A resistência à brusone foi conferida por genes dominantes e independentes nas NILs C104LAC (*Pi-1*), C101A51 (*Pi-2*), C104PKT (*Pi-3*), C101PKT (*Pi-4^a*), C105TTP-4 (*Pi-4^b*) e IR1529 (*Pi-11*).

Estudos conduzidos por Inukai et al. (1994) e Zeigler et al. (1995), determinaram que o gene de resistência *Pi-2* conferiu resistência a determinados isolados de *M. grisea*. A NIL C101A51 foi suscetível somente a isolados de uma única linhagem, em um estudo conduzido com 234 isolados, representativos de 6 linhagens provenientes das Filipinas. Segundo Maciel et al. (2001), as cultivares contendo este gene também foram resistentes contra todos os isolados de *M. grisea* identificados no Rio Grande do Sul até o momento.

RG64, um marcador de RFLP baseado em PCR, que está localizado a uma distância genética de 2,8 cM do gene *Pi-2* no mapa IR64/Azucena (Akagi et al., 1996) e a 0 cM no mapa de consenso (Akagi et al., 1996), foi utilizado na identificação do gene em uma população segregante F₂. A eficiência de identificação de cultivares homozigotas resistentes foi de 96%, mostrando que RG64 é eficiente para identificação deste gene (Hittalmani et al., 1994).

A técnica de RFLP baseada em PCR é um método eficiente e apresenta vantagens para análise de um grande número de amostras, sendo uma alternativa aos marcadores RFLP (Williams et al., 1990; Hittalmani et al., 1994). Esta técnica é rápida, de fácil execução e requer pouca quantidade de DNA

(100ng). O RFLP baseado em PCR, assim como o RFLP, também permite a detecção direta de inserções/deleções e eventos de mutações pontuais permitindo análise detalhada da variação em nível de DNA. A maior limitação do RFLP baseado em PCR é a necessidade de informação preliminar de seqüências para sintetizar os oligonucleotídeos iniciadores (Ghareyazie et al., 1995).

Baseados nas informações disponíveis em relação à importância do gene de resistência *Pi-2* e da disponibilidade de um marcador eficiente para identificá-lo, o objetivo do presente estudo foi a utilização do marcador RG64 para verificar a presença do gene de resistência *Pi-2* em cultivares de arroz do banco de germoplasma do programa de melhoramento genético do Instituto Rio-grandense do Arroz (IRGA).

Tabela 1. Genes de resistências encontrados em cultivares de arroz com as respectivas localizações cromossômicas e cultivares doadoras.

Genes de resistência	Cultivar doadora	Cromossomo	Referências
<i>Pi-1</i>	LAC23	11	Inukai et al., 1994
<i>Pi-2</i>	5173	6	Inukai et al., 1994
<i>Pi-3</i>	Pai-Kan-Tao	6	Inukai et al., 1994
<i>Pi-4</i>	Tetep	12	Inukai et al., 1994
<i>Pi-5</i>	Moroberekan	4	Wang et al., 1994
<i>Pi-6</i>	Apura	12	Causse et al., 1994
<i>Pi-7</i>	Moroberekan	11	Wang et al., 1994
<i>Pi-8</i>	Kasalath	6	Causse et al., 1994
<i>Pi-9</i>	<i>Oryza minuta</i>	6	Causse et al., 1994
<i>Pi-10</i>	Tongil	5	Naqvi et al., 1995
<i>Pi-11</i>	Zaiyeqing	8	Causse et al., 1994
<i>Pi-12</i>	Moroberekan	-	Inukai et al., 1996
<i>Pi-13</i>	Mauwangu	6	Pan et al., 1996a
<i>Pi-14</i>	Mauwangu	2	Pan et al., 1996a
<i>Pi-15</i>	GA25	-	Pan et al., 1996b

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Material genético

Foram selecionadas 250 cultivares de arroz, incluindo linhas avançadas, pertencentes ao banco de germoplasma do IRGA e que apresentam resposta diferencial a *M. grisea* nos viveiros de infecção conduzidos no município de Torres, RS na safra 1999/2000 (Maciel, dados não publicados).

2.2.2. Extração do DNA

Para a extração do DNA, 50 sementes de cada cultivar foram colocadas para germinar em caixas do tipo Gerbox e incubadas a 28°C sob um fotoperíodo de 12h de luz. Após 7 dias, coleótilos e radículas das plântulas foram coletadas para extração do DNA utilizando o método “Plant DNAzol” (Gibco, BRL). O tecido obtido, foi moído na presença de nitrogênio líquido, transferido (100ng) para um tubo de microcentrífuga e ressuspendido em 300µL de “Plant DNAzol”, sendo agitado vigorosamente durante 5min. Após, foi acrescentado 300µl de clorofórmio, agitando-se novamente por 5min, seguido de centrifugação a 10.000g durante 10min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga ao qual foi adicionado 225µl de etanol absoluto. As amostras foram agitadas levemente, incubadas em temperatura ambiente por 5min e centrifugadas a 4.000g durante 4min, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi adicionado 300µl de solução de lavagem (171µl de “Plant DNAzol” + 129µl de etanol absoluto) ao material precipitado, agitando-se levemente o tubo de microcentrífuga. As amostras foram incubadas em

temperatura ambiente durante 5min, seguidas de nova centrifugação a 4.000g durante 4min, em temperatura ambiente. Uma segunda lavagem foi feita adicionando-se 300µl de etanol 70% a cada tubo de microcentrífuga e centrifugada conforme etapa anterior. Foi adicionado 70µl de água ultra pura ao material precipitado. A concentração das amostras foi determinada com um espectrofotômetro (Beckman DU 65) e armazenadas a -20°C.

2.2.3. RFLP baseado em PCR

O DNA genômico das cultivares foi submetido à amplificação por RFLP baseado em PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores RG64-F (5'-TGGGATGATGCCCAAAG-3') e RG64-R (5'-GTACGGCAAGGGCTAGGAG-3') desenvolvidos a partir do conhecimento da seqüência do clone RG64.

As reações foram realizadas em volume final de 25µl contendo 100ng de DNA, 10mM Tris-HCl (pH 9,2); 25mM KCl; 0,1mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5mM de MgCl₂; 0,56mM de oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq DNA polimerase (Gibco/BRL). As amplificações foram realizadas em um termociclador PTC-100TM. As condições da PCR foram 94°C (5min), seguido de 35 ciclos de 94°C (1min), 60°C (1min) e 72°C (2min), e uma etapa de extensão final a 72°C (5min). Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo tampão TBE (90mM Tris, pH 8,3; 90mM de ácido bórico; 2mM de solução de EDTA). O marcador utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi "1kb Plus Ladder" e o gel foi submetido a coloração com brometo de etídio (0,5µg.mL⁻¹) por 15 minutos, para a

visualização do produto amplificado, e foi fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak).

Foram utilizadas três enzimas de restrição, *Rsal*, *HaeIII* e *TaqI* (Gibco/BRL), para a análise do RFLP baseado em PCR. Segundo Ghareyazie et al. (1995), estas são enzimas que produzem um maior polimorfismo para o clone RG64. As reações foram realizadas em volume final de 20 μ l contendo 10 μ l da reação de PCR, sendo que, a digestão feita com a enzima *Rsal* utilizou-se 3,5U desta enzima, em um tampão contendo 10mM de Tris-acetato (pH 7,5); 10mM de acetato de magnésio e 5mM de acetato de potássio; com a enzima *HaeIII* utilizou-se 2,5U; em um tampão contendo 50mM de Tris-HCL (pH 8,0); 10mM de MgCl₂; 50mM de NaCl e com a enzima *TaqI* utilizou-se 2,5U; em um tampão contendo 10mM de Tris-acetato (pH 7,5); 10mM de acetato de magnésio e 5mM de acetato de potássio. As reações foram incubadas durante 1h a 37°C (*Rsal* e *HaeIII*) ou 65°C (*TaqI*). Os produtos das digestões foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (*HaeIII*) ou 2% (*Rsal* e *TaqI*).

2.2.4. Teste de virulência

Foram inoculados 6 diferentes isolados de *M. grisea*, representativos das linhagens do patógeno que ocorrem no Rio Grande do Sul (Maciel et al., 2001) em cultivares e linhas avançadas do programa de melhoramento genético do IRGA.

Para a produção de inóculo, os isolados foram repicados para placas de Petri com meio de farinha de arroz e crescidos por 12-14 dias a 28°C sob 12h de luz. Após esse período, o micélio superficial foi removido com auxílio de um pincel

e as colônias lavadas com água destilada. As placas foram cobertas com um filme plástico transparente perfurado e mantidas nas mesmas condições por 4-6 dias a fim de estimular a esporulação.

A semeadura foi realizada em vasos plásticos (D=8cm) a fim de obter-se 10 plantas por vaso. As plantas receberam aplicação de nitrogênio na forma amídica, aplicada em três doses iguais: 1) na semeadura; 2) uma semana após; 3) um dia antes da inoculação, em quantidades equivalentes a 150kg de N por ha.

A inoculação foi realizada quando as plantas atingiram o estágio de 3-4 folhas (± 21 dias) com uma suspensão de $1,8 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹. Utilizaram-se 20mL dessa suspensão em cada repetição, sendo feitas 2 repetições para cada cultivar. As plantas foram então incubadas em caixas plásticas sob alta umidade e mantidas em câmara de crescimento sob um fotoperíodo de 12h de luz a 26°C. As reações das cultivares aos isolados foram avaliadas 14 dias após a inoculação, utilizando-se a escala diagramática com notas de 0-5 descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Escala de avaliação de brusone e sua conversão para tipos de reação.

