

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

DIVERSIDADE DE PATÓTIPOS E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE  
*Magnaporthe oryzae* NO SUL DO BRASIL

Leilane Silveira D'ávila  
Engenheira Agrônoma/UNIPAMPA

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Fevereiro de 2014

**RESERVADA PARA A FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO**

Aos meus pais, *Romildo e Rejane*, com todo amor e carinho dedico este trabalho, pelo incentivo durante toda vida.

As minhas irmãs, Fabiane e Beatriz pelos momentos de alegria nesta caminhada.

*DEDICO*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Emerson M. Del Ponte, pela oportunidade, amizade e dedicação nos anos que fiz parte do Laboratório.

À minha coorientadora, Dra. Marta Cristina Fillipi, pela atenção, carinho e ensinamentos nos oito meses que estive na Embrapa Arroz e feijão.

Ao Dr. Fábio Gonçalves, pela colaboração na pesquisa e auxílios nas análises de dados e interpretação dos resultados.

Aos colegas do Laboratório, Larissa B. Gomes, Camila P. Nicolli, PierriSpolti, Paulo R. Kuhnem Jr. pela amizade e apoio nas horas mais difíceis.

Aos colegas de pós-graduação e toda equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão.

À equipe do laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão.

Aos pesquisadores Dr. Gustavo R. D. Funck (IRGA), Dr. Klaus K. Scheuermann (EPAGRI) e Dr. CleyD. Nunes (Embrapa Clima Temperado) pela colaboração no trabalho.

Por fim, à minha família pelo apoio dado e pela compreensão nos momentos de ausência.

# DIVERSIDADE DE PATÓTIPOS E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Magnaporthe oryzae* NO SUL DO BRASIL<sup>1</sup>

Autor: Leilane Silveira D'Ávila

Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte

## RESUMO

A brusone, causada por *Magnaporthe oryzae*, é a principal doença da cultura do arroz no Brasil e no mundo. O manejo efetivo da doença pode ser obtido com o uso de cultivares resistentes. A alta variabilidade genética e a capacidade de adaptação do patógeno, por pressão de seleção, no entanto, tem diminuído o tempo de vida útil de cultivares plantadas extensivamente por vários anos. Este estudo objetivou caracterizar a diversidade patogênica e a estrutura populacional de uma população contemporânea de *M. oryzae* do Sul do Brasil. Para tal, uma população de 224 isolados foi obtida de folhas e panículas sintomáticas coletadas em 17 municípios dos Estados do Rio Grande do Sul - RS (147 isolados) e Santa Catarina - SC (77 isolados) na safra 2012/13. Todos os isolados foram inoculados em uma série internacional de oito cultivares diferenciadoras e uma série brasileira de oito cultivares de arroz irrigado. Uma subamostra de 192 isolados foi submetida a genotipagem com dez marcadores microssatélites. No total, foram identificados 75 patótipos pela série internacional e 38 patótipos pela série nacional. Os dois patótipos mais prevalentes foram o IH-1 (23 isolados), encontrado somente no RS, e o BF-4 (38 isolados). Em SC, o patótipo mais prevalente foi o IB-46 (21 isolados). Já para os patótipos brasileiros, houve o predomínio do BD-15 (34 isolados) no estado do RS e BF-4 (38 isolados) em SC. Com base nos padrões gerados pelos microssatélites, os isolados foram agrupados em quatro subpopulações, ou linhagens, distintas. Duas linhagens, encontradas no RS, foram compostas uma por isolados da cultivar Puitá INTA CL e outra por isolados da cultivar Guri INTA CL. Uma terceira linhagem agrupou isolados apenas de Santa Catarina e, por último, uma linhagem agrupou isolados distribuídos nos dois estados e em diferentes cultivares. Não houve associação entre as linhagens e os patótipos brasileiros ou internacionais. O número de patótipos internacionais identificados neste estudo é o maior até então relatado em uma região produtora do Brasil. As informações geradas podem ser úteis para os programas de melhoramento na busca de fontes de resistência considerando as populações distintas nas regiões produtoras do sul do Brasil.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (56 p.) Fevereiro, 2014.

# PATHOTYPE DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF *Magnaporthe oryzae* IN SOUTHERN BRAZIL <sup>2</sup>

Author: Leilane Silveira D'Ávila

Advisor: Emerson Medeiros Del Ponte

## ABSTRACT

Blast, caused by *Magnaporthe oryzae*, is the main disease of rice in Brazil and worldwide. The disease is effectively managed with the use of resistant varieties. The high genetic variation and adaptation due to selection pressure in the pathogenic populations affects the durability of the resistance when a few and genetically uniform varieties are grown over large areas and many years. This study aimed to characterize the pathogenic diversity and population genetic structure in a contemporary population of *M. oryzae* from Southern Brazil. For such, 224 isolates were obtained from symptomatic leaves and panicles collected across 17 municipalities of Rio Grande do Sul (RS, 147 isolates) and Santa Catarina (SC, 77 isolates) states during the 2012/13 season. All isolates were inoculated in a set of eight differential international varieties and another set of eight differential Brazilian varieties or irrigated rice. A subsample of 192 isolates was genotyped using ten microsatellite markers. In total, 75 and 38 pathotypes were identified based on the international and Brazilian differential sets, respectively. The most prevalent pathotypes were IH-1 (23 isolates), found only in RS, and BF-4 (38 isolates). In SC, the most prevalent pathotype was the IB-46 (21 isolates). For the Brazilian pathotypes, BD-15 was the most prevalent in RS state (34 isolates) and BF-4 was the most prevalent in SC (38 isolates). The molecular analysis showed that the microsatellites markers were highly polymorphic, revealing high variation within and among the four populations structured by cultivar and geography. Two lineages were found solely in one of two varieties: Puitá INTA CL and Guri INTA CL. A third lineage was found only for isolates from SC State. Finally, a fourth lineage was composed of isolates spread out through both states and several varieties. No association was found between the lineages and the groups of international or Brazilian pathotypes. The number of international pathotypes identified in this study is the largest reported in a production region of Brazil. The information from this study may be useful for breeding programs targeting sources of resistance taking into account the current profile of the populations of the rice blast pathogen from Southern Brazil.

---

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (56 p.) February, 2014.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Importância da cultura do arroz no mundo e no Brasil.....	3
2.2 Brusone do arroz.....	4
2.3 Sintomatologia.....	5
2.4 Biologia do patógeno .....	6
2.5 Ciclo de vida .....	7
2.6 Epidemiologia da doença.....	8
2.7 Manejo da Brusone.....	9
2.8 Variabilidade genética para patogenicidade em <i>M. oryzae</i> .....	11
2.9 Marcadores moleculares no estudo da variabilidade de <i>M. oryzae</i> .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 Área de estudo e amostragem .....	17
3.2 Obtenção e purificação dos isolados .....	17
3.3 Conservação dos isolados .....	18
3.4 Experimentos para identificação de patótipos.....	20
3.5 Análise por microssatélites e estrutura populacional .....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1 Diversidade e prevalência de patótipos .....	28
4.2 Variabilidade molecular por marcadores microssatélites .....	36
4.3 Relação entre patótipos dominantes e linhagens .....	40
5. CONCLUSÕES.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Denominação e informações sobre as cultivares usadas como uma série padrão internacional para diferenciação de patótipos de *Magnaporthe oryzae* (Atkins *et al.*, 1967).....20
2. Denominação e informações das cultivares de arroz irrigado brasileiras usadas como uma série padrão local para diferenciação de patótipos de *Magnaporthe oryzae* (Silva *et al.*,2011). .....21
3. Nomenclatura dos marcadores moleculares utilizados no estudo populacional e suas respectivas seqüências amplificadas na análise do DNA dos isolados de *Magnaporthe oryzae*. .....25
4. Concentrações dos reagentes utilizados no mix para reação de PCR dos isolados de *Magnaporthe oryzae*. .....25
5. Frequência, designação e local de origem de patótipos determinados pela série internacional de diferenciadora para uma coleção de 224 isolados de *Magnaporthe oryzae* coletados em lavouras comerciais e áreas experimentais de arroz irrigado no sul do Brasil .....33
6. Frequência, designação e local de origem de patótipos determinados pela série brasileira de diferenciadora para uma coleção de 224 isolados de *Magnaporthe oryzae* coletados em lavouras comerciais e áreas experimentais de arroz irrigado no sul do Brasil. ....34
7. Número de isolados e frequência de patótipos determinados pela série diferenciadora internacional, identificados nas 14 cultivares de origem amostradas, nos estados do RS e SC para uma coleção de 224 isolados. ....35

8. Número de isolados e frequência de patótipos determinados pela série diferenciadora brasileira identificados nas 14 cultivares de origem amostradas, nos estados do RS e SC para uma coleção de 224 isolados. ....	36
9. Matriz de distância genética <sup>1</sup> entre as quatro subpopulações de <i>Magnaporthe oryzae</i> , de acordo com 1000 permutações calculado com o software Genetix.....	39
10. Estatísticas da análise de variância molecular para a diferenciação genética entre e dentro de subpopulações de <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	39
11. Informações sobre dez locos microssatélites indicando a porcentagem de polimorfismo em cada loco entre e dentro de quatro subpopulações de um total de 224 isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i> e seus respectivos valores de FST, calculado pelo programa Alerquim.....	40

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Municípios e a respectiva região produtora onde foram amostrados panículas e folhas de arroz com sintomas de brusone para o isolamento do patógeno, durante a safra 2012/13, nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 2012/2013 .....18
2. Ilustração da câmara úmida para indução da conidiogênese em fragmentos de panícula com sintomas (A) e crescimento micelial a partir de um cultivo monoconidial de *Magnaporthe oryzae* (B). Etapas da preparação e preservação de isolados de *Magnaporthe oryzae* em papel de filtro (C, D). Porto Alegre, RS. 2012/2013. ....19
3. Etapas do experimento de patogenicidade dos isolados de *Magnaporthe oryzae* para determinação dos patótipos nas cultivares diferenciadoras: (A) Plantio das cultivares diferenciadoras; (B) Plantio das cultivares de origem; (C e D) Estágio vegetativo - V4- momento da inoculação. Porto Alegre, RS. 2012/2013. ....22
4. Etapas da inoculação com incubação das plantas acondicionadas em gaiolas mantidas em ambiente com alta umidade relativa do ar para promoção da infecção (A e B). Porto Alegre, RS. 2012/2013. ....23
5. Detalhes dos sintomas para cinco notas de uma escala descritiva para avaliação de reação de cultivares de arroz à *Magnaporthe oryzae* (Prabhu & Filippi, 1998; Pinheiro, 2010). ....24
6. Gráfico de número e frequência de patótipos baseados na série diferenciadora internacional e brasileira encontrada na coleção de 224 isolados de *M. oryzae* oriundos de lavouras de arroz irrigado do Sul do Brasil. ....30

7. Denominação e proporção dos patótipos de *Magnaporthe oryzae* isolados oriundos de dois estados do sul do Brasil e identificados pela série internacional (A) e na série nacional (B) de diferenciadoras.....31
8. Relação entre o parâmetro delta K ( $\Delta K$ ) e k segundo teste de atribuição realizado pelo software Structure 2.2, mostrando a melhor predição do número de grupos (quatro) para 192 isolados de *Magnaporthe oryzae* obtido por análise molecular com a utilização de 10 marcadores microssatélites. ....37
9. Agrupamento (cores) de isolados de *Magnaporthe oryzae*, segundo a similaridade genética determinada pelo método de estimação bayesiana segundo o programa Structure. Os 192 isolados estudados foram coletados de folhas e panículas. A cor vermelha representa linhagem B (Sul Brasileira), a cor verde a linhagem PUITA, a cor azul a linhagem GURI e a cor amarela a linhagem SC (Santa Catarina). ....37
10. Gráfico representativo da distância genética segundo Nei (1972) entre quatro subpopulações e seus isolados correspondentes. Eixos 1 e 2 representam medidas de distância calculadas pelo software Genetix. ....38
11. Número de isolados por patótipos internacionais mais prevalentes distribuídos em quatro linhagens agrupadas segundo análise molecular com os marcadores moleculares microssatélites em 192 isolados de *M. oryzae* Considerou-se os patótipos com 5 ou mais número de isolados. ....41
12. Número de isolados por patótipos brasileiros mais prevalentes distribuídos em quatro linhagens agrupadas segundo análise molecular com os marcadores moleculares microssatélites em 192 isolados de *M. oryzae*. Considerou-se os patótipos com 5 ou mais número de isolados. ....41

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior produção de arroz fora da Ásia (Gazzola *et al.*, 2009), estimada em 12,5 milhões de toneladas, em uma área plantada de aproximadamente 2,4 milhões de hectares (CONAB, 2014).

A produtividade dos cultivos de arroz pode ser afetada negativamente pela ocorrência de doenças, onde se destaca a brusone causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* (T.T. Hebert) M.E. Barr (anamorfo = *Pyricularia oryzae* Sacc.). Relatada em todas as áreas produtoras de arroz do mundo, especialmente no Brasil, a brusone causa danos variáveis e fortemente influenciados pelo grau de resistência das cultivares geneticamente melhoradas e pelas condições meteorológicas sazonais, podendo levar a destruição total da lavoura em cultivares suscetíveis (Prabhu *et al.*, 2002).