Nota	Sintomatologia	Reação
0	Sem sintomas	Resistente
1	Pequenas lesões marrons, com tamanho de 0,5mm de diâmetro	Resistente
2	Pequenas lesões de cor marrom, entre 0,5-1mm de diâmetro, necróticas, sem centro esporulativo	Resistente
3	Pequenas lesões arredondadas entre 1-3mm de diâmetro, com centro cinzento, borda marrom	Suscetível
4	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone de 3mm, com centro cinzento e com pouca ou nenhuma lesão coalescente	Suscetível
5	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone de 3mm, com centro cinzento e com uma ou mais folhas mortas pela coalescência das lesões	Suscetível

Fonte: Mackill & Bonman, 1992.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Análise molecular

A análise molecular da amplificação de RG64, de 250 cultivares e linhas avançadas de arroz, apresenta 3 perfis eletroforéticos (Figura 1). Quarenta e oito cultivares possuem o mesmo perfil eletroforético da NIL C101A51(1.557pb), sugerindo a presença do mesmo alelo deste gene nestas cultivares.

O DNA amplificado de RG64, de 48 cultivares de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C101A51, foi digerido com enzimas de restrição para verificar polimorfismos que não são detectados durante a amplificação. Nesta categoria estão incluídos substituições de nucleotídeos (alteração do sítio de reconhecimento das enzimas de restrição), e pequenas adições/deleções que não são visualizadas através da eletroforese do fragmento amplificado (Ghareyazie et al., 1995).

O produto da PCR de RG64 digerido com as enzimas de restrição (*RsaI*, *HaeIII* e *TaqI*) apresenta perfis adicionais quando comparadas com o RFLP baseado em PCR antes da digestão. A análise do DNA amplificado de RG64 das 48 cultivares de arroz, digerido com a enzima *RsaI*, indica que somente em 15 cultivares não ocorre o mesmo perfil eletroforético da NIL C101A51 (Figura 2). A digestão com as enzimas *HaeIII* e *TaqI*, revelam o mesmo agrupamento obtido com a enzima *RsaI* (Figuras 3 e 4). Hittalmani et al. (1994), utilizaram 16 enzimas de restrição para verificar polimorfismos entre a cultivar CO39 suscetível à brusone e a NIL C101A51. A enzima *HaeIII* produziu polimorfismo que permitiu

diferenciar cultivares que contém o gene *Pi-2* em uma população segregante derivada do cruzamento destas 2 cultivares.

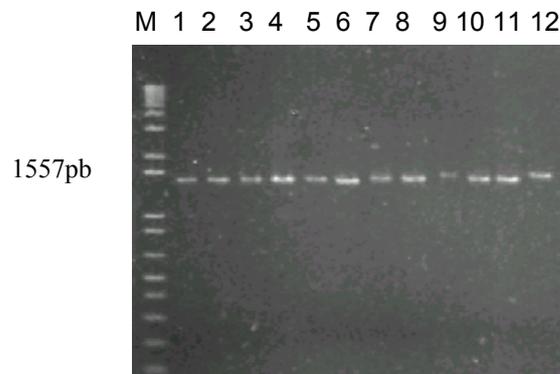


Figura 1. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RG64 do DNA de 12 cultivares de arroz. 1- NIL C101A51; 2- Irga 1832-5-5C-MF-2-2; 3- Irga 1598-3-2F-1-2-1; 4- Irga 420; 5- Irga 417; 6- Jefferson; 7- IR 56450-4-2-2; 8- CT9737-5-2-1-2-4P; 9- Epagri 109; 10- CT 12249-3-4-5-1P-1P; 11- Icta Quirigua; 12- Perla. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. O marcador de peso molecular utilizado foi 1kb plus.

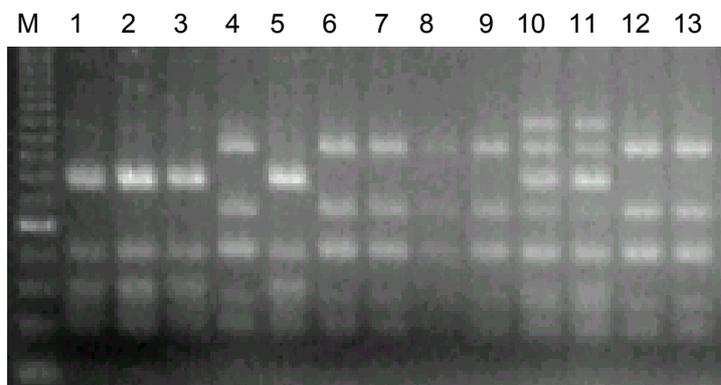


Figura 2. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RG64 digerido com a enzima de restrição *RsaI* do DNA de 13 cultivares de arroz. 1- NIL C101A51; 2- Irga 1598-3-2F-1-2-1; 3- Irga 1832-5-5C-MF-2-2; 4- Jefferson; 5- Irga 417; 6- Epagri 109; 7- IR65261-09-1-B; 8- Sisa 29/84; 9- AY 204; 10- Doble Carolina; 11- El Pazo 227; 12- Quilla 64117; 13- CT 6742-10-10-1-M-M-M. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%. O marcador de peso molecular utilizado foi 50pb.

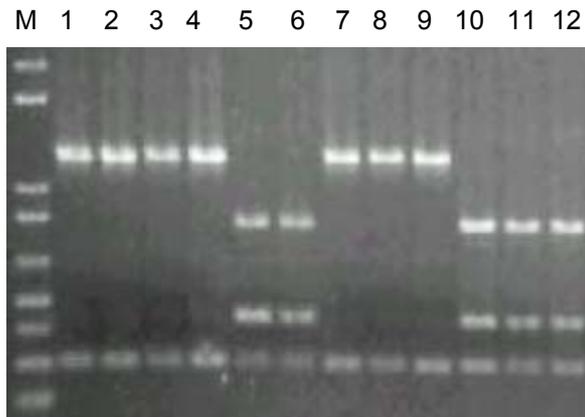


Figura 3. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RG64 digerido com a enzima de restrição *HaeIII* do DNA de 12 cultivares de arroz. 1- C101A51; 2- Irga 1598-3-2F-1-2-1; 3- Irga 1832-5-5C-MF-2-2; 4- IR 56450-4-2-2; 5- Perla; 6- CT 11626-14-4-1-2-M-M; 7- CT 12249-3-4-5-1P-1P; 8- Irga 975-2-1-3-1-1; 9- IR 36; 10- Epagri 109; 11- Sisa 29/84; 12- AY 204. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. O marcador de peso molecular utilizado foi 1kb plus.

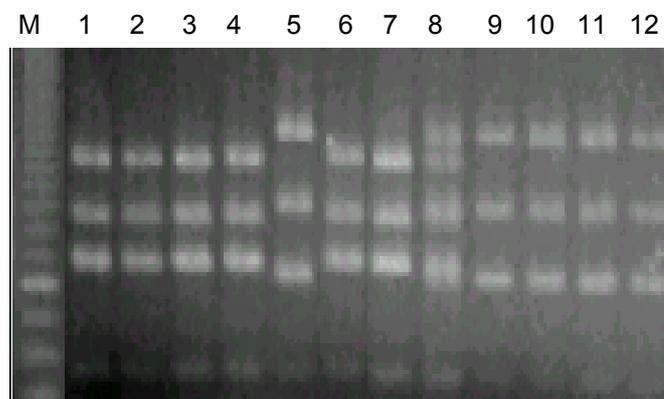


Figura 4. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RG64 digerido com a enzima de restrição *TaqI* do DNA de 12 cultivares de arroz. 1- C101A51; 2- Irga 1832-5-5C-MF-2-2; 3- Irga 959-1-2-2F-5-1-2-B-4-CA-4; 4- Irga 1567-14-2-3-1; 5- Quilla 64117; 6- Icta Quirigua; 7- Amistad 82; 8- Doble Carolina; 9- Jefferson; 10- Perla; 11- Agulha Precoce; 12- CT 11626-14-4-1-2-M-M. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%. O marcador de peso molecular utilizado foi 50pb.

2.3.2. Teste de virulência

Foram submetidas à inoculação com isolados de *M. grisea* as cultivares que apresentaram o mesmo perfil eletroforético da NIL C101A51 após a digestão com as 3 enzimas de restrição acima citadas.

O teste de virulência indica que das 33 cultivares inoculadas, 28 são resistentes a maioria dos isolados e, apenas 5 cultivares são consideradas suscetíveis (Tabela 3). Verifica-se que o agrupamento molecular realizado com o marcador RG64 é eficiente para identificar cultivares que possivelmente contém o gene de resistência *Pi-2*, já que a maioria (84,84%) das cultivares agrupadas é resistente de acordo com o teste de virulência.

Maciel et al. (2001), conduziu ensaios no IRGA para verificar a virulência de 60 isolados de *M. grisea* na NIL C101A51. Este verificou, após os testes de inoculação, que nenhum isolado foi capaz de causar doença na NIL C101A51, mostrando a importância do gene *Pi-2* para o melhoramento genético de cultivares de arroz visando resistência à brusone no Rio Grande do Sul.

Zeigler et al. (1995), verificaram que a NIL C101A51 apresentou um espectro de resistência extremamente amplo. Em 118 ensaios conduzidos em 40 locais, durante 3 anos, a NIL C101A51 foi suscetível em apenas 9 locais. Em 2 locais em Laguna, Filipinas, a NIL C101A51 foi suscetível somente à linhagem 44 do patógeno. Em outro estudo conduzido nas Filipinas, a NIL C101A51 foi resistente a 450 isolados representativos de linhagens de *M. grisea*, sendo também compatível somente com isolados da linhagem 44 (Chen et al., 1995).