O manejo da brusone com uso de táticas integradas que envolvem cultivares resistentes, práticas culturais e fungicidas, quando necessários, é considerada a mais econômica e sustentável forma de controlar a doença (Filippi *et al.*, 1999; Balardin, 2003; Teng *et al.*, 1991). Dentre esses, o uso de cultivares resistentes é considerada a tática ideal e que tem levado os programas de melhoramento genético do arroz a intensificar esforços na incorporação de genes de resistência à brusone. No entanto, a variabilidade genética de *M. oryzae* em relação à virulência tem sido a principal causa da baixa durabilidade da resistência de

cultivares baseada em genes específicos (resistência completa) (Ou, 1985; Zeigler & Correa, 2000; Prabhu & Filippi, 2006).

No Brasil a maioria dos estudos sobre monitoramento de raças e de estrutura de populações de *M. oryzae* foram conduzidos com isolados de áreas de produção do centro e do norte do Brasil (Cassetari *et al.*, 1996; Filippi *et al.*, 1999; Garrido, 2001;; Prabhu *et al.*,2002; Cornelio *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2007; Ramos, 2009; Anjos *et al.*; 2009; Dias Neto *et al.*, 2010; Gonçalves, 2013).Nos estados do Sul do Brasil, onde se concentra a maior parte das áreas de produção do país, os estudos mais recentes de caracterização patogênica e molecular de *M. oryzae* foram conduzidos com populações amostradas em levantamentos conduzidos há pelo menos uma década atrás (Scheuermann, 2002; Maciel *et al.*, 2004) ou com um pequeno número de isolados (Gonçalves, 2013). Assim, é desconhecida a diversidade de patótipos e a estrutura das populações atuais.

Neste sentido, com uma ampla amostragem em lavouras de arroz irrigado nos estados do RS e SC, em uma safra cujas epidemias de brusone foram generalizadas, o presente estudo objetivou determinar os patótipos atualmente presentes nessas regiões com base em uma série internacional e nacional de cultivares diferenciadoras e caracterizar a diversidade genética e estrutura populacional do patógeno usando marcadores microssatélites.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância da cultura do arroz no mundo e no Brasil

O arroz (*Oryza sativa L.*), originário da Índia, é cultivado em regiões do mundo com clima subtropical e tropical (Khush, 2002). A produção de arroz no Brasil, até o final do século XIX, se dava exclusivamente em lavouras de sequeiro. Na última década do século XX surgiram às primeiras lavouras com cultivo de arroz irrigado na região Sul do Brasil e que mostraram produtividade superior ao cultivo de sequeiro (Azambuja *et al.*, 2002).

O arroz é alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas. O aumento crescente do seu consumo impõe aos setores produtivos a busca de novas áreas ou novas técnicas que possam levar ao aumento dos níveis de produtividade (IBGE, 2013).

A cadeia produtiva do arroz no Brasil mobiliza cerca de R\$ 4,0 bilhões ao ano. A produção de arroz representa 11% da produção total agrícola brasileira. A produtividade média de arroz no Brasil, ao redor de 7000 Kg/ha, está próxima da média mundial (IBGE, 2012). Estima-se que em 2015 a população mundial demandará uma produção adicional de arroz de 50 milhões de toneladas, o que equivale a aproximadamente nove por cento da atual produção mundial atual, um desafio para toda a cadeia produtiva, assim como uma demanda expressiva à pesquisa em melhoramento genético (IBGE, 2013).

Se a área cultivada for mantida nos próximos oito anos, a produtividade deverá aumentar significativamente para atender a esta demanda. Para que este patamar seja alcançado, será necessário otimizar o cultivo do cereal por meio do uso de cultivares resistentes aos estresses bióticos como as pragas, doenças e plantas daninhas, e os abióticos, como condições ambientais adversas (IRRI, 2006).

Projeções de produção e consumo de arroz no Brasil apontam para uma colheita ao redor de 14 milhões de toneladas de arroz na safra 2019/20. Tal acréscimo na produção é esperado em áreas de arroz irrigado, já que em terras altas tem se notado encolhimento das áreas de arroz no Brasil devido à menor incorporação de novas terras em áreas de fronteira agrícola e substituição por outras culturas de alto valor econômico como a soja. O caso mais típico é o estado do Mato Grosso onde a produção de arroz vem se reduzindo acentuadamente (MAPA, 2012).

## **2.2 Brusone do arroz**

A brusone é considerada a doença mais importante do arroz devido ao seu alto potencial de danos na produtividade (Ou, 1972). A sua distribuição é ampla, relatada praticamente todas as regiões onde o arroz é cultivado em escala comercial (Ou, 1985; Prabhu & Filippi, 2006; Miah *et al.*, 2013).

A severidade da doença e os danos na produtividade são variáveis em função do genótipo cultivado e dos fatores climáticos que incidem nas áreas de cultivo. Os danos provocados pela brusone decorrem da redução da área foliar fotossintetizante e no crescimento e desenvolvimento geral da planta, levando a redução do número de grãos por panícula e peso de grãos (Prabhu *et al.*, 1986; Prabhu *et al.*, 2003). Experimentos de campo no Brasil mostraram reduções de 8

a 14% no peso de grãos e esterilização de 19 a 55% das espiguetas (Bedendo & Prabhu, 1997). A doença é favorecida sob condições de alta precipitação e altos níveis de nitrogênio, já tendo sido registradas perdas totais em lavouras inteiras de arroz em ataques severos da doença (Zhou *et al.*, 2007).

### **2.3 Sintomatologia**

Os sintomas da brusone se manifestam em toda parte aérea da planta desde o estágio de plântula até a maturação de grãos. O período de maior suscetibilidade das folhas ocorre entre o 20º e o 40º dia de idade. Nessas, os sintomas iniciam-se com pequenas lesões necróticas, de cor marrom, que expandem, tornando-se elípticas, com bordo marrom e centro cinza ou esbranquiçado. Em condições favoráveis, as lesões coalescem, causando morte da folha, chegando a destruir a planta inteira. A dimensão do bordo das lesões nas folhas está diretamente relacionada com a resistência do genótipo e com as condições ambientais. Quando a doença ocorre severamente nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, o impacto é tão grande que a queima das folhas acaba por levar a morte da planta (Nutsugah *et al.*, 2008).

Nos nós, os sintomas surgem na fase reprodutiva do ciclo da cultura. A área infectada do nó torna-se escura e impede a circulação da seiva, provocando o acamamento da planta ou a quebra no local infectado. Quando ocorre nas panículas, antes da fase de enchimento de grão, a panícula inteira morre, apresentando coloração parda. Em condições de alta umidade relativa do ar o fungo esporula nas espiguetas, causando chochamento completo na fase leitosa (Prabhu *et al.*, 1995).

## 2.4 Biologia do patógeno

A brusone do arroz é causada por *Magnaporthe oryzae* (Barr.) (anamorfo = *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc.). Em estudo mais recente, Couch & Kohn (2002), sugeriram que a espécie *Magnaporthe grisea* possuía duas linhagens distintas, mas de morfologia idêntica, uma associada a *Digitaria* e outra a *Oryza sativa* e outras Poáceas. Assim, *M. grisea* causa a brusone em *Digitaria* e em trigo (Yaegashi & Udagawa, 1978) e *M. oryzae* em arroz.

A fase anamorfa *Pyricularia oryzae* pertence à classe Deuteromicetos e à ordem Monialiales. O gênero *Pyricularia* foi caracterizado por fungos de cor cinza-claros que produzem conídios em conidióforos livres e eretos (Purchio e Muchovej, 1994). Os conídios são, inicialmente, aderidos ao conidióforo por meio de uma pequena célula. Quando maduros, a célula divide-se em duas, liberando o conídio.

*M. oryzae* pertence à classe Ascomycetos, ordem Diaporthales e Família Physosporielleaceae. Os ascosporos são hialinos, fusiformes, com três septos e os ascos unitunicados. O estágio telomorfo não foi relatado em condições naturais, mas apenas com cruzamentos de isolados compatíveis em laboratório (Ou, 1985). Assim, em condições naturais, epidemias são iniciadas a partir dos esporos assexuais ou conídios (Ellis, 1971). Os conidióforos são longos, septados, raramente ramificados, simpodiais, geniculados com a parte basal do conidióforo mais larga (Xu & Xue, 2002). Os conídios são piriformes, apresentando a base arredondada e o ápice mais estreito. Normalmente, são encontrados dois septos por esporo; um ou três septos raramente são observados. O conídio é hialino e geralmente germina a partir da célula apical ou basal. O apressório é formado na extremidade do tubo germinativo. As colônias são muito variáveis quanto à densidade e a cor do micélio.

As colônias em cultura variam de ralas acotonosas e de esbranquiçadas até acinzentadas escuras, conforme o meio de cultura e característica intrínseca ao isolado (Valent & Chumley, 1991). Durante seu amadurecimento, ainda ligado ao conidióforo, o conídio aumenta de tamanho e libera uma gota de mucilagem, cuja função é permitir a aderência do conídio a qualquer superfície, mesmo umedecida (Prabhu & Filippi, 2006). A conidiogênese é holoblástica e inicia-se com a produção de um conidióforo através de estômatos, ou pela erupção direta do tecido e da cutícula da planta hospedeira (Hamer *et al.*, 1988). Todas as fases do ciclo da doença, desde a germinação dos esporos até o desenvolvimento das lesões, são fortemente influenciadas por fatores ambientais (Thomé *et al.*, 1999).

## **2.5 Ciclo de vida**

A fase patogênica do ciclo de vida do fungo inicia-se com a germinação do conídio na presença de água livre sobre a folha em período mínimo de 30 minutos. O tubo germinativo é produzido pela célula basal ou apical de um conídio, constituído por 3 células nucleadas. Enquanto o tubo germinativo é formado a partir de uma das células, em outra célula se forma apressório que se separa por um septo formado na extremidade do tubo germinativo (Hamer *et al.*, 1988; Howard & Valent, 1996; Prabhu & Filippi, 2006). A penetração ocorre diretamente na epiderme da folha e raramente pelos estômatos, por força mecânica e atividade enzimática (Howard, 1994) e através das reservas acumuladas no conídio (Prabhu & Filippi, 2006).

A hifa de infecção dá origem a hifas secundárias e subsequentes dentro das células da epiderme e do mesófilo, resultando na colonização do tecido invadido e na formação de lesões que já são visíveis após 72 horas. A colonização dos tecidos é facilitada por toxinas que matam as células do

hospedeiro (Bedendo, 1997). Em meio de cultura o patógeno produz uma grande quantidade de toxinas, como, por exemplo, o ácido picolínico, a piricularina, ácido piricularina, o ácido tenuzênico, coumarina e tyrosol (Valent *et al.*, 1991; Howard *et al.*, 1991; Talbot, 2003).

Aos seis dias após o início da infecção, ocorre a formação e liberação de esporos pelo vento. A liberação dos esporos ocorre em escuro, alcançam um máximo em poucas horas e praticamente cessam na alvorada. Sob condições de luz ou escuro contínuo a esporulação cai a níveis muito baixos, voltando a aumentar quando os períodos de luz e escuro novamente voltarem a se alternar (Silva & Prabhu, 2005).

## **2.6 Epidemiologia da doença**

As epidemias de brusone no campo são policíclicas e fortemente dependentes de condições meteorológicas. Em agroecossistemas de clima subtropical as epidemias podem ter de 7 a 8 ciclos por estação ou ano, enquanto que nas regiões tropicais podem ocorrer de 10 a 15 ciclos por estação, quando se inicia nos estádios iniciais da cultura (Webster, 2000).

Uma lesão pode ser produzida em um tempo médio de 6 dias após a infecção (período de incubação) e produzir 2.000 a 6.000 conídios por dia por aproximadamente 14 dias (período infeccioso) em condições de laboratório (Ou, 1985). De acordo com Urashima *et al.* (2007), a dispersão aérea é o mais importante meio de disseminação do patógeno, embora ainda seja desconhecida a distância que os esporos podem atingir a partir de uma determinada fonte de inóculo.

O molhamento da folha é essencial para a infecção. A formação de orvalho, por períodos prolongados, favorece o desenvolvimento das epidemias (Teng, 1994; Bergamim Filho *et al.*, 1995; Toledo & Escobar, 2002).

Alves & Fernandes (2006), avaliando a esporulação de *M. oryzae* em trigo observaram maior taxa de esporulação sob condições de umidade relativa do ar igual ou superior 90% e temperatura ao redor 20 °C. Temperaturas noturnas, variando de 17 a 21 °C, e diurnas, entre 25 e 30 °C são consideradas ótimas para os eventos infecção, esporulação do fungo e progresso das epidemias (Prabhu *et al.*, 2006; Ribot *et al.*, 2007).

A ocorrência de chuvas durante o enchimento dos grãos parece reduzir a severidade da brusone nas panículas. Em geral, a incidência de brusone nas panículas é menor em campos irrigados por aspersão do que naqueles sujeitos à deficiência hídrica (Fagueria *et al.*, 1995). Em arroz de sequeiro, a incidência da brusone nas folhas causa secamento mais rápido das folhas nas cultivares suscetíveis do que nas cultivares moderadamente resistentes (Silva & Prabhu, 2003).