A ampla efetividade de *Pi-2* sugere que este gene pode ser extremamente importante em programas de melhoramento genético visando resistência à

brusone, desde que utilizado em combinação com outros genes com espectro de resistência complementar. O gene *Pi-2*, em combinação com outros genes maiores, foram piramidizados em determinadas cultivares, e sua efetividade contra *M. grisea* está sob investigação (Chen et al., 1996).

Informação sobre o espectro de resistência do conjunto de genes disponíveis pode ser útil na seleção de combinações de genes para o melhoramento genético (Zeigler et al., 1994). A disponibilidade de um grupo de NILs, contendo diferentes genes de resistência, possibilita a caracterização, com precisão, do espectro de resistência de genes maiores isoladamente (Mackill & Bonman, 1992).

Marcadores moleculares com localização próxima a genes de resistência são necessários para o melhoramento assistido, a fim de garantir uma seleção eficiente. Com a disponibilidade de mapas moleculares de alta resolução a probabilidade de encontrar marcadores próximos a genes de interesse tem aumentado (Mew et al., 1994).

Além do marcador RG64, RG456, outro marcador próximo ao gene *Pi-2*, foi utilizado na identificação de cultivares que contêm este gene em uma população segregante F₂. A eficiência de identificação de indivíduos homocigotos resistentes aumentou de 96% (somente com RG64) para 100%, quando utilizou-se estes dois marcadores (Hittalmani et al., 1994).

Após a identificação de genes de resistência utilizando marcadores moleculares, a piramidização de genes, pode ser utilizada como estratégia para assegurar uma resistência durável contra o aparecimento de novas raças do patógeno. (Zeigler et al., 1994). Três genes de resistência à brusone, *Pi-1*, *Pi-2* e

Pi-4, foram piramidizados utilizando marcadores de RFLP (Hittalmani et al., 2000). As cultivares contendo combinações de 2 e 3 genes, que foram testadas para a resistência à brusone nas Filipinas e na Índia, indicaram que combinações incluindo *Pi-2* têm aumentado a resistência. Os genes de resistência de linhas piramidizadas estão sendo atualmente introgrididos em cultivares de arroz com características agronômicas superiores através da seleção assistida por marcadores moleculares (Hittalmani et al., 2000).

Tabela 3. Reação à brusone de 33 cultivares e linhas avançadas de arroz, que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C101A51, quando submetidas à inoculação com 6 diferentes isolados de *Magnaporthe grisea*.

Cultivares	Isolados					
	1	2	3	4	5	6
C101A51	R	R	R	R	R	R
Fanny*	S	S	S	S	S	S
Irga 959-1-2-2F-2-1-2-A-4	R	R	R	R	R	R
Irga1829-7-8T-1	R	R	R	R	R	S
CT12249-3-4-5-1P-1P	R	R	R	R	R	R
Irga 975-2-1-3-1-1	R	S	S	S	S	R
CT10821-2-CA-2-M	S	S	S	S	S	R
Irga 1832-5-5C-MF-2-2	R	R	R	R	R	S
ITA 324	R	S	S	S	S	R
Irga 440-22-4-2F-1-C	R	R	R	S	R	R
Irga1572-2-3-3-1	R	R	R	R	R	S
IR 56450-4-2-2	R	R	R	R	R	R
Irga 959-1-2-2F-5-1-2-B-4-CA-4	R	R	R	R	R	R
Irga 1567-14-2-3-1	R	R	R	R	R	S
CT12245-26-2-4P-1P	R	R	R	R	R	R
Irga 1074-8-4-1F-1-1	R	R	R	R	R	S
Irga 331-33-2-12-A-4	R	R	R	S	R	R
Irga 369-31-2-3F-A1-1	R	R	R	R	R	R
Irga 421	S	S	S	S	S	R
Icta Quirigua	R	R	R	R	R	R
Amistad 82	R	S	R	S	S	R
CT9737-5-2-1-2-4P	R	R	R	R	R	R
CT10865-CA-12-M-B	R	R	R	R	R	S
Irga 1573-4-CA-5	R	S	R	R	R	S
BR IRGA 409	S	S	S	S	S	R
Irga 417	R	R	R	S	R	R
Irga 1598-3-2F-1-2-1	R	R	R	R	R	R
Irga 1571-17-1F-1-2-1	R	R	R	R	R	S
Irga 1598-7-2F-1-3-2	R	R	R	S	R	S
Usen	R	R	R	S	R	S
Isolinha 6	R	R	R	R	R	R
Metica 1	R	R	R	R	R	S
IR 36	R	R	R	S	R	S
Irga 420	R	R	R	R	R	S
Irga 1581-8-5-1-2	R	R	R	R	R	S

R: Reação de resistência

S: Reação de suscetibilidade

* : controle positivo da inoculação

3. CAPÍTULO III

SELEÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA *Pi-1* E *Pi-11* À BRUSONE (*Magnaporthe grisea*) EM CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa*)

3.1. INTRODUÇÃO

A brusone, causada pelo fungo *M. grisea* (Herbert) Barr, é considerada a doença mais importante da cultura do arroz na maioria dos países produtores, devido ao seu grande potencial destrutivo (Ou, 1985). O uso de cultivares resistentes tem sido o método mais econômico e efetivo para o controle da doença (Prabhu & Bedendo, 1991). Entretanto, a resistência das cultivares tem sido perdida devido a diversidade e a instabilidade da virulência do fungo causador da brusone (Ou, 1980; Correa-Victoria & Zeigler, 1993). Além disso, há uma grande dificuldade para os programas de melhoramento genético acompanharem as mudanças nas frequências gênicas na população do patógeno, pois os métodos de seleção baseiam-se principalmente em características fenotípicas da planta. A variabilidade do fungo é responsável pela assim denominada “quebra” da resistência das cultivares, que ocorre normalmente poucos anos após o início do cultivo comercial das mesmas (Correa-Victoria & Zeigler, 1993).

A existência de linhas-quase-isogênicas (NILs) contendo genes de resistência individuais, é uma ferramenta importante para estudos populacionais de *M. grisea*. O padrão de resistência de raças de *M. grisea* poderá ser facilmente estudado em linhas possuindo genes de resistência conhecidos (Bonman et al., 1987). Foi demonstrado que NILs são efetivas no mapeamento de genes de resistência com marcadores moleculares (Young et al., 1988).

Técnicas modernas de biologia molecular podem contribuir decisivamente para acelerar o processo de melhoramento de cultivares resistentes à brusone através do uso de marcadores moleculares. A disponibilidade de mapas moleculares de alta resolução no arroz, com marcadores moleculares próximos a genes alvo, e o rápido desenvolvimento de marcadores baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm facilitado o emprego da seleção assistida em programas de melhoramento genético (McCouch et al., 2001).

No arroz, mais de 500 marcadores microssatélites foram desenvolvidos e utilizados para a construção de mapas genéticos (Wu & Tanksley, 1993; Akagi et al., 1996; Panaud et al., 1995, 1996; Chen et al., 1997; Temnykh et al., 2000, 2001). Marcadores microssatélites têm sido utilizados em estudos genéticos no arroz para identificação de cultivares, na análise da diversidade genética, na identificação de introgressões em cruzamentos interespecíficos, na determinação de “pedigrees”, na localização de genes e loci de características quantitativas (QTLs) nos cromossomos e na seleção assistida por marcadores (McCouch et al., 2001).

Baseado na informação existente em relação à aplicação de marcadores microssatélites e na disponibilidade de um grande número destes marcadores

mapeados, o objetivo do presente estudo foi a seleção de marcadores microssatélites para a identificação dos genes de resistência *Pi-1* e *Pi-11* em cultivares de arroz do banco de germoplasma do programa de melhoramento genético do Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA).

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Material genético

Foram selecionadas 104 cultivares de arroz, incluindo linhas avançadas pertencentes ao banco de germoplasma do IRGA, que apresentaram resposta diferencial à *M. grisea* nos viveiros de infecção conduzidos no município de Torres, RS, na safra 1999/2000 (Maciel, dados não publicados).

3.2.2. Extração do DNA

Para a extração do DNA, 50 sementes de cada cultivar foram colocadas para germinar em caixas do tipo Gerbox e incubadas a 28°C sob um fotoperíodo de 12h de luz. Após 7 dias, coleótilos e radículas das plântulas foram coletadas para extração do DNA utilizando o método “Plant DNAzol” (Gibco, BRL). O tecido obtido, foi moído na presença de nitrogênio líquido, transferido (100ng) para um tubo de microcentrífuga e ressuspendido em 300µL de “Plant DNAzol”, sendo agitado vigorosamente durante 5min. Após, foi acrescentado 300µl de clorofórmio, agitando-se novamente por 5min, seguido de centrifugação a 10.000g durante 10min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga ao qual foi adicionado 225µl de etanol absoluto. As amostras foram agitadas levemente, incubadas em temperatura ambiente por 5min e centrifugadas a 4.000g durante 4min, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi adicionado 300µl de solução de lavagem (171µl de “Plant DNAzol” + 129µl de etanol absoluto) ao material precipitado, agitando-se levemente o tubo de microcentrífuga. As amostras foram incubadas em

temperatura ambiente durante 5min, seguidas de nova centrifugação a 4.000g durante 4min, em temperatura ambiente. Uma segunda lavagem foi feita adicionando-se 300µl de etanol 70% a cada tubo de microcentrífuga e centrifugada conforme etapa anterior. Foi adicionado 70µl de água ultra pura ao material precipitado. A concentração das amostras foi determinada com um espectrofotômetro (Beckman DU 65) e armazenadas a -20°C.