## **2.7 Manejo da Brusone**

Para o manejo da brusone, pode-se lançar mão de métodos de controle genético, cultural, químico e biológico (Devi & Sharma, 2010). No entanto, o uso de cultivares resistentes é o meio mais eficiente e econômico para o controle da doença (Prabhu & Bedendo, 1991). A efetividade da resistência do tipo vertical, ou específica, é influenciada pela presença ou ausência de genes de avirulência no patógeno, representada pelas raças fisiológicas ou patótipos da população do fungo (Zeigler, 1997). O surgimento de novos patótipos de *M. oryzae*, em virtude da alta variabilidade genética das populações, especialmente sob pressão de

seleção, tem ocasionado a superação da resistência no hospedeiro quando essa é baseada em genes específicos. Deste modo, os programas de melhoramento genético têm procurado diversificar a base genética afim de obter uma resistência mais durável (Zeigler & Correa, 2000).

Algumas práticas culturais na cultura de arroz contribuem para o controle da doença, podendo-se citar a semeadura em época adequada conforme o zoneamento agroclimático ou quando as condições ambientais são menos favoráveis à doença (Garrido, 2001; Teng, 1994)

O uso do controle químico tem maior impacto no controle quando direcionado à aplicação de fungicidas em parte aérea, embora o tratamento de sementes com fungicidas possa reduzir o inóculo (EPAGRI, 1998). Aplicações de fungicidas são indicadas nos estágios de emborrachamento e floração em áreas com o histórico da doença, condições ambientais favoráveis a doença e cultivar suscetível (Dutta *et al*, 2012). Para as condições ambientais e de cultivo da região sul do Brasil, onde o arroz é cultivado em sistema irrigado e a incidência da doença é menor do que nas regiões central e norte do Brasil, a aplicação de fungicidas é realizada entre os estádios de emborrachamento e pleno florescimento, objetivando o controle da brusone que ocorre nas panículas (SOSBAI, 2013). Em Santa Catarina, com a disponibilização de cultivares de arroz de alto rendimento (Vieira *et al.*, 2007) e a melhoria no nível tecnológico dos produtores, tem sido verificado um aumento na utilização de fungicidas, que em muitos casos são aplicados de forma inadequada e desnecessária (Scheuermann & Eberhardt, 2011). Além disso, apesar de existirem 31 fungicidas registrados para o controle da brusone na cultura do arroz (Agrofit, 2009), observa-se que um número restrito de produtos é utilizado, sendo na maioria fungicidas com sítio específico de ação como triazóis e estrobilurinas (Scheuermann & Eberhardt,

2011). Fungicidas com essas características, se utilizados de forma continuada para o controle de um patógeno com elevada variabilidade genética, como é o caso de *M. oryzae*, pode resultar na seleção de isolados resistentes (Adame & Koller, 2003). Estudo recente, em Santa Catarina, mostrou efeito satisfatório no controle da doença com duas aplicações de misturas comerciais dos fungicidas triazóis e estrobilurinas, realizadas nos estádios de emborrachamento e pleno florescimento. Os fungicidas propiconazol + trifloxistrobina, tebuconazol + trifloxistrobina, a mistura em tanquetriciclazol + tebuconazol, e a sucessão triciclazol /tebuconazol + trifloxistrobina proporcionam eficiência de controle acima de 90% da brusone de panículas (Scheuermann & Eberhardt, 2011).

## **2.8 Variabilidade genética para patogenicidade em *M.oryzae***

Populações patogênicas de *M. oryzae* ao redor do mundo têm mostrado altos níveis de variabilidade genética, possivelmente devido a ocorrência de ciclo parassexual e mutação dos genes de avirulência para virulência (Ou, 1985). Assim, novos patótipos podem surgir e aumentar em frequência na população e superar a resistência de cultivares. Portanto, o conhecimento sobre a diversidade genética e prevalência de patótipos de *M. oryzae* em áreas produtoras é essencial em uma estratégia de melhoramento genético visando resistência à brusone (Jeon *et al.*, 2008; Ballini *et al.*, 2008).

A metodologia utilizada para a determinação dos patótipos é realizada em condições controladas de casa vegetação, utilizando as oito diferenciadoras internacionais propostas por Atkins *et al.* (1967), das quais seis apresentam genes de resistência conhecidos, (Raminad, Zenith – *Pi-a* e *Pi-z*, NP 125, Usen – *Pi-a*, Dular - *Pi-k*, Kanto 51 - *Pi-k*, Sha-tiao-tsao - *Pi-k<sup>s</sup>* e Caloro - *Pi-k<sup>s</sup>*). Assim, de acordo com as reações destas cultivares aos isolados monospóricos estudados.

Assim, podem ser identificados um máximo de 256 patótipos de *M. oryzae* distribuídos em nove grupos distintos: IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IH, II.

A série de diferenciadoras internacionais de patótipos pode não revelar diferenças importantes na patogenicidade em populações regionais. Assim, Silva *et al* (2011), propuseram oito cultivares diferenciadoras brasileiras adicionais para cultivares de arroz irrigado (BRS Jaburu, BRS Taim, BRS Biguá, BR IRGA-417, Epagri 109, Javaé, Metica-1 e Supremo). Os patótipos brasileiros foram prefixados com a letra “B” em substituição à letra “I” ficando os grupos designados como BA, BB, BC, BD, BE, BF, BG, BH e BI.

No Brasil, os primeiros estudos detalhados de variabilidade genética em populações de *M. oryzae* enfocaram na identificação e frequência dos patótipos e suas respectivas compatibilidades com genes de resistência nas cultivares comerciais (Prabhu & Filippi, 1999), uma vez que mudanças na frequência de patótipos virulentos ao longo dos anos, que resultam em quebra de resistência das cultivares, são de ocorrência comum (Ou, 1980; Ribeiro, 1987). Os níveis de diversidade de patótipos podem variar entre regiões geográficas e anos, além de serem influenciados pela amplitude da amostragem da população analisada (anos, cultivares, locais, etc.) (Prabhu & Filippi, 1999).

Recentemente, no estado do Tocantins, um estudo com 479 isolados coletados em viveiros e parcelas armadilhas em campos comerciais, na safra 2007/08 identificou 61 patótipos pertencentes a seis (IA a IG) grupos (Dias Neto *et al.*, 2010). Esse foi o primeiro relato da ocorrência da maioria dos grupos internacionais de patótipos em uma pequena área geográfica na mesma safra, representando uma alta variabilidade genética populacional e confirmando relato anterior na mesma região onde foram identificadas 45 raças (Anjos *et al.*, 2009). Dias Neto *et al.* (2010) sugeriram que as novas áreas de plantio de arroz no centro

do Brasil, especialmente em Tocantins, constituem *hotspots*, ou seja, regiões com alta diversidade de patótipos, o que explicaria a baixa durabilidade da resistência de novas cultivares nessa região, estimada em dois a três anos (Santos *et al.*, 2003; Rangel *et al.*, 2006; Prabhu e Filippi, 2006).

De fato, a brusone ocorre com maior frequência e em níveis severos nas áreas orizícolas do centro do Brasil do que nas áreas irrigadas do sul do Brasil o que pode estar relacionado à maior diversidade de patótipos associado com as condições ambientais mais favoráveis.

Os estudos mais antigos no Brasil e que relatam elevada diversidade de patótipos datam de meados das décadas de 1970 e de 1980 no sul do Brasil onde, em populações de isolados coletados em períodos de 10 anos (Ribeiro, 1980) e sete anos (Ribeiro & Terres, 1987), em diferentes locais e cultivares, foram identificados 26 e 24 patótipos distribuídos em 9 grupos (IA-IH, HH-1), respectivamente. Este resultado mostrou uma alteração na prevalência de patótipos ao longo dos anos possivelmente sob a influência de pressão de seleção.

No entanto, em outros estudos no Brasil, a diversidade de patótipos relatada foi relativamente menor. Em Mato Grosso, Cassetari *neto* (1996) identificou, em 11 isolados de *M. oryzae*, a presença de 4 patótipos do grupo IB. Em Minas Gerais, Cornelio *et al.*, (2003), identificaram 14 patótipos em 138 isolados de *M. oryzae*. Em Tocantins, em uma coleção de 53 isolados de duas cultivares na safra 1998/99 foram identificados 5 patótipos, todos do grupo IB (Prabhu *et al.*, 2002). Em Santa Catarina, foram identificados 6 patótipos em três grupos (IA, IB e II) em 28 isolados de lavouras de 12 municípios e da estação experimental em Itajaí (Scheuermann, 2004). No Rio Grande do Sul, entre as safras de 1996 a 2001, foram identificados 7 grupos de virulência com base na

inoculação de 51 isolados em seis linhas isogênicas, coletados em 25 genótipos de arroz em 12 municípios do Estado do RS (Maciel *et al.*, 2004).

## **2.9 Marcadores moleculares no estudo da variabilidade de *M.oryzae***

A caracterização da variabilidade molecular juntamente com a análise da diversidade de patótipos de uma população regional, permite detectar mudanças na frequência dos genes de avirulência, ou dos marcadores à eles ligados, elegendo assim os possíveis genes de resistência que devem ser incorporados às novas cultivares a serem plantadas na mesma região (Kang & Lee, 2000).

A variabilidade genética e a estrutura populacional de *M. oryzae* tem sido inferida por marcadores moleculares do tipo RFLP, RAPD, Rep-PCR e microssatélites (Williams *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1991; Romão & Hamer, 1992; Zeigler *et al.*, 1994; Roumen *et al.*, 1997; George *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2000; Maciel *et al.*, 2004; Andreit *et al.*, 2007; Consolo *et al.*, 2008; Tharreau *et al.*, 2013). Nesses estudos, isolados que apresentam um padrão semelhante em determinadas regiões genômicas compõem grupos distintos, ou linhagens, determinados por índices estatísticos de similaridade (Chadha & Gopalakrishna, 2005).

Apesar de um estudo ter estabelecido uma relação consistente entre as linhagens, inferidas pelo marcador MGR 586 e os grupos de patótipos (Levy *et al.*, 1991), a maioria dos estudos mostraram variada virulência de isolados de linhagens distintas ou dentro de uma mesma linhagem (Zeigler *et al.*, 1994). No Brasil, dois estudos que utilizaram os marcadores do tipo rep-PCR também evidenciaram a falta de relação entre linhagens e patótipos (Filippi *et al.*, 2002; Maciel *et al.*, 2004), mostrando que esses marcadores não foram preditivos da variabilidade patogênica. Também no Brasil, o uso do marcador MGR 586

permitiu identificar algumas linhagens relacionadas com grupos de patótipos em isolados obtidos de duas cultivares (Filippi *et al.*, 1999).

Com o sequenciamento do genoma de *M. oryzae* (Dean *et al.*, 2005), foram disponibilizadas novas fontes de marcadores microssatélites para serem usados na construção de mapas genéticos.

Inúmeros autores têm sugerido o uso de marcadores microssatélites como uma alternativa eficiente para caracterizar a variabilidade genética em *M. oryzae* ao redor do mundo (Kaye *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004; Chada *et al.*, 2005; Karaoglu *et al.*, 2005). Kaye *et al.* (2003) identificaram marcadores microssatélites capazes de integrar um mapa genético de ligação elaborado a partir de uma progênie segregante oriunda do cruzamento de isolados de *M. oryzae*.

Considera-se, ainda, que as vantagens no uso dos marcadores microssatélites se devem à sua natureza multialélica, transmissão codominante, fácil detecção por PCR, relativa abundância, extensiva cobertura do genoma e necessidade mínima de DNA para realização da análise genética (Garrido, 2001; Zane *et al.*, 2002). Além disso, o genoma de *M. oryzae* foi um dos mais abundantes em seqüências microssatélites comparado com outras espécies fúngicas (Karaoglu *et al.*, 2005).

A análise de isolados de *M. oryzae* obtidos da cultivar Metica-1, utilizando Rep-PCR com dois primers (Pot-2) revelou a ocorrência de seis grupos de linhagens, as quais não mostraram uma relação entre a virulência dos isolados e o agrupamento genético (Filippi *et al.*, 2002). Estes resultados indicaram que a variabilidade destas populações, no que diz respeito a patogenicidade, não é devidamente monitorada ao se adotar os marcadores até então disponíveis. Mesmo assim, uma análise de estrutura gênica, de uma população de *M. oryzae*, utilizando-se o marcador MGR 586, mostrou que os isolados de CICA 8 e Metica-

1 pertencem a duas linhagens distintas, BZ-A e BZ-19, respectivamente, indicando alta especialização dos isolados às cultivares suscetíveis no campo (Filippi *et al.*, 1999), e que em situações como esta, a sonda MGR 586 permitiu agrupamentos altamente relacionados com a patogenicidade.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Área de estudo e amostragem**

Durante o período da safra 2012/13, entre os meses de dezembro a fevereiro, foram feitas visitas à lavouras comerciais e áreas experimentais de arroz irrigado, para coleta de material (folhas ou panículas sintomáticas) e recebidas amostras de colaboradores. As amostras obtidas, em um total de 69 (61 das visitas e oito enviadas por colaboradores) foram provenientes de 17 municípios, sendo cinco do estado de Santa Catarina e 12 do estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). Durante as visitas foram coletadas folhas e/ou panículas, com sintoma. Para cada amostra foram disponibilizadas informações sobre a cultivar, município e data da amostragem.

#### **3.2 Obtenção e purificação dos isolados**

A esporulação do patógeno no material sintomático foi realizada em condições de câmara úmida, após a lavagem prévia do material vegetal em água corrente e desinfestação com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 0,2%.

O material foi incubado em placas de Petri recobertas por papel de filtro e algodão embebidos em água esterilizada. Nesse ambiente úmido, com temperatura de aproximadamente 27 °C, em torno de 24 horas ocorre à formação de conídios (Figura 2 a).

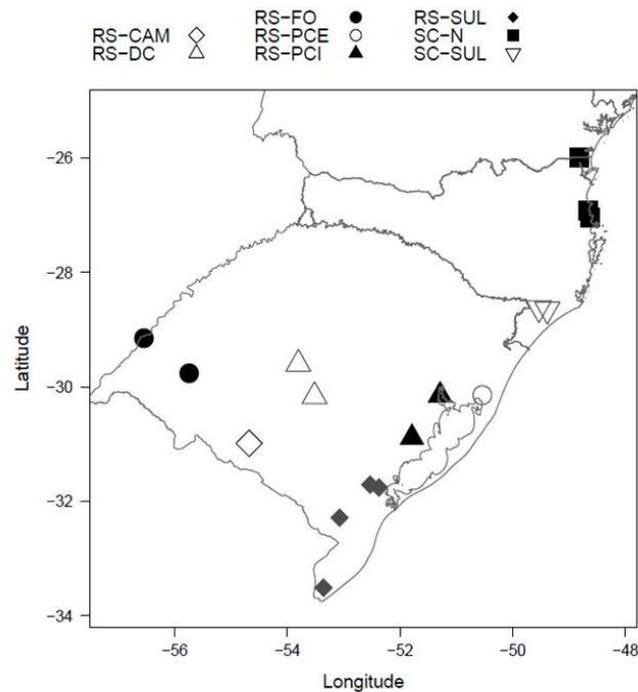


FIGURA 1. Municípios e a respectiva região produtora onde foram amostradas panículas e folhas de arroz com sintomas de brusone para o isolamento do patógeno, durante a safra 2012/13, nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 2012/2013.

Os conídios observados em microscópio estereoscópico foram transferidos diretamente para a superfície de placas de Petri contendo meio de ágar-água. Os conídios foram espalhados e isolados individualmente. Com auxílio de bisturi esterilizado, blocos de ágar contendo um único conídio foram transferidos para outra placa de Petri contendo o meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA), acrescentado de antibiótico tetraciclina  $0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 2 b).

### 3.3 Conservação dos isolados

Os isolados purificados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA e papel de filtro (cortado em quadrados de aproximadamente

0,5 cm<sup>2</sup>) esterilizado sobre o meio de cultivo. Após a colonização do papel, este foi transferido para a placa de Petri vazia e esterilizado, para secagem lenta em estufa sob temperatura variando entre 28-30 °C por 10 dias. Os fragmentos do papel inoculado foram armazenados em envelopes de papel-manteiga ou tubos criogênicos de 2mL previamente esterilizados (Valent *et al.*, 1986).

Todo o procedimento foi executado sob condições assépticas, utilizando-se material esterilizado, em ambiente de câmara de fluxo laminar (Figura 2C e 2D). Os envelopes ou tubos criogênicos contendo isolados foram devidamente identificados e armazenados em frascos de polipropileno contendo sílica gel e colocados em freezer sob temperatura de aproximadamente -10 °C.

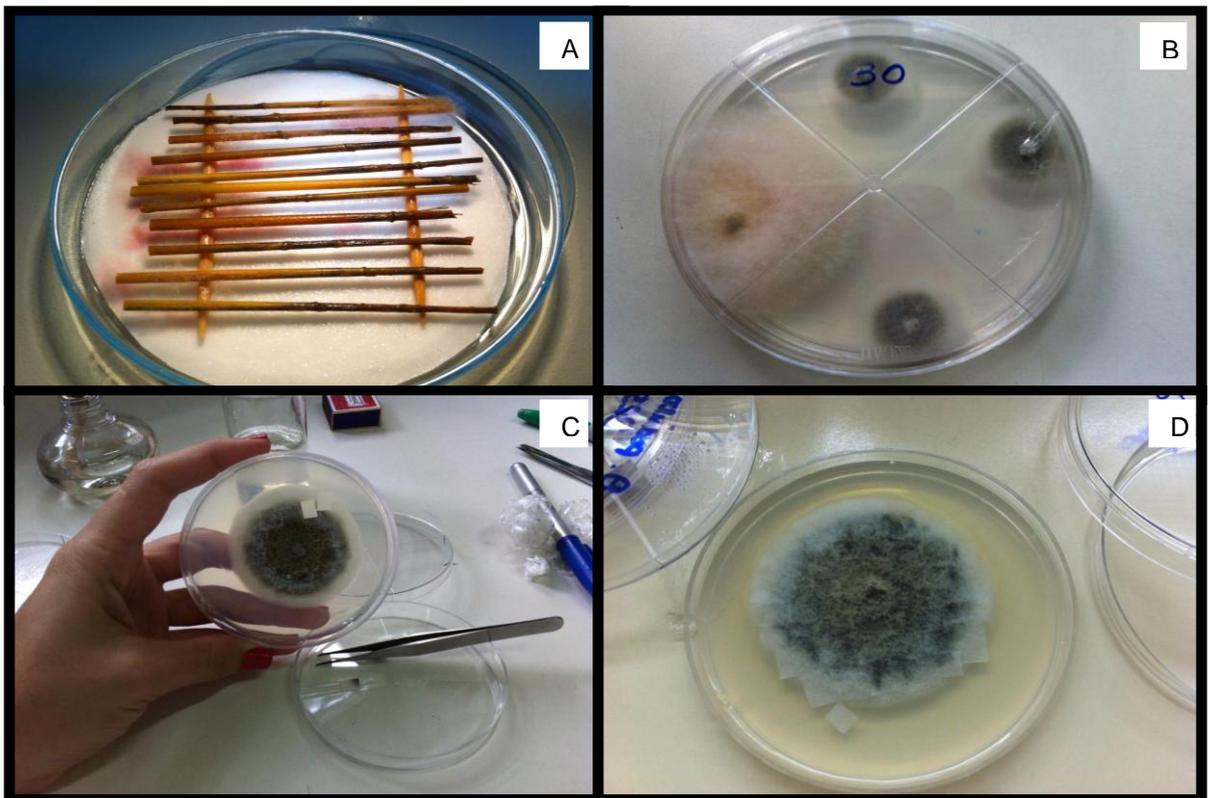


FIGURA 2. Ilustração da câmara úmida para indução da conidiogênese em fragmentos de panícula com sintomas (A) e crescimento micelial a partir de um cultivo monoconidial de *Magnaporthe oryzae* (B). Etapas da preparação e preservação de isolados de *Magnaporthe oryzae* em papel de filtro (C, D). Porto Alegre, RS. 2012/2013.

### 3.4 Experimentos para identificação de patótipos

As sementes de arroz das séries diferenciadoras foram semeadas em bandejas plásticas (15 x 30 x 10 cm) contendo 3 kg de solo adubado com NPK (5g de 5-30-15 + Zn e 3g de sulfato de amônio por 3 kg de solo). Foram realizados plantiossemanais de uma bandeja, por gaiola plástica, com um conjunto de 16 cultivares, as diferenciadoras internacionais (Tabela 1) e nacionais (Tabela 2). Em copos plásticos de 500 mL foram semeadas as cultivares de origem dos isolados. Aproximadamente 15 sementes de cada cultivar foram depositadas em cada extremidade do sulco (Figura 3a).

TABELA 1. Denominação e informações sobre as cultivares usadas como uma série padrão internacional para diferenciação de patótipos de *Magnaporthe oryzae* (Atkins *et al.*, 1967).

<b>Cultivar</b>	<b>Origem</b>	<b>Gene de resistência</b>	<b>Grupo</b>
RaminadStd	Filipinas	Desconhecido	A
Zenith	E.U.A	<i>Pi-a</i> e <i>Pi-z</i>	B
NP 125	Índia	Desconhecido	C
Usen	China	<i>Pi-a</i>	D
Dular	Paquistão	<i>Pi-k</i>	E
Kanto 51	Japão	<i>Pi-k</i>	F
Shao-tiao-tsao	China	<i>Pi-k<sup>s</sup></i>	G
Caloro	E.U.A	<i>Pi-k<sup>s</sup></i>	H

Aos 21 dias após plantio, as bandejas contendo as cultivares foram transferidas para inoculação em gaiolas (Figura 3c). Em cada experimento as diferenciadoras eram inoculadas com 20 a 40 isolados, o que resultou em sete experimentos conduzidos para inocular os 224 isolados. Fragmentos de micélio

de *M.oryzae* previamente crescidos em BDA foram transferidos para meio de aveia (50 g de aveia, 20 g de dextrose, 20 g de Agar, 1 L de água destilada) e mantidos sob luz artificial por 14 dias.

TABELA 2. Denominação e informações das cultivares de arroz irrigado brasileiras usadas como uma série padrão local para diferenciação de patótipos de *Magnaporthe oryzae* (Silva et al ,2011).

<b>Cultivar</b>	<b>Grupo</b>
BRS Jaburu	A
BRS Taim	B
BRS Biguá	C
BR Irga 417	D
Javaé	E
Epagri 109	F
Metica1	G
Supremo	H

A esporulação foi estimulada removendo-se o micélio do fungo com o auxílio de um bastão de vidro e mantidos novamente sob luz artificial com as placas de Petri descobertas. Os conídios foram coletados com água destilada autoclavada e a suspensão foi filtrada. A concentração da suspensão de conídios foi aferida em câmara de Neubauer e ajustada para concentração de conídios  $3 \times 10^5$  conídios. mL<sup>-1</sup>. A inoculação foi feita pela pulverização de uma suspensão padronizada de conídios ( $3 \times 10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>) aos 21 dias após o plantio (Figura 4).

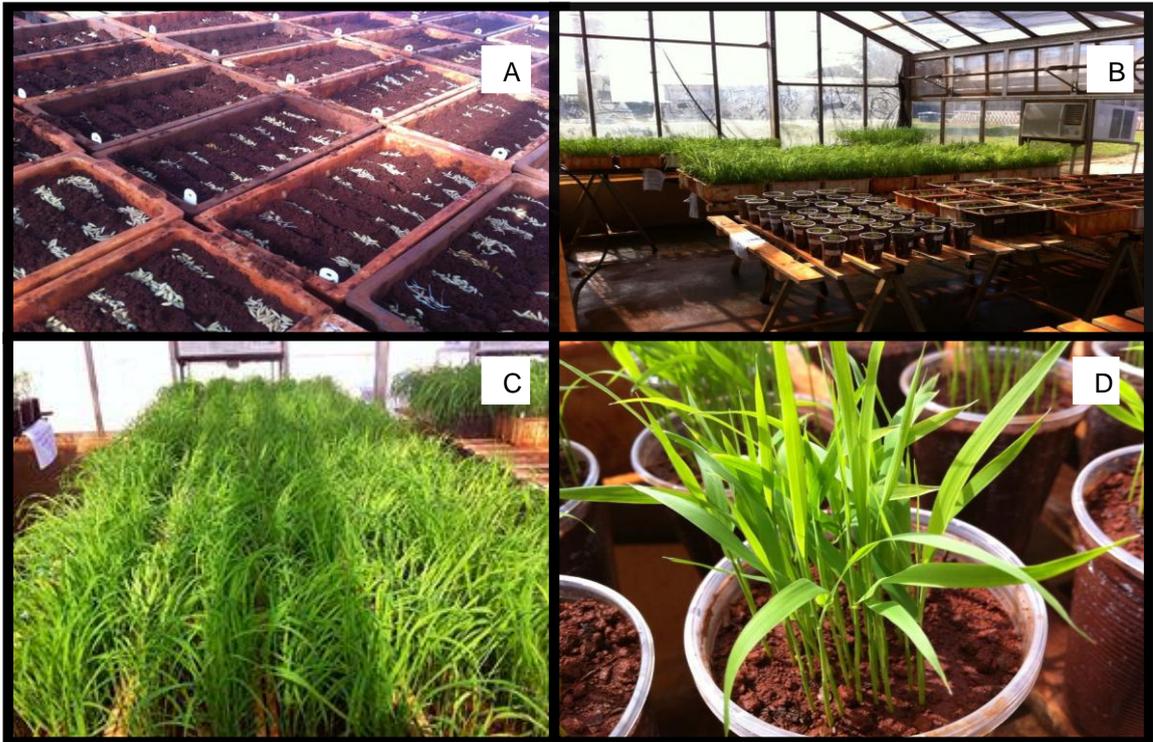


FIGURA 3. Etapas do experimento de patogenicidade dos isolados de *Magnaporthe oryzae* para determinação dos patótipos nas cultivares diferenciadoras: (A) Plantio das cultivares diferenciadoras; (B) Plantio das cultivares de origem; (C e D) Estágio vegetativo - V4- momento da inoculação. Porto Alegre, RS. 2012/2013.

O procedimento de pulverização deve ser continuado até que as plantas fiquem totalmente recobertas por gotículas de suspensão do inóculo (Prabhu & Filippi, 2006).