3.2.3. Análise por amplificação dos microssatélites

O DNA genômico das cultivares foi submetido à amplificação por PCR, para amplificar seqüências de microssatélites associados aos genes de resistência desejados, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores exemplificados na Tabela 1.

As reações foram realizadas em volume final de 25µL contendo 100ng de DNA, 10mM Tris-HCl (pH 9,2); 25mM KCl; 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq DNA polimerase (Gibco/BRL). As amplificações foram realizadas em um termociclador PTC-100™. As condições da PCR foram 94°C (5min), seguido de 35 ciclos de 94°C (1min), 55°C (1min) e 72°C (2min), e uma etapa de extensão final a 72°C (5min).

3.2.4. Eletroforese em gel desnaturante

Os produtos da PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (6%) (0,8M de acrilamida; 19,46mM de N,N' Methylenebisacrylamida; 7M de uréia; 90mM de Tris, pH:8,3; 90mM de ácido

bórico; 2mM de EDTA; 4,4mM de Persulfato de amônio e 3,9mM de Temed). O gel foi submetido à eletroforese em um sistema de seqüenciamento HoeferTMSQ3. As condições de eletroforese foram 55 W (pré-corrída) durante 1h (45-50°C) e 55 W de corrída durante aproximadamente 3 horas (45-50°C). As amostras foram incubadas a 70°C durante 2 min previamente ao início da eletroforese.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos marcadores microssatélites.

Marcadores Microssatélites	Oligonucleotídeo iniciador (senso)	Oligonucleotídeo iniciador (antisenso)
RM254	5'agccccgaataaatccacct3'	5'ctggaggagcatttggtagc3'
RM206	5'cccatgcggttaactattct3'	5'cgtccatcgatccgatgg3'
RM473E	5'tatcctcgtctccatcgctc3'	5'aaggatgtggcggtagaatg3'
RM210	5'tcacattcggtggcattg3'	5'gaggatggttgtcacttg3'
RM223	5'gagtgagcttgggctgaaac3'	5'gaaggcaagtcttggcactg3'
RM556	5'actcaaacctcactgcacc3'	5'tagcacactgaacagctggc3'

Fontes: Chen et al., 1997; Temnykh et al.,2001.

3.2.5. Coloração com nitrato de prata

A placa contendo o gel foi imersa em uma solução de ácido acético 10% e incubada no mínimo durante 30min, em temperatura ambiente, para fixação dos fragmentos. Após, a placa foi lavada 3 vezes com 1L de água destilada durante 2min, e a coloração foi executada através de imersão da placa com o gel em uma solução de nitrato de prata (6mM de AgNO₃ e 0,055% de formaldeído) durante 30min, sob agitação moderada, em temperatura ambiente. Após, lavagem durante 25s com 2L de água destilada a coloração foi revelada através de imersão da placa com o gel em uma solução (±10°C) de carbonato de sódio (0,28M de

Na₂CO₃; 0,055% de formaldeído e 1,2µM de tiosulfato de sódio), e agitada ligeiramente até o aparecimento dos produtos da amplificação. A reação foi interrompida através da adição de 2L de ácido acético 10% para a paralisação da reação e o gel foi fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak).

3.2.6. Teste de virulência

Foram inoculados 10 diferentes isolados de *M. grisea*, representativos das linhagens do patógeno que ocorrem no Rio Grande do Sul (Maciel et al., 2001) em cultivares e linhas avançadas do programa de melhoramento genético do IRGA.

Para a produção de inóculo, os isolados foram repicados para placas de Petri com meio de farinha de arroz e crescidos por 12-14 dias a 28°C sob 12h de luz. Após esse período, o micélio superficial foi removido com auxílio de um pincel e as colônias lavadas com água destilada. As placas foram cobertas com um filme plástico transparente perfurado e mantidas nas mesmas condições por 4-6 dias a fim de estimular a esporulação.

A semeadura foi realizada em vasos plásticos (D=8cm) a fim de obter-se 10 plantas por vaso. As plantas receberam aplicação de nitrogênio na forma amídica, aplicada em três doses iguais: 1) na semeadura; 2) uma semana após; 3) um dia antes da inoculação, em quantidades equivalentes a 150kg de N por ha.

A inoculação foi realizada quando as plantas atingiram o estágio de 3-4 folhas (± 21 dias) com uma suspensão de $1,8 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹. Utilizaram-se 20mL dessa suspensão em cada repetição, sendo feitas 2 repetições para cada

cultivar. As plantas foram então incubadas em caixas plásticas sob alta umidade e mantidas em câmara de crescimento sob um fotoperíodo de 12h de luz a 26°C. As reações das cultivares aos isolados foram avaliadas 14 dias após a inoculação, utilizando-se a escala diagramática com notas de 0-5 descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Escala de avaliação de brusone e sua conversão para tipos de reação.

Nota	Sintomatologia	Reação
0	Sem sintomas	Resistente
1	Pequenas lesões marrons, com tamanho de 0,5mm de diâmetro	Resistente
2	Pequenas lesões de cor marrom, entre 0,5-1mm de diâmetro, necróticas, sem centro esporulativo	Resistente
3	Pequenas lesões arredondadas entre 1-3mm de diâmetro, com centro cinzento, borda marrom	Suscetível
4	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone de 3mm, com centro cinzento e com pouca ou nenhuma lesão coalescente	Suscetível
5	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone de 3mm, com centro cinzento e com uma ou mais folhas mortas pela coalescência das lesões	Suscetível

Fonte: Mackill & Bonman, 1992.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise molecular e teste de virulência

3.3.1.1. Gene de resistência *Pi-1*

A análise molecular de RM254, em 104 cultivares de arroz, apresenta 7 perfis eletroforéticos distintos (Figura 1). Trinta cultivares apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC (169pb), sugerindo a presença deste alelo do RM254 nestas cultivares (Apêndice 1). A NIL C101LAC, que contém os genes *Pi-1* e *Pi-11*, também apresenta o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC que também contém o gene *Pi-1* (Figura 1). Esta eficiência de agrupamento das duas NILs se deve provavelmente à distância genética de 0,3cM (mapa de consenso) que o marcador RM254 se encontra do gene de resistência *Pi-1* (Tabela 3).

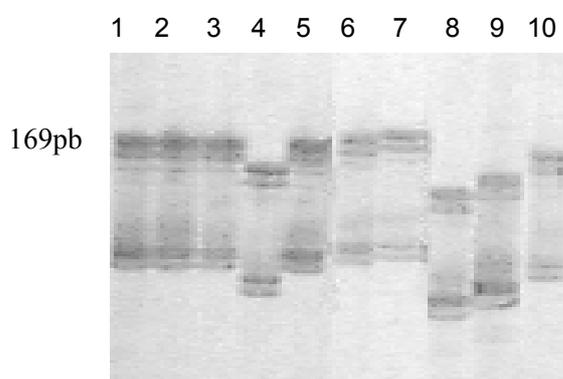


Figura 1. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM254 do DNA genômico de 10 cultivares de arroz. 1. NIL C104LAC (*Pi-1*); 2. C101LAC (*Pi-1* e *Pi-11*); 3. 368060-M (Guatemala); 4. Javaé; 5. IR 60; 6. CT 9155-2-3-1-2-M-1-1P; 7. IRGA 1571-17-1F-1-2-1; 8. Dawn; 9. IRGA 1598-7-2F-1-3-2 e 10. Zenith. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poli-acrilamida desnaturante (6%).

Tabela 3. Características dos marcadores microssatélites e suas posições cromossomais nos mapas genéticos de consenso e IR64/Azucena.

Marcadores Microssatélites	Cromossomos	Posição cromossomal (cM) *	Posição cromossomal (cM) **	Posição cromossomal (cM)* dos genes de resistência	Tipo de repetição do microssatélite	Referências
RM254	11	123,2	110	122,9 (<i>Pi-1</i>)	(TC) ₆ ATT(CT) ₁₁	Chen et al., 1997
RM206	11	106,2	102,9	122,9 (<i>Pi-1</i>)	(CT) ₂₁	Chen et al., 1997
RM473E	11	***	95,6	122,9 (<i>Pi-1</i>)	(TCTA) ₁₄	Temnykh et al., 2001
RM210	8	75,5	90,3	71,8 (<i>Pi-11</i>)	(CT) ₂₃	Chen et al., 1997
RM223	8	64,4	80,5	71,8 (<i>Pi-11</i>)	(CT) ₂₅	Chen et al., 1997
RM556	8	***	90,3	71,8 (<i>Pi-11</i>)	(CCAG) ₆	Temnykh et al., 2001

* Distâncias genéticas no mapa genético de consenso.

**Distâncias genéticas no mapa genético IR64/Azucena.

*** Não estão mapeados

Outros dois marcadores microssatélites, RM206 e RM473E, com localização cromossomal no mapa genético IR64/Azucena de 102,9cM e 95,6cM, respectivamente (Tabela 3), foram utilizados para obter uma melhor eficiência de seleção de cultivares que contêm o gene de resistência *Pi-1*. A amplificação com RM206 revela 12 perfis eletroforéticos distintos (Figura 2). Oito cultivares apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC (168pb), sendo que destas, 5 também foram selecionadas com o marcador RM254 (Apêndice 1). A análise com RM473E, apresenta 9 perfis eletroforéticos distintos (Figura 3). Apenas 3 cultivares apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC (134pb). Estas cultivares também foram selecionadas com o marcador RM254 (Apêndice 1).