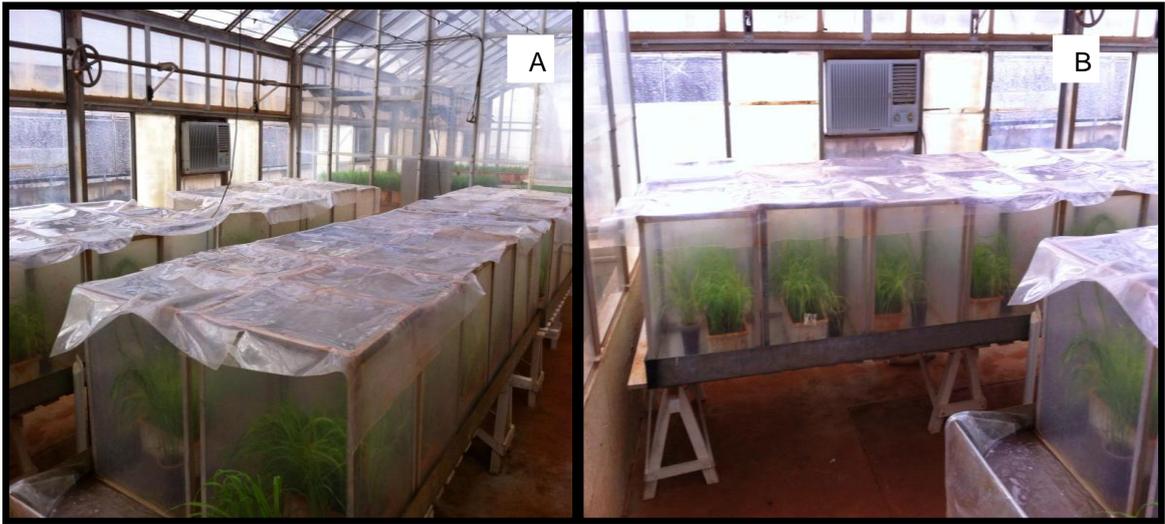


FIGURA 4. Etapas da inoculação com incubação das plantas acondicionadas em gaiolas mantidas em ambiente com alta umidade relativa do ar para promoção da infecção (A e B). Porto Alegre, RS. 2012/2013.

Aos nove dias após a inoculação a avaliação foi feita visualmente nas folhas inoculadas utilizando-se uma escala descritiva de notas (0 a 9), atribuindo-se uma das cinco notas da escala com base na observação do tipo de reação/lesão presente nas folhas (Figura 5). De acordo com essa metodologia, plantas com notas de 0 a 3 foram consideradas como resistentes ou incompatíveis (R) e aquelas com notas de 4 a 9 foram consideradas suscetíveis ou compatíveis (S) (Prabhu & Filippi, 2006). No caso do experimento em que se utilizaram cinco repetições, quando houveram plantas com status R ou S para o mesmo isolado, considerou-se aquela com a maioria, no caso três plantas.

O patótipo foi identificado com base na sequência de valores binários (S ou R) determinadas para cada uma das diferenciadoras internacionais, seguindo-se a chave proposta por Ling & Ou (1969) e Prabhu & Filippi (2006), para as séries de padrão internacional e brasileiro, respectivamente.



FIGURA 5. Detalhes dos sintomas para cinco notas de uma escala descritiva para avaliação de reação de cultivares de arroz à *Magnaporthe oryzae* (Prabhu & Filippi, 1998; Foto :Pinheiro, 2010).

### 3.5 Análise por microssatélites e estrutura populacional

Para extração de DNA genômico dos isolados adaptou-se um protocolo disponível na literatura (Dellaporta, 1983). Os isolados purificados e conservados no papel de filtro foram reativados por cultivo em meio BDA por sete dias. Em seguida, a massa micelial foi retirada sendo procedidas as etapas do protocolo, as modificações realizadas foram à realização de lavagens com álcool 70 % e absoluto ao final do processo de extração. Após a secagem do DNA, ele é ressuspenso em água e sua concentração estimada através de Nanodrop e ajustada para 30 ng/ $\mu$ L. Foram utilizados dez marcadores microssatélites (Tabela 3) independentes (não ligados), sendo três em cada cromossomo, de acordo com informações disponíveis em bases genômicas abertas ([www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/)). As reações de PCR foram preparadas conforme o kit Qiagen® Multiplex PCR (Tabela 4).

TABELA 3. Nomenclatura dos marcadores moleculares utilizados no estudo populacional e suas respectivas seqüências amplificadas na análise do DNA dos isolados de *Magnaporthe oryzae*.

Primers	Tamanho	Forward	Reverse
Pyrms409-410	128-175	TCCCAGTACTTGCCCATCTC	ATCTCATATCCGTCGGTCGT
Pyrms233-234	242-272	TGAGATGGACCGCATGATTA	TTGATGGCAGAGACATGAGC
Pyrms657-658	153-183	ATCAGTCGAACCCACAAAGC	ATGTGTGGACGAACCAGTCC
Pyrms077-078	186-216	AGGCTCTCTGCCTACGAAGT	GCTTTTCGGCAAGCCTAATC
Pyrms533-534	232-282	CTTATCGGGAGGTGCAGAAG	GACGGCATACTGCATACGTG
Pyrms607-608	260-320	CCCAAGCTCCATAATACGCTAC	TCCGAGACTCTTTGGATAGCAC
Pyrms063-064	143-183	TTGGGATCTTCGGTAAGACG	GCCGACAAGACACTGAATGA
Pyrms319-320	261-321	TAAGACCACTGGCGGAATCT	GGCTTTGTCTGGTTGTACGG
Pyrms047-048	187-207	TCACATTTGCTTGCTGGAGT	AGACAGGGTTGACGGCTAAA
Pyrms505-506	262-322	GTCGTAGCACCTTTCGT	TTGTTCCCTCGTCCCATGTTT

Fonte: Adreit et al (2007)

TABELA 4. Concentrações dos reagentes utilizados no mix para reação de PCR dos isolados de *Magnaporthe oryzae*.

MIX	Concentração final	Volume por reação (µl)
Master Mix	1 x	5
Q-Solution	1 x	1
Forward	0,2 µM	0,1
Reverse	0,2 µM	0,1
H <sub>2</sub> O	-	1,8
DNA	30 ng	2
TOTAL	-	10

O programa de ciclagem térmica consistiu: 95 °C/ 15 min, seguidos de 30 ciclos de 94 °C/ 30 s, 55°C/ 3 min e 72 °C/ 3 min, e uma extensão final de 72 °C/ 3 min (Garrido, 2001). Em seguida as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (3,5%) e acrilamida desnaturante 4%, acompanhadas de padrões de tamanho com intervalos de 25 pares de bases. Os dados genotípicos foram

utilizados para inferir as subpopulações de isolados, utilizando o método bayesiano implementado no programa Structure.

O produto da reação de amplificação por PCR foi submetido a eletroforese em géis de agarose 3,5 % (17,5 g de agarose em 500 mL de TBE 0,5 x), há 90W, por 6 horas, revelação em foto documentador e posterior genotipagem.

Os géis de poliacrilamida a 6% foram submetidos a eletroforese em aparelho eletroforético modelo SA-32 (Gibco BRL), que é composto por placas de vidro com diferentes dimensões, uma de, 45cm x 40 cm e outra de 42 cm x 40cm. Para cada gel, foram adicionados 333 µl de Persulfato de Amônia 10% (APS) a 100 ml da solução de acrilamida 6%, homogeneizado distribuído entre as placas de vidro. Após a polimerização do gel, as placas foram transferidas para o aparato de eletroforese, e adicionado tampão TBE 1X (Tris, Ácido bórico, EDTA tetrassódico), até que toda a placa estivesse submersa no tampão. O pente foi retirado, e foram removidos os pequenos fragmentos de acrilamida na parte superior do gel. Posteriormente o pente foi novamente inserido entre as duas placas de vidro com os dentes em contato com o gel para marcar os poços. Em seguida, as placas foram aquecidas realizando-se uma pré-corrída do gel, sem amostras, até que fosse alcançada a temperatura de 50 °C (90 Watts).

Em cada uma das amostras foram adicionados 3 µL de tampão de carregamento e em seguida foram desnaturadas em termociclador a 95° C por 5 minutos, seguido de imersão em banho de gelo para posterior aplicação ao gel. Em cada poço foi adicionado 3 µL de cada amostra e nos poços laterais, o marcador-padrão (Ladder) 10 pb. Em seguida as amostras foram submetidas à corrente elétrica (- para +) para a separação dos segmentos amplificados. Ao final da corrida, as placas foram separadas e o gel, ainda aderido a placa foi submetido à revelação, que se inicia com a solução de fixação (Etanol+

ácidoacético - 10 min), seguida de uma lavagem em H<sub>2</sub>O (1 min), solução de oxidação (Ácido nítrico - 3 min), H<sub>2</sub>O (1 min), solução de Nitrato de Prata (30 min), H<sub>2</sub>O (1 min), solução de revelação (Carbonato de sódio+formaldeído a 37% com temperatura aproximada de 10-12°C agitando até revelar), solução Stop (Ácido acético - 5 min) e H<sub>2</sub>O (1 min). Após a revelação as placas foram submetidas a secagem, escaneamento e genotipagem.

Os segmentos amplificados foram organizados em uma planilha no formato do programa Excel, a qual foi utilizada como arquivo de entrada para os programas de análise genética. Os dados de polimorfismo de DNA para cada um dos isolados foram submetidos à análise pelo programa computacional Structure Version 2.3 (Pritchard *et. al*, 2010) para determinar estrutura populacional. A distância genética entre as populações definidas pelo Structure foi calculada com base no índice de Nei (1972) determinada com o auxílio do programa Genetix Version 4.05.2 (2004). A análise de variância molecular (AMOVA) para inferir sobre a variabilidade dentro e entre populações foi determinada pelo programa Arlequin. A AMOVA foi usada para calcular os índices de F para dados multialélicos e dois ou mais locos. Para encontrar um valor para o teste de significância (*P*-Valor), o software realiza um número pré-estabelecido de permutações, por amostragem aleatória (*bootstrapping*), dentro do nível hierárquico que está sendo testado, sendo que cada nível possui um modo diferente de permutação. No índice F<sub>ST</sub> são retirados dois alelos ao acaso da amostra, com reposição, e verifica-se se estes são idênticos, chegando a um valor P indicando as chances de este fato ocorrer, ponderado pelo número de permutações.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Diversidade e prevalência de patótipos

Do total de 224 isolados analisados, foram identificadas 73 patótipos distribuídos em sete grupos, segundo a série internacional de diferenciadoras. Esse número foi aproximadamente o dobro do número de patótipos identificadas pelo uso da série brasileira, que identificou 38 patótipos distribuídos em nove grupos. Todos os isolados inoculados nas diferenciadoras mostraram-se virulentos, confirmado pela reação de suscetibilidade na cultivar de origem inoculada no mesmo ensaio de patogenicidade.

Para ambas as séries diferenciadoras, o número de isolados em cada grupo de patótipos ou patótipos variou de um a dezenas de isolados. Os grupos de patótipos mais prevalentes na série internacional, foram o IB (29,5% dos isolados), o IA (25%) e o ID (12,5% dos isolados) (Figura 6). Já na série brasileira, os três grupos mais prevalentes foram o BD (35,2%), o BF (22,3%) e o BG (13,4%) (Figura 6).

Quanto aos patótipos mais prevalentes, com mais de nove isolados, destacaram-se segundo a série internacional: IH-1 (n=23 isolados), IB-46 (n=21), IB-45 (n=9) e IB-17 (n=9). Já na série brasileira, os patótipos mais prevalentes, com mais de 20 isolados, foram: BF-4 (n=38), BD-15 (n=34), BG-1 (n=22) e BH-1 (n=23). Dentre os 73 patótipos identificados pela série internacional 37 foram

identificados em apenas um isolado. Já dentre os 38 patótipos identificados pela série brasileira, 16 patótipos foram identificados em apenas um isolado.

A ocorrência e a frequência dos patótipos variaram conforme a região geográfica amostrada, mostrando que essas não estiveram aleatoriamente distribuídas no espaço. Dos 75 patótipos internacionais, 31,5 % foram encontrados somente no RS, 19,1% somente em Santa Catarina e 63% em ambos os estados. Para os 38 patótipos brasileiros, 60,5% foram encontrados somente no RS, 21% somente em Santa Catarina e 18,4% em ambos os estados.

O patótipo internacional mais prevalente no RS foi IH-1 (23 isolados). Já em SC o mais prevalente foi o IB 46 (21 isolados) (Figura 7A). Já para os patótipos brasileiros, houve maior prevalência do patótipo BD-15 (34 isolados) no estado do RS e do patótipo BF-4 (38 isolados) em SC (Figura 7 B).

Para os quatro patótipos mais prevalentes, identificados pela série internacional, mais de 90% dos isolados do patótipo IH-1 (10,2% do total de isolados) e do patótipo IB-17 (4% do total de isolados) foram encontradas no RS, enquanto que quase a totalidade dos patótipos IB-46 (9,3%) e IB-45 (4%), foram detectadas em SC. Dos cinco patótipos brasileiros mais prevalentes, o BD-13 (5,35% do total de isolados) e o BD-15 (15,17% do total de isolados) só ocorreram no RS, seguidos dos patótipos BG-1 (9,8% do total de isolados) e BH-1 (10,2% do total de isolados), identificados em mais de 95% dos isolados no RS. Já o patótipo BF-4 (16,9%) só foi encontrado em SC.

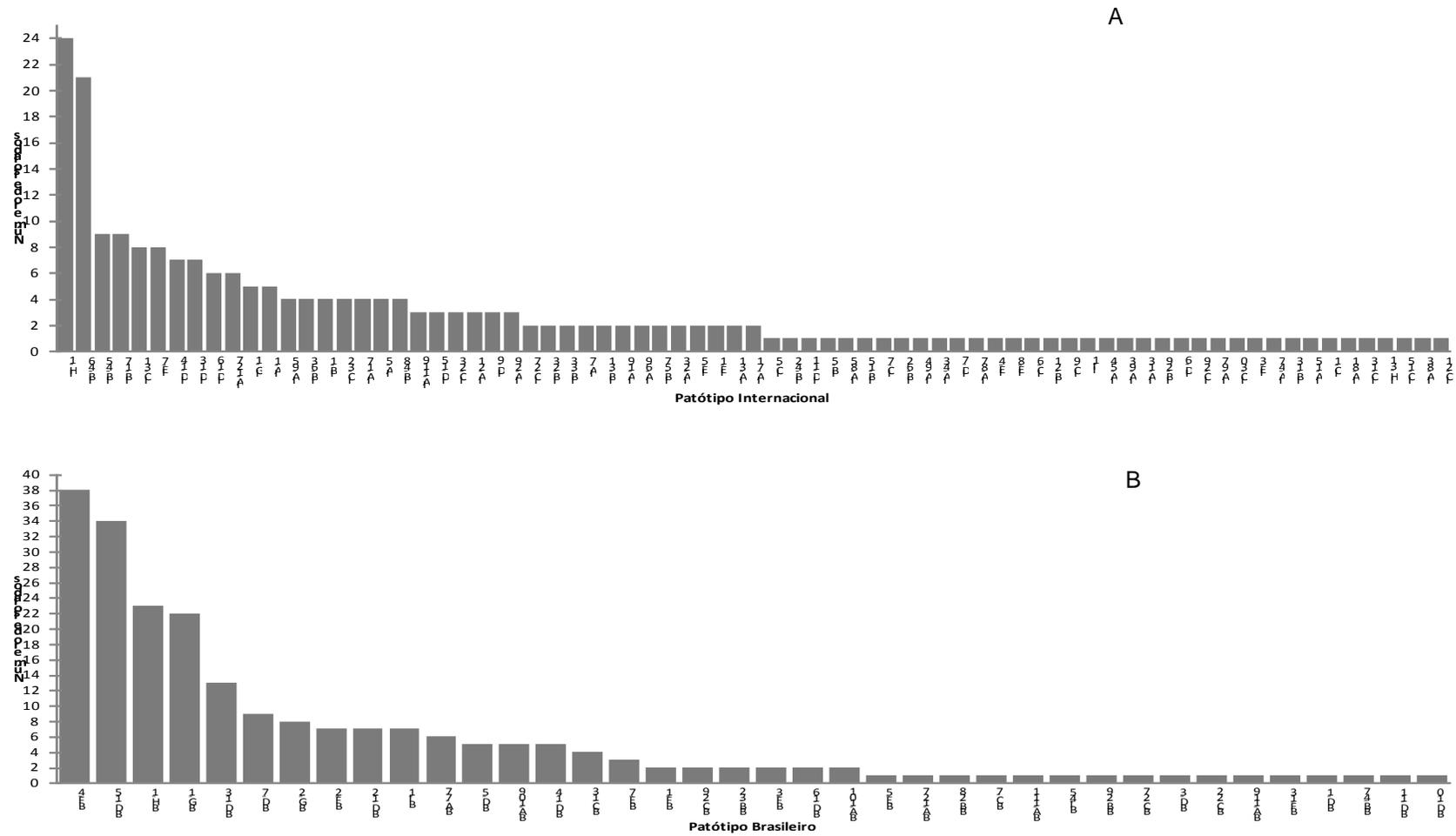


FIGURA 6. Gráfico de número e frequência de patótipos baseados na série diferenciadora internacional e brasileira encontrada na coleção de 224 isolados de *M. oryzae* oriundos de lavouras de arroz irrigado do Sul do Brasil.

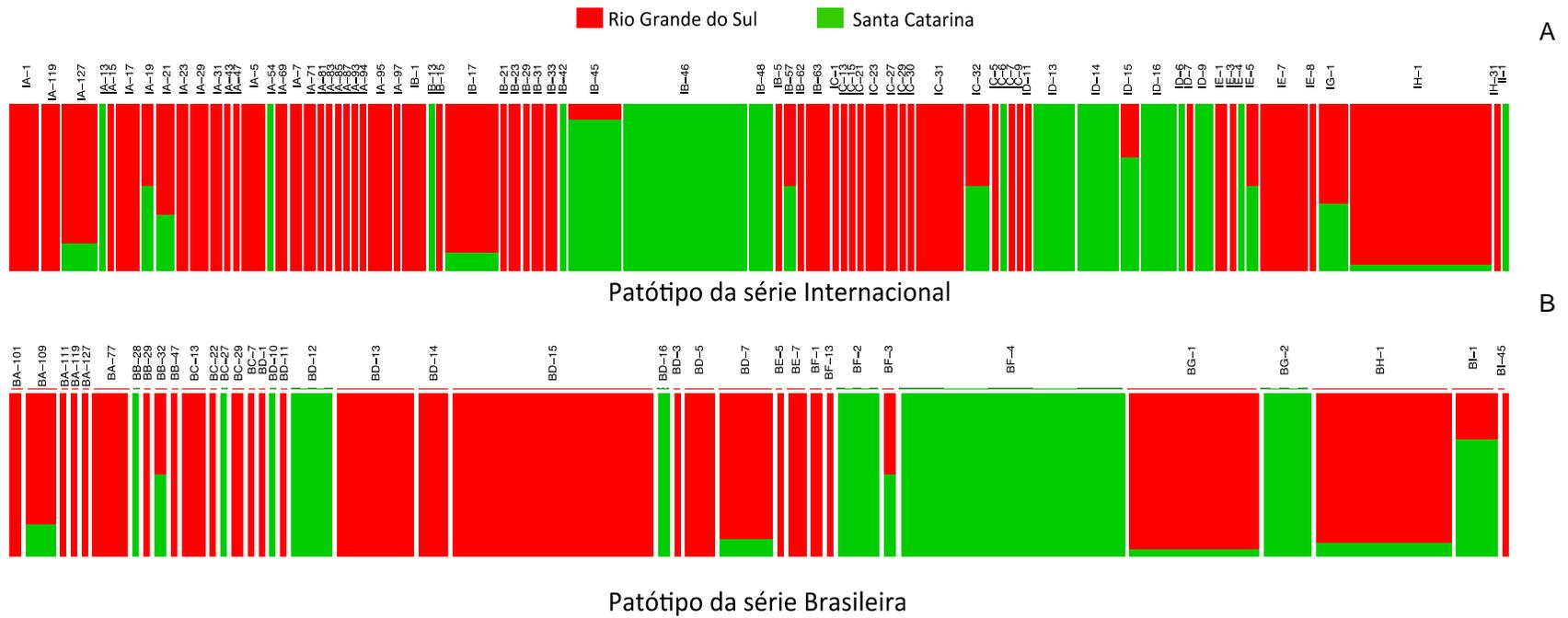


FIGURA 7. Denominação e proporção dos patótipos de *Magnaporthe oryzae* isolados oriundos de dois estados do sul do Brasil e identificados pela série internacional (A) e na série nacional (B) de diferenciadoras.

Dentre os municípios amostrados, Arroio Grande, no RS, apresentou a maior diversidade de patótipos (24 patótipos internacionais e 13 brasileiros). No município de Itajaí, em SC, foi encontrada uma alta diversidade patótipos (20 patótipos internacionais e 11 patótipos brasileiros).

No município de Camaquã foram encontrados 15 patótipos internacionais e 11 brasileiros. Já em Dom Pedrito, foram encontrados 19 patótipos internacionais e oito patótipos brasileiros. No município de São Sepé foram amostrados 14 patótipos internacionais e oito patótipos brasileiros. Houve uma tendência de detectar ua maior diversidade de patótipos nos municípios que contribuíram com maior número de isolados amostrados.

Quanto à frequência dos patótipos segundo a cultivar de origem, verificou-se uma maior diversidade nas cultivares Guri INTA CL, Puitá INTA CL e Querência, das quais foi amostrado um maior número de isolados.

A cultivar Guri apresentou 37 patótipos internacionais e seis brasileiros de um total de 59 isolados. Da cultivar Puitá, que contribuiu com 61 isolados, foram identificados 31 patótipos internacionais e 6 patótipos brasileiros. Já a cultivar Querência, apresentou 8patótipos internacionais e 5 patótipos brasileiros de um total de 23 isolados amostrados dessa cultivar.

TABELA 5. Frequência, designação e local de origem de patótipos determinados pela série internacional de diferenciadora para uma coleção de 224 isolados de *Magnaporthe oryzae* coletados em lavouras comerciais e áreas experimentais de arroz irrigado no sul do Brasil

Estado	Região <sup>1</sup>	Município	N <sup>2</sup>	NP <sup>3</sup>	Grupo (patótipo)
RS	FO	Alegrete	9	7	A (5,7,29), C (23, 29), E (7), H(1)
	ZS	Arroio Grande	32	24	A(3, 23, 17, 21, 1, 5, 15, 119, 69, 31, 7, 29, 127, 71, 95, 97); B(23, 1); G(1); H(1); E(1); B(17, 29); C(32).
	PCI	Camaquã	22	15	A(94,93,17,43,21,127,95); B(63); C(31, 15, 1, 23, 30); H(1, 31)
	ZS	Capão do Leão	1	1	B(5)
	PCE	Capivari do Sul	6	6	A(83, 87, 127, 95, 81); IC(31)
	CAM	Dom Pedrito	28	19	A(17,19,47,69,71,95,127); B(1,17,23,62,63); C(1,9,31,32); D(11); H(1); E(7)
	PCI	Guaíba	12	5	A(1); B(15); C(31); E(7,8); H(1)
	FO	Itaqui	5	5	A(127); B(1,45);C(31);E(1)
	ZS	Pelotas	9	8	B(21,33,57); C(5); E(7); G(1); H(1); I(1)
	DC	Santa Maria	5	4	C(21,27,31); H(1)
	DC	São Sepé	17	14	A(17,119); B(1,17,31,33,63); C(7); D(7,15); E(3,5); G(1); H(1)
	ZS	Sta. Vitória do Palmar	1	1	A (85)
	SC	N	Camburiú	3	2
S		Criciúma	5	5	B(46); D(16,9); B(48); A(54)
N		Garuva	1	1	B(42)
N		Itajaí	52	20	A(13,19,21,127); B(17,45, 46,48, 57); C(6,32); D(6,9,13,14,16); E(4,5); H(1); I(1)
S		Nova Veneza	16	8	B(13,45,46); D(13,14,15,16); G(1)

1

Regiões orizícolas segundo o IRGA: FO = Fronteira Oeste; CA= Campanha; DP= Depressão Central; PCI= Planície Costeira Interna; PCE= Planície Costeira Externa e ZS= Zona Sul. <sup>2</sup> Número de isolados amostrados. <sup>3</sup> Número de patótipos;

TABELA 6. Frequência, designação e local de origem de patótipos determinados pela série brasileira de diferenciadora para uma coleção de 224 isolados de *Magnaporthe oryzae* coletados em lavouras comerciais e áreas experimentais de arroz irrigado no sul do Brasil.

Estado	Região <sup>1</sup>	Município	N <sup>2</sup>	NP <sup>3</sup>	Grupo (patótipo)
RS	FO	Alegrete	9	4	D (15,13); H(1); G(1)
	ZS	Arroio Grande	32	13	D (15, 7, 5, 13,3); A (127,119, 101); F(1,13); H(1); I(1); C(7)
	PCI	Camaquã	22	11	D(11,13, 14, 15); A(77, 109); B(32); C(29); I(45); G(1); H(1)
	ZS	Capão do Leão	1	1	H(1)
	PCE	Capivari do Sul	6	6	D(15,13,14); C(29);G(1); A(77)
	CAM	Dom Pedrito	28	8	B(47, 29); G(1); C(13); D(7,15);E(7);H(1)
	PCI	Guaíba	12	6	A(109);C(22); (13,14);G(1);H(1)
	FO	Itaqui	5	4	D(5);F(1);G(1);H(1)
	ZS	Pelotas	9	5	D (1,5,7,15); H(1)
	DC	Santa Maria	5	5	A(77,109); E(5); H(1); I(1)
	DC	São Sepé	17	8	A (101,111);D(7,13,15); F(3);H(1);G(1)
	ZS	Sta. Vitória do Palmar	1	1	G(1)
	SC	N	Camburiú	3	2
S		Criciúma	5	3	F(4); D(12) G(2)
N		Garuva	1	1	BD (16)
N		Itajaí	52	11	A (109); B(28,32); C(27);D(7,10,12,16),F(2,3,4);G(2); H(1);I(1)
S		Nova Veneza	16	6	D(12);F(2,4);G(1,2); I(1)

<sup>1</sup> Regiões orizícolas segundo o IRGA: FO = Fronteira Oeste; CA= Campanha; DP= Depressão Central; PCI= Planície Costeira Interna; PCE= Planície Costeira Externa e ZS= Zona Sul. <sup>2</sup> Número de isolados amostrados. <sup>3</sup> Número de patótipos;

Entre os isolados da cultivar Puitá INTA CL, os mais frequentes foram IH-1 com 13 isolados e BD-13 , com 11 isolados. Na cultivar Guri INTA CL os mais frequentes foram IB-17 com 5 isolados e BD-15 com 25 isolados.