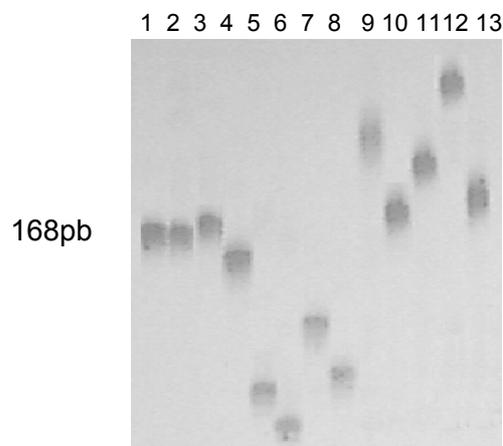


Figura 2. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM206 do DNA genômico de 13 cultivares de arroz. 1. NIL C104LAC (*Pi-1*); 2. Irga 369-31-2-3F-A1-1; 3. C101LAC (*Pi-1* e *Pi-11*); 4. 368060-M (Guatemala); 5. CT9895-5-3-M-4-1P; 6. Irga 653-7-3-F-1; 7. Irga 976-2-3-1F-3-2; 8. Javaé; 9. Cuiabana; 10. IAC 25; 11. Japonês Pragana; 12. CT6742-10-10-1-M-M-M; 13. Rio Paraguaio. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (6%).

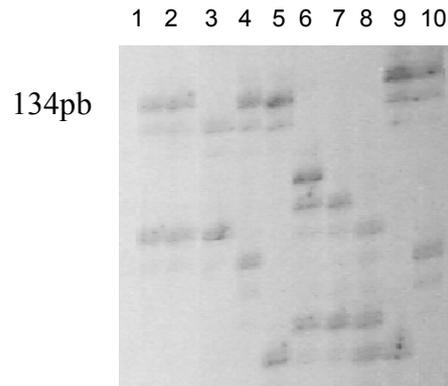


Figura 3. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM473E do DNA genômico de 10 cultivares de arroz. 1. NIL C104LAC (*Pi-1*); 2. NIL 21; 3. NIL C101LAC (*Pi-1* e *Pi-11*); 4. Irga 1832-5-5C-MF-2-2; 5. CT6742-10-10-1-M-M-M; 6. NP 125; 7. Shao Thiao Tsao; 8. Mars; 9. Rio Paraguaio; 10. ITA 324. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (6%).

Os marcadores RM206 e RM473E não agrupam a NIL C101LAC, que contém os genes *Pi-1* e *Pi-11* (Figuras 2 e 3), provavelmente devido à distância genética que estes marcadores se encontram do gene *Pi-1*. O marcador RM206 está localizado a uma distância genética, no mapa de consenso, de 16,7cM do gene *Pi-1*, enquanto que para RM473E não há informação da distância que ele se encontra do gene *Pi-1*, pois não está mapeado no mapa de consenso (Tabela 3).

Devido a este fato, foram submetidas ao teste de virulência 24 cultivares que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC, após à amplificação com o marcador RM254.

O teste de virulência indica que os isolados 166 e 175 são os únicos incompatíveis com a NIL C104LAC, que contém o gene *Pi-1* (Tabela 4).

Tabela 4. Reação à brusone de 24 cultivares e linhas avançadas de arroz, que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC (*Pi-1*), quando submetidas à inoculação com 10 diferentes isolados de *Magnaporthe grisea*.

Cultivares	Isolados									
	180	66.1	B34	90.2	98.2	98.1	96.1	166	175	102
NIL C104 LAC	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
NIL C101LAC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Fanny *	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Icta Quirigua	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Irga 370-38-1-2-1F-2D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Irga 421	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
IAC 25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CT10471-5-5I-5I-1I-3I-MI	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
368060-M (Guatemala)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IR 60	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cuiabana	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S
Irga 653-7-3-F-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Epagri 107	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
BG 1639	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Epagri 106	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CT9145-4-21-5P-1-MI-F8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Irga 417	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AY 223	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CT 12376-22-1P-M-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Irga 1572-2-2-2-4-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Irga 976-2-3-1F-3-2	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
CT 9895-5-3-M-4-1P	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CT 12572-4-M-3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
Metica 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Irga 318-11-6-8-2-A1-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CT9145-4-21-5P-1-MI-F8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NIL C 101 A 51	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: Reação de resistência

S: Reação de suscetibilidade

*: controle positivo da inoculação

Entre as cultivares selecionadas pelo marcador RM254, 19 são resistentes a estes 2 isolados, sendo que 4 cultivares são resistentes a um dos isolados e apenas 1 cultivar é suscetível a ambos (Tabela 4). A explicação mais provável para estes casos de suscetibilidade é a ocorrência de recombinação entre o marcador e o gene. A cultivar Cuiabana provavelmente contém o gene *Pi-1*, pois teve comportamento igual a NIL C104LAC, com exceção dos isolados B34 e 96.1 (Tabela 4). Os demais isolados são compatíveis com a NIL C104LAC e incompatíveis com a NIL C101LAC. Verifica-se que, com exceção das cultivares IRGA 421, IAC 25 e Cuiabana, as demais cultivares são resistentes a todos estes isolados (Tabela 4). É possível que esta resistência seja devido a outros genes de resistência, distintos de *Pi-1*. Os isolados 180, 90.2, 98.2, 96.1 e 102 (Tabela 4) são os mesmos isolados inoculados na NIL IR1529, que contém o gene de resistência *Pi-11*. Estes isolados são incompatíveis com a NIL IR1529 (Tabela 5). Isto sugere que a resistência das cultivares a estes isolados pode ser devido ao gene de resistência *Pi-11*.

3.3.1.2. Gene de resistência *Pi-11*

A análise molecular de RM210, de 104 cultivares de arroz, apresenta 7 perfis eletroforéticos distintos (Figura 4). Nove cultivares apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 (160pb) (Apêndice 2). Também utilizou-se os marcadores microssatélites RM223 e RM556 (Tabela 3), para se obter uma melhor seleção do gene de resistência *Pi-11*. Os marcadores RM210 e RM223 estão a uma distância genética do gene *Pi-11*, no mapa de consenso, de 3,7cM e 7,4cM, respectivamente. O marcador RM556 não está mapeado no mapa de

consenso (Tabela 3). A análise com o marcador RM223, apresenta 8 perfis eletroforéticos distintos (Figura 5). Oito cultivares apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 (229pb) sendo que 3 cultivares também foram selecionadas com o marcador RM210 (Apêndice 2). Quando utiliza-se o marcador RM556, verificam-se 3 perfis eletroforéticos distintos (Figura 6). O perfil eletroforético de 55 cultivares é igual ao da NIL IR1529 (121pb), sendo que 8 cultivares também foram selecionadas com o RM223, 2 com o RM210 e 3 cultivares foram iguais com todos os marcadores (Apêndice 2).

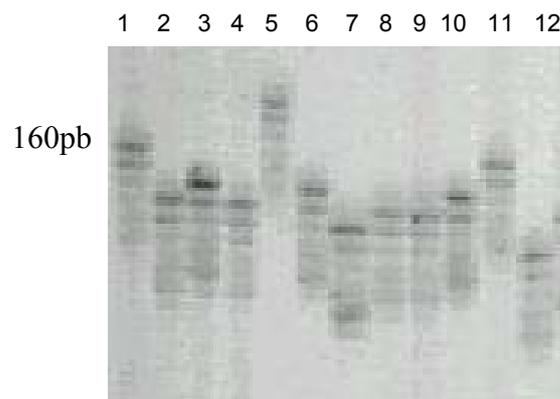


Figura 4. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM210 do DNA de 12 cultivares de arroz. 1. IR1529 (*Pi-11*); 2. Hanfeng; 3. Embrapa 6. (Chuí); 4. Nipponbare; 5. CT 9841-5-2-1P-2I-M; 6. Epagri 107; 7. CT 9895-5-3-M-4-1P; 8. Irga 418; 9. Drew; 10. Irga 653-7-3-F-1; 11. Cuiabana; 12. Mars. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (6%).

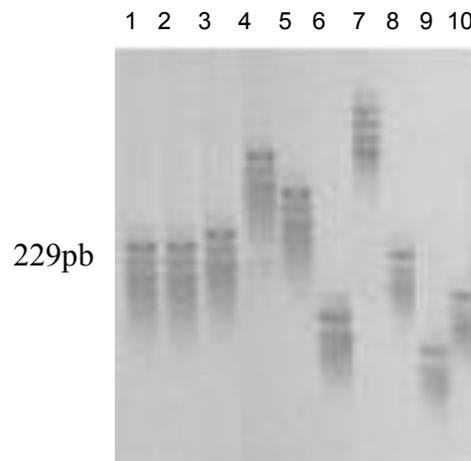


Figura 5. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM223 do DNA genômico de 10 cultivares de arroz. 1. IR1529 (*Pi-11*); 2. CT10471-5-5I-1I-3I-MI-6P; 3. Irga 1598-3-2F-1-3-1; 4. Irga 1598-7-2F-1-3-2; 5. Irga 1832-7-2C-1-MF-2-1; 6. IR 36; 7. IAC 25; 8. Iacuba 20; 9. IR 60; 10. Dawn. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (6%).

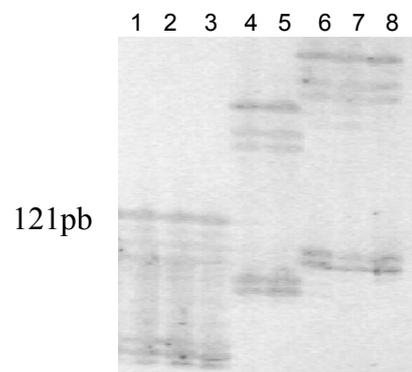


Figura 6. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de RM556 do DNA genômico de 8 cultivares de arroz. 1. IR1529 (*Pi-11*); 2. NIL 10; 3. NIL 1; 4. Bertone; 5. NP 125; 6. CT6742-10-10-1-M-M-M; 7. CT6741-F2-CA-22; 8. Cypress. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (6%).

Uma vez que o marcador RM210 é o que se encontra a uma distância genética menor do gene de resistência *Pi-11*, entre os marcadores utilizados, foram submetidas ao teste de virulência 5 cultivares que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 após a amplificação com este marcador.

O teste de virulência revela que apenas os isolados 166 e 237 são compatíveis com a NIL IR1529 (Tabela 5). Apenas a cultivar ITA 418 é resistente a maioria dos isolados e, provavelmente, esta resistência se deve ao gene de resistência *Pi-11*, pois apresenta o mesmo comportamento que a NIL IR1529, com exceção do isolado 179 (Tabela 5). O marcador RM210 teve baixa eficiência para selecionar cultivares que contêm o gene de resistência *Pi-11*, provavelmente devido a distância genética que se encontra do gene (3,7cM), podendo ter ocorrido, recombinação entre o marcador e o gene de resistência.

Tabela 5. Reação à brusone de 5 cultivares e linhas avançadas de arroz, que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 (*Pi-11*), submetidas à inoculação com 10 diferentes isolados de *Magnaporthe grisea*.

Cultivares	Isolados									
	179	96.1	180	102	166	237	90.2	104	98.2	169
NIL IR1529	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
Fanny*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Híbrido MH - 2003	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Irga 421	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Ita 418	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R
CT 12475-10-M-4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amistad 82	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R: Reação de resistência

S: Reação de suscetibilidade

*: controle positivo da inoculação

Estudos para selecionar marcadores microssatélites mais eficientes para a identificação dos genes de resistência *Pi-1* e *Pi-11* devem ser realizados. Com a disponibilidade de mapas moleculares de alta resolução, a probabilidade de encontrar marcadores microssatélites mais próximos a genes de interesse tem aumentado (Mew et al., 1994).

Vários trabalhos relatam as vantagens da utilização de marcadores microssatélites na investigação genética e no melhoramento assistido. Yang et al. (1994), utilizaram marcadores microssatélites para demonstrar que níveis de diversidade alélica na coleção de variedades tradicionais, foram maiores que nas coleções de cultivares oriundas de programas de melhoramento do arroz. Olufowote et al. (1997), demonstraram que o grupo selecionado com marcadores microssatélites pode ser utilizado para diferenciar variedades, e que estes marcadores foram úteis na identificação de frequências alélicas em uma mistura complexa de linhas puras que foram características de diversas variedades tradicionais. Blair & McCouch (1997), demonstraram o uso de marcadores microssatélites para construção de mapas de alta resolução e para a seleção de NILs para clonagem posicional de genes. Vários grupos têm utilizado marcadores microssatélites para implementar a seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento. Li et al. (2000), utilizaram o marcador microssatélite RM262, que está próximo do gene de resistência à brusone *Pi-d*, para identificar cultivares contendo este gene em uma população segregante F₂. Os resultados indicaram uma eficiência de 98% na identificação de cultivares resistentes, podendo ser utilizado na seleção assistida e no melhoramento de novas cultivares com resistência à brusone.

Para melhor caracterização da afinidade espacial entre microssatélites e genes de interesse, foi investigada a distribuição de marcadores microssatélites em seqüências abertas de leitura (ORFs), regiões 3' e 5' não traduzidas (UTRs), íntrons e regiões intergênicas (Temnykh et al., 2001). Observou-se que ao redor de 80% de repetições de trinucleotídeos ricos em GC ocorrem em éxons, enquanto marcadores microssatélites trinucleotídeos ricos em AT foram distribuídos em todos os 4 domínios genômicos. Marcadores microssatélites poli-dinucleotídeos e poli-tretranucleotídeos foram predominantemente situados em regiões não codificantes, preferencialmente em regiões intergênicas e raramente em íntrons (Temnykh et al., 2001).

Estes dados ajudam a entender porque alguns marcadores microssatélites utilizados neste trabalho apresentaram baixa eficiência para identificar os genes de resistência. Além da possibilidade de recombinação entre marcador e o gene, outra explicação surge de características intrínsecas dos marcadores microssatélites. O tipo de repetição, geralmente o dinucleotídeo CT, presente em cada microssatélite (Tabela 3), é característico de marcadores microssatélites presentes em regiões intergênicas. Estas regiões normalmente apresentam maior instabilidade genética do que as regiões codificantes em função do acúmulo de mutações. Alterações genéticas em microssatélites localizados nestas regiões, tais como adições ou deleções de repetições, normalmente são toleradas pelo indivíduo. Portanto, estas alterações podem ocorrer em frequências distintas, independentemente, de alterações em alelos de genes de resistência.

Os marcadores microssatélites identificados neste trabalho serão utilizados na identificação de genes em uma população segregante F₂, resultante de

cruzamento entre cultivares que contêm os genes de resistência, para verificar a eficiência de identificação de indivíduos homozigotos resistentes. Após estes resultados, poder-se-ia avaliar melhor a eficiência dos marcadores microssatélites na seleção assistida em programas de melhoramento genético de arroz.

4. CONCLUSÕES

O marcador RG 64 é eficiente para identificar cultivares de arroz que contêm o gene de resistência *Pi-2*.

O marcador microssatélite RM254 é eficiente para identificar cultivares de arroz que contêm o gene de resistência *Pi-1*.

O marcador RM210 não é eficiente para identificar cultivares de arroz que contêm o gene de resistência *Pi-11*.

Os demais marcadores microssatélites não são eficientes para agrupar as cultivares que apresentam o mesmo perfil eletroforético das NILs.

Marcadores moleculares podem auxiliar o desenvolvimento de cultivares resistentes à brusone em programas de melhoramento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1998. p.303-304.

AHN, S.W. International collaboration on breeding for resistance to rice blast In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p.136-153.

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A. et al. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**., St. Joseph, v.94, p.61-67, 1996.

AKAGI [**Markers identified by Akagi et al.,1996**] Disponível em: ars-genome.cornell.edu/rice. Acesso em Jul.2000.

ARRUDA, M.C.C.; ALZATE-MARIN, A.L.; CHAGAS, J.M. et al. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the Co-4 resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, St. Paul, v.90, p.758-761, 2000.

BLAIR, M.W.; McCOUCH, S. Microsatellite and sequenced-tagged site markers diagnostic for the rice leaf blight resistance gene *xa-5*. **Theoretical and Applied Genetics**, St. Joseph, v.95, p.174-184, 1997.

BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, Frankfurt, v.8, p.930-932, 1990.

BEDENDO, I.P. Doenças do arroz. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia**: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Esalq, 1997. p.84-88.

BONMAN, J.M.; VERGEL DE DIOS, T.I.; BAMDONG, J.M. et al. Pathogenic variability of monoconidial isolates of *Pyricularia oryzae* in Korea and in the Philippines. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, p.127-130, 1987.

BORROMEO, E.S.; NELSON, R.J.; BONMAN, J.M.; LEUNG, H. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia grisea* infecting rice and weed hosts. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, p.393-399, 1993.

BUDDENHAGEN, I.W.; **Durable resistance in crops**: Durable resistance in rice. New York: Plenum, 1983. p.401-428.

BRAHM, L.; RÖCHER, T.; FRIEDT, W. PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew. **Crop Science**, Madison, v.40, p.676-682, 2000.

CAMARGO, L.E.A. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIRM, L. **Manual de Fitopatologia**: Princípios e conceitos. São Paulo: Esalq, 1995. p.455-469.

CAUSSE, M.A.; FULTON, T.M.; CHO, Y.G. et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an inter specific backcross population. **Genetics**, Chapel Hill, v.138, p.1251-1274, 1994.

CHAGUE, V.; FAHIMA, T.; DAHAN, A. et al. Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the *Yr15* gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. **Genome**, Ottawa, v.42, p.1050-1056, 1999.

CHEN, D.H.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG, H. et al. Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, p.1011-1020, 1995.

CHEN, D.H.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG, H. et al. Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi-2(t)*. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, p.52-56, 1996.

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y. et al. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, St. Joseph, v.95, p.553-567, 1997.

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, Ottawa, v.34, p.66-71, 1991.

CORREA-VICTORIA, F.J. ; ZEIGLER, R.S. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot spot" breeding site in eastern Colômbia. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, p.1029-1035, 1993.

DIOH, W.; THARREAU, D.; NOTTEGHEM, J.L. et al. Mapping of Avirulence Genes in the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea*, With RFLP and RAPD Markers. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.13, p.217-227, 2000.

EMBRAPA. **Arroz irrigado**: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Pelotas, 1999. p. 74-80.

EPAGRI. **Sistema de produção de arroz irrigado em Santa Catarina**: (Pré-germinado). Florianópolis, 1998. 79p. (EPAGRI. Sistemas de Produção, 32).

FALEIRO, G.F.; VINHADELLI, W.S.; RAGAGNIN, V.A. et al. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics**, Chapel Hill, v.23, p.399-402, 2000.

FARMAN, M.L.; LEONG, S.A. Chromosome walking toward *Avr1-Co39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*. Discrepancy between the physical and genetical maps. **Genetics**, Chapel Hill, v.150, p.1049-1058, 1998.

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. p.03-16.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996. p.23-51. (EMBRAPA-CENARGEM, Documento, 20).

FOMBA, S.N.; TAYLOR, D.R. Rice blast in west Africa: its nature and control. In: ZEIGLER, R.S., LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p.343-355.

FLOR, H.H. Inheritance of reaction to rust in flax. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.74, p.241-262, 1947.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.9, p.275-296, 1971.