TABELA 7. Número de isolados e frequência de patótipos determinados pela série diferenciadora internacional, identificados nas 14 cultivares de origem amostradas, nos estados do RS e SC para uma coleção de 224 isolados.

Cultivar de origem	Estado	N <sup>1</sup>	NPI <sup>2</sup>	Grupo(patótipo)
Guri Inta CL	RS	59	37	A (1,5,7,23,31,15,17,21,27,29,31,69,71, 95,97,119,127); B (23,31,33,17,29,1, 21, 57,63); C(5,7,32); D(7,15); E(1,3,5,7); G(1); H(1)
Puita Inta CL	RS	61	31	A(1,5,7,17,21,43,81,83,85,87,93,94,95,127); B(1,5,45,63); C(13,15,21,23,27, 29,30,31); E(1,7,8); H(1,31)
Querência	RS	23	14	A(47,95,69,127,71); B(17,23,62,63); C(31,32); D(11,); E(7)H(1)
SCS 117 CL	SC	12	8	A(54);B(46,48);D(9,13,14,15); G(1)
Epagri 109	SC	17	7	B(45,46);C(32); D(13,14,16); E(4).
Epagri 106	SC	6	6	A(19,21,127);B(17);C(32); H(1)
SCS 114 Andosan	SC	9	6	B(13,45,46,48) D(14,16)
SCS 115 CL	SC	7	6	B(45,46,57);C(6); D(6,16)
SCS 116 Satoru	SC	12	5	B(45,46); D(13,16); G(1)
SCS 113 Tiotaka	SC	7	5	B(42,46,48; D(14); I(1)
SCS 118 Marques	SC	4	4	A(13); D(13,16); E(5)
Olimar	RS	4	3	B(17); C(1,9)
Epagri 108	SC	2	2	B(45,46)
SCS 112	SC	1	1	B(46)

<sup>1</sup>N: Número de isolados; <sup>2</sup>NPI: Número de patótipos internacionais.

Na cultivar Querência, o mais frequente foi IH 1 com 6 isolados e BG 1, com 10 isolados. Das cultivares de SC, a cultivar SCS 117 CL foi a que apresentou maior diversidade de patótipos, 8 patótipos internacionais e 5 patótipos nacionais, de um total de 12 isolados.

TABELA 8. Número de isolados e frequência de patótipos determinados pela série diferenciadora brasileira identificados nas 14 cultivares de origem amostradas, nos estados do RS e SC para uma coleção de 224 isolados.

Cultivar de origem	Estado	N <sup>1</sup>	NPB <sup>2</sup>	Grupo(patótipo)
Puita Inta CL	RS	61	6	B(29,47);C(13);D(15); G(1); H(1)
Guri Inta CL	RS	59	6	A(109); B(28,32); C(27); D(7); H(1)
SCS 117 CL	SC	12	5	F(2,4); G(1,2); I(1)
Olimar	RS	4	5	F(2,4); G(1,2); I(1)
SCS 112	SC	1	5	D(10,16); F(2,4); I(1)
Epagri 109	SC	17	4	D(12); F(2,4); G(2)
SCS 118 Marques	SC	4	4	D(12); F(2,4); I(1)
Epagri 108	SC	2	4	F (2,3); G(2); H(1)
SCS 114 Andosan	SC	9	3	D (12); F (2,4)
SCS 113 Tiotaka	SC	7	3	D(12); F(2,4)
Epagri 106	SC	6	3	D(16); F(4); G(2)
SCS 116 Satoru	SC	12	2	D(7);E(7)
Querência	RS	23	1	D(12)
SCS 115 CL	SC	7	1	F(4)

<sup>1</sup>N: Número de isolados; <sup>2</sup>NPB: Número de patótipos brasileiros.

#### 4.2 Variabilidade molecular por marcadores microssatélites

Segundo o algoritmo do programa Structure, o maior valor encontrado de  $\Delta K$ , um parâmetro considerado eficiente e adequado para a definição do nível hierárquico da estruturação da população (Evanno et al, 2005), foi determinado para o número de quatro grupos ( $K=4$ ), com base no menor valor do logaritmo neperiano (-1915.61) (Figura 8).

Assim, o arranjo mais adequado para organizar os 224 indivíduos analisados foi de quatro subpopulações ou linhagens. A análise das informações da distribuição geográfica e cultivar de origem dos isolados mostraram que houve forte estruturação dos isolados segundo esses atributos.

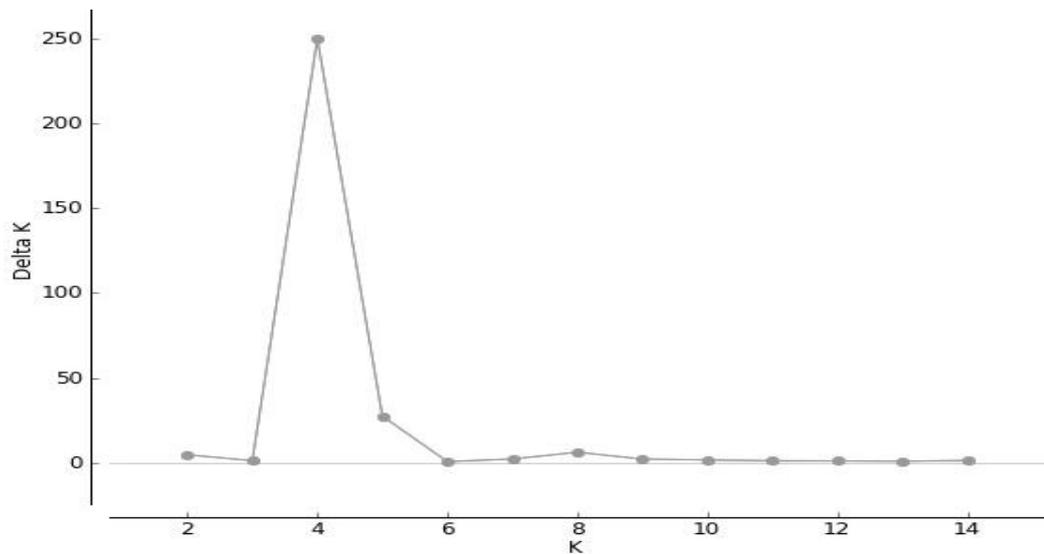


FIGURA 8. Relação entre o parâmetro delta K ( $\Delta K$ ) e k segundo teste de atribuição realizado pelo software Structure 2.2, mostrando a melhor predição do número de grupos (quatro) para 192 isolados de *Magnaporthe oryzae* obtido por análise molecular com a utilização de 10 marcadores microsatélites.

Assim, as quatro linhagens foram assim denominadas: **linhagem SB** (Sul Brasileira), que agrupou 73 isolados distribuídos de maneira aleatória nos estados de SC e RS; **linhagem PUITA**, que agrupou todos os 45 isolados oriundos da cultivar Puitá INTA CL; **linhagem GURI**, que agrupou todos os 47 isolados originados da cultivar Guri INTA CL; e **linhagem SC**, que agrupou 27 isolados, todos oriundos do estado de Santa Catarina. A figura 9 apresenta os 192 isolados agrupados em quatro subpopulações segundo o Structure.

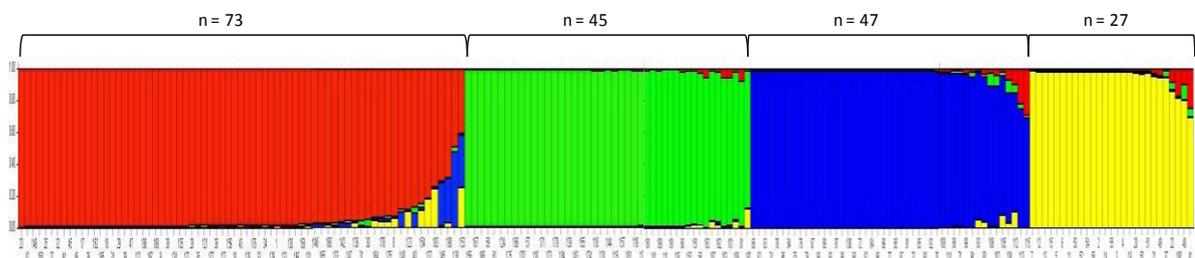


FIGURA 9. Agrupamento (cores) de isolados de *Magnaporthe oryzae*, segundo a similaridade genética determinada pelo método de estimação bayesiana segundo o programa Structure. Os 192 isolados estudados foram coletados de folhas e panículas. A cor vermelha representa linhagem B (Sul Brasileira), a cor verde a linhagem PUITA, a cor azul a linhagem GURI e a cor amarela a linhagem SC (Santa Catarina).

Com base no índice de Nei, observam-se as maiores distâncias (maior valor do índice) entre as subpopulações de origem geográfica distinta, segundo o estado de origem. A linhagem PUITA e a linhagem GURI, que ocorreram somente no RS, estiveram mais distantes da população SC. Já a população SB, que ocorreu em ambos os estados, foi a mais próxima de todas as três subpopulações. As subpopulações mais próximas (0, 612) foram a SB e a PUITÁ. Já as mais distantes (1.146) foram a GURI e a SC (Tabela 9).

De acordo com a AMOVA a maior variabilidade foi detectada dentro das subpopulações (56,4%) do que entre as subpopulações (43,6%) (Tabela 10).

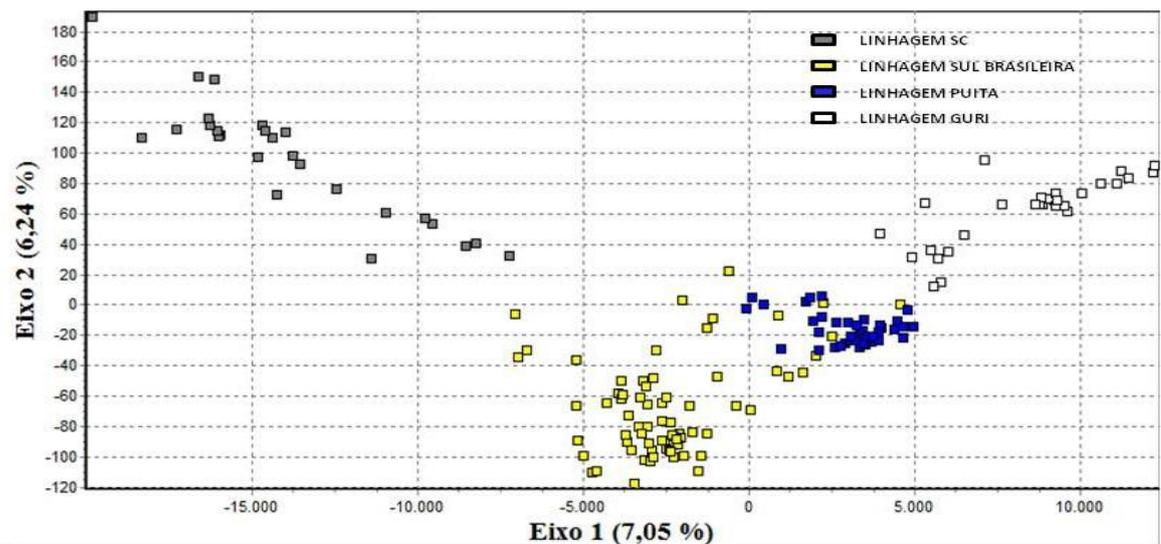


FIGURA 10. Gráfico representativo da distância genética segundo Nei (1972) entre quatro subpopulações e seus isolados correspondentes. Eixos 1 e 2 representam medidas de distância calculadas pelo software Genetix.

TABELA 9. Matriz de distância genética<sup>1</sup> entre as quatro subpopulações de *Magnaporthe oryzae*, de acordo com 1000 permutações calculado com o software Genetix.

	Subpopulação (linhagem)			
	SB	PUITÁ	GURI	SC
SB	-	0.612	0.654	0.628
PUITÁ	-	-	0.820	0.987
GURI	-	-	-	1.146
SC	-	-	-	-

<sup>1</sup> Segundo Nei (1972)

Todos os locos apresentaram-se polimórficos, sendo que três locos, pyrms 409-410, pyrms 533-534 e pyrms 657-658, foram os que permitiram detectar maiores diferenças entre as populações com uma variação de 67,78%, 67,92 % e 68,11% respectivamente. Já os locos pyrms 607-608, pyrms 77-78 e pyrms 505-506 foram capazes de detectar diferenças dentro das populações com variações 92,79 %, 99,57 % e 97,63 %, respectivamente. Contudo observou-se que o loco pyrms 77-78 apresentou o menor índice de polimorfismo entre os 10 locos microsatélites testados, podendo ser classificado como o loco menos informativo (Tabela 11).

TABELA 10. Estatísticas da análise de variância molecular para a diferenciação genética entre e dentro de subpopulações de *Magnaporthe oryzae*.

Fator de variação	GL <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	CV <sup>3</sup>	% Variação
Entre subpopulações	3	454.281	1.59648 Va	43.60
Dentro de subpopulações	188	776.375	2.06483 Vb	56.40
Total	191	1230,656	3.66131	

<sup>1</sup> graus de liberdade; <sup>2</sup> soma dos quadrados; <sup>3</sup> Coeficiente de variação.