GHAREYAZIE, B.; HUANG, N.; SECOND, G. et al. Classification of rice germplasm. I. Analysis using ALP and PCR-based RFLP. **Theoretical and Applied Genetics**, St. Joseph, v.91, p.218-227, 1995.

GRANT, D.; SHOEMAKER, R. Molecular hybridization. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. **DNA Markers: Protocols, applications, and overviews**. New York: Wiley-Vch, 1998. p.15-26.

HAMER, J.E.; HOWARD, R.J.; CHUMLEY, F.G. et al. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science**, Washington, v.239, p.288-290, 1988.

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

HITTALMANI, S.; MEW, T.; RODRIGUEZ, R. et al. Identification of blast resistance gene, *Pi-2(t)* in rice plants by flanking markers. **Rice Genetics Newsletter**, Manila, v.11, p.144-146, 1994.

HITTALMANI, S.; PARCO, A.; MEW, T.V. et al. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, St. Joseph, v.100, p.1121-1128, 2000.

HOWARD, R.J. Cell biology of pathogenesis. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p.03-22.

INUKAI, T.; MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. et al. Blast resistance gene *Pi-2(t)* and *Pi-z* may be allelic. **Rice Genetics Newsletter**, Manila, v.9, p.90-92, 1992.

INUKAI, T.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S. et al. Allelism of blast resistance genes in near-isogenic lines of rice. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.1278-1283, 1994.

INUKAI, T.; ZEIGLER, R.S.; SARKARUNG, S. et al. Development of pre-isogenic lines for rice blast-resistance by marker-aided selection from a recombinant inbred population. **Theoretical and Applied Genetics**, St. Joseph, v.93, p.560-567, 1996.

IRGA. **Arroz**: Custo de produção médio ponderado sistema convencional RS, safra 96/97. Cachoeirinha, 1997, v.12, p.01-47.

ISE, K. A close linkage between the rice blast resistance gene *Pi-ta²* and a marker on chromosome 12 in japonica rice. **International Rice Research Institute**, Manila, v.18, n.2, p.14, 1993.

JIA, Y.; McADAMS, S.A.; BRYAN, G.T. et al. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **The EMBO Journal**, Oxford, v.19, n.15, p.4004-4014, 2000.

JOHAL, G.S.; GRAY, J.; GRUIS, D. et al. Convergent insights into mechanism determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.73, p.468-474, 1995.

KACHROO, P.; AHUJA, P.; LEONG, M. et al. Organization and molecular analysis of repeated DNA sequences in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Current Genetics**, New York, v.31, p.361-369, 1997.

KANG, S.; SWEIGARD, J.A.; VALENT, B. The PWL host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.8, p.939-948, 1995.

KANG, S.; LEBRUN, M.H.; FARRALL, L.; VALENT, B. Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.14, p.671-674, 2001.

KINOSHITA, T. Report of committee on gene simbolization, nomenclature, and linkage groups. **Rice Genetics Newsletter**, Manila, v.8, p.02-37, 1991.

KIYOSAWA, S. Breakdown of blast resistance in rice in relation to general strategies of resistance gene deployment to prolong effectiveness of disease resistance in plants. In: LEONARD, K.J.; FRY, W.E. **Plant disease epidemiology, genetics, resistance and management**. New York: Macmillan, 1989. p.251-283.

LEE, Y.H.; DEAN, R.A. Cyclic AMP regulates infection structure formation by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, Rockville, v.5, p.693-700, 1993.

LEUNG, H.; BERNARDO, E.S.; NOTTEGHEM, J.L. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, p.1227-1233, 1988.

LI, S.G.; WANG, Y.P.; LI, H.Y. et al. Utilization of a microsatellite marker to identify rice blast resistance gene in two segregation populations. **Seng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v.16, n.3, p.324-327, 2000. Disponível em: ars-genome.cornell.edu/rice. Acesso em: dezembro.2001.

MACIEL, J.L.N.; RODRIGUES, P.C.S.; MORAES, M.G. Caracterização molecular e espectro de virulência de isolados de *Pyricularia grisea* do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2., 2001, Cachoeirinha. **Anais...** Porto Alegre: 2001. p.332-333.

MACKILL, A.O.; BONMAN, J.M. New Hosts of *Pyricularia oryzae*. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, n.2, p.125-127, 1986.

MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.746-749, 1992.

MANDEL, M.A.; CROUCH, V.W.; GUNAWARDENA, U.P. et al. Physical mapping of the *Magnaporthe grisea* AVR1-MARA locus reveals the virulent allele contains two deletions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.10, p.1102-1105, 1997.

MCCOUCH, S.R.; NELSON, R.J.; TOHME, J. et al. Mapping of blast resistance genes in rice. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p.167-186.

MCCOUCH, S.R.; TEMNYKH, S.; LUKASHOVA, A. et al. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications. In: KHUSH, G.S.; BRAR, D.S.; HARDY, B. **Rice Genetics IV**. Manila: IRRI, 2001. p. 117-135.

MEKWATANAKARN, P.; KOSITRATANA, W.; ZEIGLER, R.S. Sexual fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, p.939-943, 1999.

MELCHINGER, A.E. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. **Plant Breeding**, Berlim, v.104, p.01-19, 1990.

METHA, Y.R.; BAIER, A. Variação patogênica entre isolados de *Magnaporthe grisea* atacando triticale e trigo no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v.24, p.119-125, 1998.

MEW, T.W.; PARCO, A.S.; HITTALMANI, S. et al. Fine-mapping of major genes for blast resistance in rice. **Rice Genetics Newsletter**, Manila, v.11, p.126-128, 1994.

MICHELMORE, R.W. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.15, p.393-427, 1995.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.3, p.87-103, 1997.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **Plant Journal**, Oxford, v.1, p.175-182, 1993.

NAQVI, N.I.; BONMAN, J.M.; MACKILL, D.J. et al. Identification of RAPD markers linked to a major blast resistance. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.1, p.341-348, 1995.

NAQVI, N.I.; CHATTOO, B.B. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. **Genome**, Ottawa, v.39, p.26-30, 1996.

NEDEL, J.L.; ASSIS, F.N.; CARMONA, P.S. A planta de arroz: morfologia. In: PESK, S.T.; NEDEL, J.L.; BARROS, A.C.S.A. **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1998. p.11-66.

NISHIMURA, M.; HAYASHI, N.; JWA, N.S. et al. Insertion of the LINE retrotransposon MGL causes a conidiophore pattern mutation in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.13, n.8, p.892-894, 2000.

NOTTEGHEM, J.L.; THARREAU, D.; SILUÉ, D. et al. Present knowledge of rice resistance genetics and strategies for *Magnaporthe grisea* pathogenicity and avirulence gene analysis. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p.154-165.

OLUFOWOTE, J. O.; XU, Y.; CHEN, X. et al. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, Ottawa, v.40, p.370-378, 1997.

ORBACH, M.; FARRALL, L.; SWEIGARD, J.A. et al. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, p.2019-2032, 2000.

OU, S.H. **The rice blast disease**: A proposal for an international program of research on the rice blast disease. Maryland: The Johns Hopkins Press, 1965. p.441-446.

OU, S.H. **Rice diseases**. London: Eastern Press, 1972. 97-137p.

OU, S.H. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.167-187, 1980.

OU, S.H. A Proposal for an International Program of Research on the Rice Blast Disease. In: ZEIGLER, R.S., LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1985. p.109-201.

PAN, Q.H.; TANISAKA, T.; IKEHASHI, H. Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice. VI. Gene analysis for the blast resistance of two Yunnan native cultivars GA20 and GA25. **Breeding Science**, Tóquio, Suppl.2, v.70, 1996a.

PAN, Q.H.; TANISAKA, T.; IKEHASHI, H. et al. Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice. V. Identification of two blast resistance genes in a Yunnan native variety, Maowangu. **Breeding Science**, Tóquio, Suppl.1, v.79, 1996b.

PANAUD, O.; CHEN, X.; McCOUCH, S. et al. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome**, Ottawa, v.38, p.1170-1176, 1995.

PANAUD, O.; CHEN, X.; McCOUCH, S. et al. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Gene Genetics**, Berlim, v.252, p.597-607, 1996.

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

PRABHU, A.S.; FERREIRA, R.P. Avaliação e seleção no melhoramento de arroz visando resistência à brusone e mancha parda. In: **Mejoramento de arroz**. Reunión sobre mejoramento de arroz en el Cono Sur. Goiânia. 1991. p.75-85.

RIBEIRO, A.S.; TERRES, A.L.S. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae* e sua relação com cultivares resistentes à brusone. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.12, n.4, p.316-321, 1987.

RIBEIRO, A.S. **Doenças do arroz irrigado**. Pelotas: EMBRAPA, 1988. 56p. (EMBRAPA-CPATB. Circular técnica, 19).

RIBEIRO, A.S.; SPERANDIO, C.A. Controle de doenças na cultura do arroz irrigado. In: PESK, S.T.; NEDEL, J.L.; BARROS, A.C.S.A. **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 1998. p.301-318.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOEFFEL, S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v.239, p.487-491, 1988.

SWEIGARD, J.A.; VALENT, B.; ORBACH, M.J. et al. A genetic map of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. In: GENETIC..., 6 ed. Cold Spring, NY: Harbor Laboratory, 1993. p.3112-3117.

TEMNYKH, S.; CARTINHO, S.; LUKASHOVA, A. et al. Mapping and genome organization of microsatellites in rice (*Oryza sativa L.*). **Theoretical and Applied Genetics**, St. Joseph, v.100, p.697-712, 2000.

TEMNYKH, S.; DeCLERCK, G.; LUKASHOVA, A. et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa L.*): frequency, length, variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research**, New York, vol.11, p.1441-1452, 2001.

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

VALENT, B. ; CHUMLEY, F.G. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus. In: ZEIGLER, R.S., LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p.111-134.

WANG, G.L.; MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. et al. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. **Genetics**, Chapel Hill, v.136, p.1421-1434, 1994.

WEBSTER, R.K.; GUNNELL, S.P. **Compendium of Rice Disease**. St. Paul: APS PRESS, 1994. 62p.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; KENNETH, J.L. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6231-6235, 1990.

WILLIAMS, M.N.V.; PANDE, N.; NAIR, S. et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa L.*) genomic DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, St. Joseph, v.82, p.489-498, 1991.

WU, K.-S.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Gene Genetic**, Berlin, v.241, p.225-235, 1993.

YANG, G.P.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; XU, C.G. et al. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Molecular Gene Genetic**, Berlin, v.245 p.187-194, 1994.

YOUNG, N.D.; ZAMIR, D.; GANAL, M.W. et al. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. **Genetics**, Chapel Hill, v.120, p.579-585, 1988.

YU, Z.H.; MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. Inheritance of resistance to blast in some traditional and improved rice cultivars. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.323-326, 1987.

YU, Y.G.; SAGHAI MAROOF, M.A.; BUSS, G.R. et al. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.60-64, 1996.

ZHAO, X.; KOCHERT, G. Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Gene Genetic**, Berlin, v.231, p.353-359, 1992.

ZEIGLER, R.S.; TOHME, J.; NELSON, R. et al. Lineage exclusion: A proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. In: ZEIGLER, R.S., LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p.267-288.

ZEIGLER, R.S.; CUOC, R.P.; BERNARDO, D.H. et al. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.443-451, 1995.

ZHU, Y.; CHEN, H.; FAN, J. et al. Genetic diversity and disease control in rice. **Nature**, Londres, v. 406, p.718-722, 2000.

6. APÊNDICES

Apêndice 1. Cultivares e linhas avançadas de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC após a amplificação com os marcadores microssatélites RM254, RM206 e RM473E.

Cultivares	RM254	RM206	RM473E
368060-M(Guatemala)	x		
Agulha Bico Torto			
Alan			
Amistad 82			
AY 223	x		
Bertone			
BG 1639	x		
Blue Belle			
BR Irga 409			
Canastra			
Capi-93			
CT10471-5-5I-1I-3I-MI-6P	x		
CT10556-CA-11-M-M			
CT10588-CA-1-M			
CT12245-26-2-4P-1P			
CT12249-2-26-2-M			
CT12376-22-1P-M-3	x	x	
CT12475-10-M-4			
CT12572-4-M-3	x	x	
CT6741-F2-CA-22			
CT6742-10-10-1-M-M-M			
CT8248-1-12-1P-M-5P		x	
CT9145-4-21-5P-1-MI-F8-3P	x	x	
CT9841-5-2-1P-2I-2I-M			
CT9895-5-3-M-4-1P	x		
Cuiabana	x		
Cypress			
Dawn			
Drew			
EEA 404			
EEA 405			
EEA 406			
El Pazo 144			
El Pazo 227			
Embrapa 6 Chuí			
Epagri 106	x		

Continuação

Apêndice 1. Cultivares e linhas avançadas de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC após a amplificação com os marcadores microssatélites RM254, RM206 e RM473E.

Cultivares	RM254	RM206	RM473E
Epagri 107	x	x	
Epagri 108			
Epagri 109			
Híbrido MH-2003			
IAC 25	x		
Iacuba 20			
Icta Quirigua	x	x	
IR36			
IR56			
IR60	x		
Irga 11347-1-4-1-4			
Irga 1555-24-1-2-2			
Irga 1565-47-1F-1-8-3			
Irga 1572-11-1F-1-4-4			
Irga 1572-2-2-4-3	x		
Irga 1572-2-2-4-3			
Irga 1572-4-1-5-3-A			
Irga 1573-4-CA-5			
Irga 1581-8-5-1-2			
Irga 1598-3-2F-1-3-1			
Irga 1598-7-2F-1-3-2			
Irga 1732-1T-MF-2-4			
Irga 1832-5-5C-MF-2-2			
Irga 1832-7-2C-1MF-2-1			
Irga 1841-2-12C-3-MF-2-2			
Irga 2003-2-8C-MF-4-3			
Irga 318-11-6-8-2-A1-2	x		
Irga 369-31-2-3F-A1-1		x	
Irga 370-38-1-2-1F-2D	x		
Irga 408			
Irga 416 (Precoce)			
Irga 417	x		
Irga 418			
Irga 419			
Irga 421	x		

Continuação

Apêndice 1. Cultivares e linhas avançadas de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL C104LAC após a amplificação com os marcadores microssatélites RM254, RM206 e RM473E.

Cultivares	RM254	RM206	RM473E
Irga 440-22-3-6-2F-2			
Irga 440-22-4-2-2F-1-C			
Irga 440-49-2-2-5			
Irga 653-3-13-1A	x		
Irga 653-7-3-F-1	x		
Irga 976-2-3-1F-3-2	x		
Irga1074-8-4-1F-1-1			
Ita 324			
Ita 418			
Japonês Pragana			
Javaé	x		
Jodon			
Koshihikari			
Mars			
Metica 1	x		
Molo			
NIL C101A51	x		
NIL C101LAC	x		
NIL C101PKT	x		x
NIL C104LAC	x	x	x
NIL C104PKT	x		x
NIL C105TTP	x		x
NIL F124-1			
NIL F128-1	x		
NIL IR1529			
NIL F98-7			
NP 125			
Oryzica Llanos 5			
Perla			
Rio Paraguaio			
SC 126			
Shao Thiao Tsao			
Zenith CNA 4576		x	

Apêndice 2. Cultivares e linhas avançadas de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 após a amplificação com os marcadores microssatélites RM210, RM223 e RM556.

Cultivares	RM210	RM223	RM556
368060-M(Guatemala)			X
Agulha Bico Torto			
Alan			
Amistad 82	X	X	X
AY 223			
Bertone			
BG 1639			X
Blue Belle			
BR Irga 409			X
Canastra			
Capi-93			X
CT10471-5-5I-1I-3I-MI-6P		X	X
CT10556-CA-11-M-M			
CT10588-CA-1-M			
CT12245-26-2-4P-1P			X
CT12249-2-26-2-M			X
CT12376-22-1P-M-3		X	X
CT12475-10-M-4	X	X	X
CT12572-4-M-3			X
CT6741-F2-CA-22			
CT6742-10-10-1-M-M-M			
CT8248-1-12-1P-M-5P			X
CT9145-4-21-5P-1-MI-F8-3P			X
CT9841-5-2-1P-2I-2I-M			X
CT9895-5-3-M-4-1P			
Cuiabana			X
Cypress			
Dawn			
Drew			
EEA 404			
EEA 405			
EEA 406			
El Pazo 144			
El Pazo 227			
Embrapa 6 Chuí			
Epagri 106			
Epagri 107			

Continuação

Apêndice 2. Cultivares e linhas avançadas de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 após a amplificação com os marcadores microssatélites RM210, RM223 e RM556.

Cultivares	RM210	RM223	RM556
Epagri 108			
Epagri 109			X
Híbrido MH-2003	X		X
IAC 25			
Iacuba 20		X	X
Icta Quirigua			X
IR36			X
IR56		X	X
IR60			X
Irga 11347-1-4-1-4			X
Irga 1555-24-1-2-2			X
Irga 1565-47-1F-1-8-3			X
Irga 1572-11-1F-1-4-4			
Irga 1572-2-2-4-3			X
Irga 1572-2-2-4-3			
Irga 1572-4-1-5-3-A			X
Irga 1573-4-CA-5			X
Irga 1581-8-5-1-2			
Irga 1598-3-2F-1-3-1			
Irga 1598-7-2F-1-3-2			X
Irga 1732-1T-MF-2-4			
Irga 1832-5-5C-MF-2-2			X
Irga 1832-7-2C-1MF-2-1			X
Irga 1841-2-12C-3-MF-2-2			X
Irga 2003-2-8C-MF-4-3			X
Irga 318-11-6-8-2-A1-2			X
Irga 369-31-2-3F-A1-1			X
Irga 370-38-1-2-1F-2D			
Irga 408			X
Irga 416 (Precoce)			X
Irga 417			
Irga 418			X
Irga 419			
Irga 421	X		X
Irga 440-22-3-6-2F-2			

Continuação

Apêndice 2. Cultivares e linhas avançadas de arroz que apresentam o mesmo perfil eletroforético da NIL IR1529 após a amplificação com os marcadores microssatélites RM210, RM223 e RM556.

Cultivares	RM210	RM223	RM556
Irga 440-22-4-2-2F-1-C			X
Irga 440-49-2-2-5			
Irga 653-3-13-1A			X
Irga 653-7-3-F-1			X
Irga 976-2-3-1F-3-2			
Irga1074-8-4-1F-1-1			X
Ita 324			X
Ita 418	X	X	X
Japonês Pragana			
Javaé			X
Jodon			
Koshihikari			
Mars			
Metica 1			
Molo			
NIL C101A51	X		X
NIL C101LAC			
NIL C101PKT			X
NIL C104LAC	X		X
NIL C104PKT			X
NIL C105TTP			X
NIL F124-1			
NIL F128-1	X		
NIL F98-7	X		
NIL IR1529	X	X	X
NP 125			
Oryzica Llanos 5			X
Perla		X	X
Rio Paraguaio			
SC 126			X
Shao Thiao Tsao			
Zenith CNA 4576			X