O valor de diferenciação genética das populações ( $F_{ST}$ ) foi 0,43604, altamente significativo ( $p < 0,001$ ) com probabilidades calculadas por 10.000 permutações ao acaso.

TABELA 11. Informações sobre dez locos microssatélites indicando a porcentagem de polimorfismo em cada loco entre e dentro de quatro subpopulações de um total de 224 isolados de *Magnaporthe oryzae* e seus respectivos valores de  $F_{ST}$ , calculado pelo programa Alerquim.

<b>Loco</b>	<b>%variação entre subpopulações</b>	<b>%variação dentro de subpopulações</b>	<b><math>F_{ST}</math></b>
Pyrms607-608	7.20687	92.79313	0.07207
Pyrms77-78	0.42619	99.57381	0.00426
Pyrms63-64	9.12833	90.87167	0.09128
Pyrms505-506	2.36529	97.63471	0.02365
Pyrms233-234	43.85360	56.14640	0.43854
Pyrms409-410	67.78016	32.21984	0.67780
Pyrms533-534	67.92286	32.07714	0.67923
Pyrms657-658	68.11403	31.88597	0.68114
Pyrms319-320	46.36941	53.63059	0.46369
Pyrms47-48	27.91724	72.08276	0.27917

#### 4.3 Relação entre patótipos dominantes e linhagens

A maioria dos dez patótipos mais prevalentes tiveram seus isolados agrupados em pelo menos duas das quatro linhagens (Figura 11 e 12). Apenas para um patótipo nacional, BF-2, todos os isolados, em número de oito, foram agrupados na linhagem SB. A maioria dos isolados dos patótipos IH-1 foram agrupados na linhagem PUITA e a maioria dos isolados do patótipo BD-15 foram agrupados na linhagem GURI. A linhagem SB apresentou o maior

número de isolados de diferentes patótipos. Os patótipos IB-46, ID-14, ID-13, ID-16, BD-4, BG-2 e BD-12 se distribuíram somente nas linhagens SB e SC. Os patótipos IH-1 e BH-1 foram os únicos a estarem presentes nas 4 linhagens identificadas.

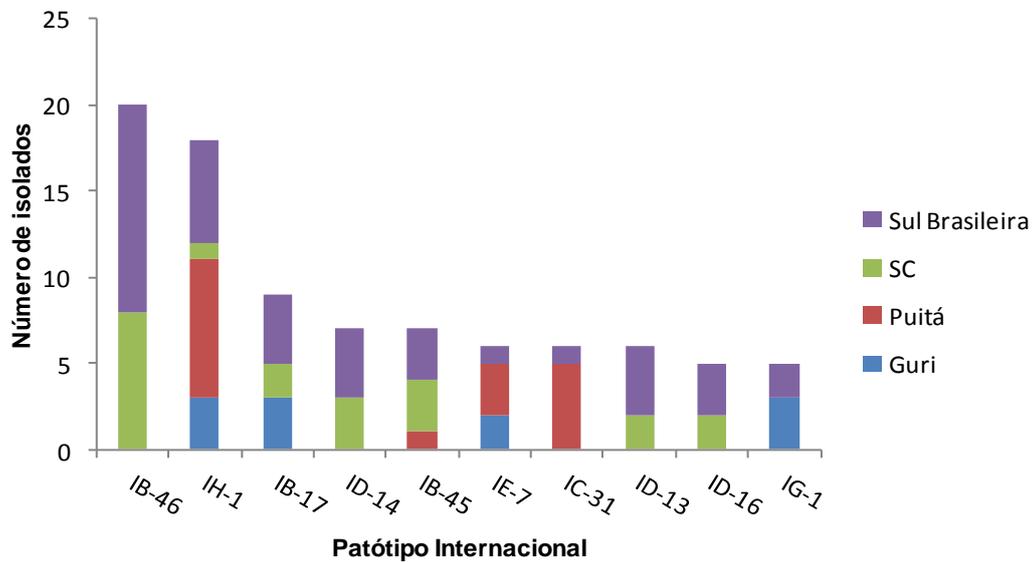


FIGURA 11. Número de isolados por patótipos internacionais mais prevalentes distribuídos em quatro linhagens agrupadas segundo análise molecular com os marcadores moleculares microssatélites em 192 isolados de *M. oryzae*. Considerou-se os patótipos com 5 ou mais número de isolados.

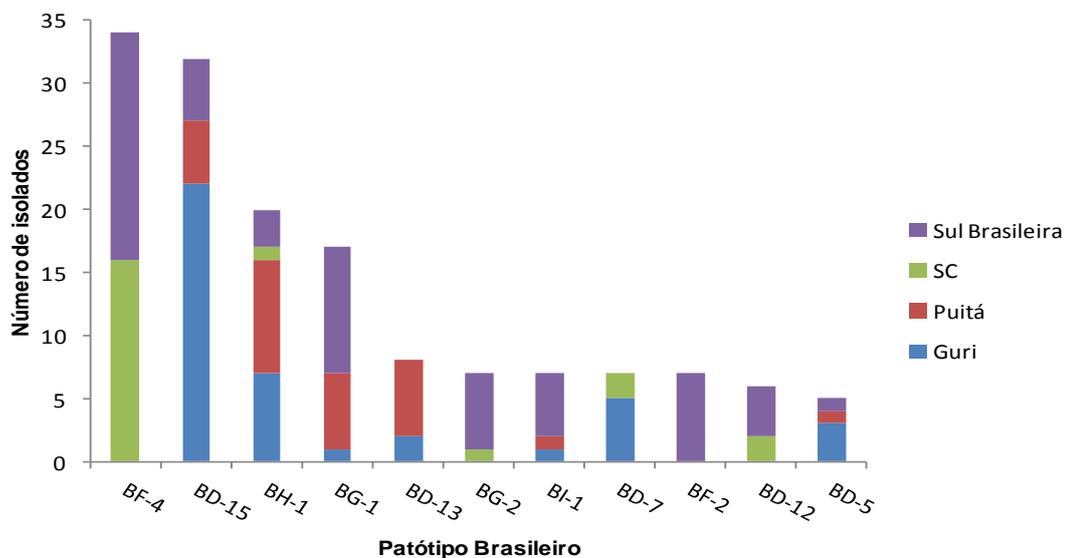


FIGURA 12. Número de isolados por patótipos brasileiros mais prevalentes distribuídos em quatro linhagens agrupadas segundo análise molecular com os marcadores moleculares microssatélites em 192 isolados de *M. oryzae*. Considerou-se os patótipos com 5 ou mais número de isolados.

O presente estudo relata a diversidade de patótipos de *M. oryzae* em lavouras e áreas experimentais de arroz irrigado no sul do Brasil com base em uma ampla amostragem de isolados de todas as regiões produtoras, feita em um ano com epidemias generalizadas no Sul do Brasil. Epidemias de brusone ocorrem com baixa frequência especialmente no RS (IRGA, 2013), ao contrário de SC, onde as condições ambientais são mais propícias à ocorrência de epidemias (SOSBAI, 2007). Destaca-se que, durante as visitas, foram observados níveis variados de severidade da doença.

Pela primeira vez, patótipos brasileiros foram identificados usando-se a série brasileira para cultivares de arroz irrigado (Silva *et al.*, 2011). Estudos anteriores haviam utilizado outra série brasileira de diferenciadores de arroz de terras altas (Silva *et al.*, 2007; Prabhu *et al.*, 2002; Prabhu e Filippi, 2006; Araújo *et al.*, 2005).

A série brasileira usada no presente estudo mostrou uma menor capacidade de discriminação de patótipos comparado à série internacional, pois identificou menor número de patótipos. No entanto ela permitiu diferenciação de patótipos determinados como um único patótipo internacional. Por exemplo, o patótipo no RS IH-1 (23 isolados) foi dividido pela série brasileira em 14 patótipos distintos em 9 grupos. Já em SC o patótipo dominante IB-46 (21 isolados) foi dividido em 4 patótipos brasileiros em 2 grupos.

A utilização de uma série diferenciadora adicional para monitorar o padrão de virulência de *M. oryzae* é preconizada para aumentar o valor preditivo na determinação dos patótipos raros e previsão da estabilidade da resistência antes

da liberação comercial da cultivar em uma determinada região a ser estudada (Silva *et al.*, 2011). Para que estas diferenciadoras locais tornem-se mais elucidativas, o número de genes de resistência que cada uma possui deve ser identificado, e se todos são diferentes entre si, na mesma cultivar e entre elas. Ao identificar patótipos brasileiros com cultivares altamente adaptadas e desenvolvidas nas nossas condições tropicais significa que estes genes de resistência possuem um melhor “*fitness*” se comparado com as internacionais, proporcionando uma melhor predição da eficiência da resistência das cultivares utilizadas e caracterização da população de *M. oryzae* nessas regiões.

Os dados sobre a prevalência de patótipos sugeram uma mudança no perfil da população em relação aos patótipos dominantes, particularmente no RS, com base na série diferenciadora internacional. Em estudo sobre a diversidade de patótipos de *M. oryzae* no RS, em uma coleção de 85 isolados obtidos de vários locais e cultivares, entre os anos de 1996 e 2001, foram identificados 26 patótipos, sendo todos do grupo IA, sendo o IA-45 o patótipo dominante, com 22 isolados. No nosso estudo, três patótipos representaram aproximadamente 25% todos os isolados amostrados no RS (147 isolados), sendo o IH-1 o patótipo dominante, em 15,6 % dos isolados. O patótipo IA-45, outrora dominante, não foi encontrado nos isolados amostrados no RS. Em estudo recente Gonçalves (2013), com uma pequena amostra de nove isolados do RS, 3 da safra 2008/09 e 6 da safra 2010/11, identificou 7 patótipos diferentes nas duas safras, prevalecendo o grupo A com três patótipos diferentes e o grupo C com dois. Houve prevalência do patótipo IA-1 na safra 2010/11. Na safra 2008/09, não houve prevalência de nenhum patótipo específico. Em nosso estudo o IA-1 foi o quarto mais frequente com cinco isolados, mostrando que este patótipo ainda está presente no estado.

Já para os isolados coletados em SC, no presente estudo, não se observou uma mudança significativa em relação aos patótipos dominantes no estado de SC. No entanto, foi detectada uma maior diversidade de patótipos em relação a um estudo anterior na região, possivelmente devido a amostragem ter sido feita em um grande número de cultivares.

No estudo com uma coleção de 28 isolados obtidos em lavouras e áreas experimentais em 12 municípios de SC, na safra 2001, foram identificados 6 patótipos distribuídos em três grupos (IA, IB e II) onde predominou o patótipo IB-45, em 14 isolados (Scheuermann, 2004).

Mais recentemente, Gonçalves (2013), com uma coleção de 102 isolados de lavouras de SC, safras de 2009, 2010 e 2011, identificou 36 patótipos diferentes nas três safras, prevalecendo o grupo A com 16 patótipos diferentes e o grupo B com 11. No grupo A prevaleceu o patótipo IA-45 com 20 isolados e no grupo B prevaleceu o patótipo IB-46 com nove isolados.

No presente estudo o patótipo IB-45, dominante no estudo de Scheuermann (2004), foi o segundo mais prevalente em SC, com nove isolados em 77 isolados amostrados naquele estado, onde foi identificado um total de 25 patótipos. O patótipo IB-46 foi o mais frequente neste estudo em SC o que também foi verificado por Gonçalves (2013).

A alta diversidade de patótipos da população do RS comparada a de SC, pode estar relacionada às características de amostragem como número de cultivares, lavouras, etc. (Prabhu & Filippi, 1999, Dias Neto *et al.*, 2010).

Mudanças no perfil populacional são influenciadas por pressões de seleção motivada por fatores ambientais, agronômicos e o perfil altamente variável geneticamente do patógeno. No presente caso, a mudança nas populações dominantes no RS pode estar relacionada com a baixa diversidade de

cultivares em grandes extensões exercendo pressão de seleção na população. Aproximadamente metade do número de isolados foi obtido de duas cultivares, Puitá INTA CL e Guri INTA CL, o que demonstra que as maiorias das lavouras do estado são cultivadas com material suscetível às populações dominantes. A pressão de seleção é agravada especialmente em espécies autógamas, geralmente cultivadas em vastas áreas com cultivares geneticamente uniformes, o que proporciona o surgimento e multiplicação de novas raças virulentas do patógeno (Thomé, 1999). A estratégia de cultivo sucessivo de genótipos em grandes áreas é plenamente conhecida como desastrosa selecionando populações altamente patogênicas a cultivar utilizada.

Durante os estudos conduzidos na década de 1990 (Maciel *et al.*, 2004), a cultivar mais plantada no RS eram as cultivares IRGA ou cultivares selecionadas com base nesses materiais, enquanto, na safra em que realizamos as coletas, a cultivar mais plantada foi Puitá INTA CL, que apresenta similar fundo genético das cultivares IRGA e que ocupa mais de 50 % de toda área plantada no RS (SOSBAI, 2012). Este estudo relata o maior número de patótipos (75 patótipos internacionais) até então identificados em uma região produtora do Brasil. Para outras regiões do Brasil, uma grande diversidade em número de patótipos também foi relatada. Por exemplo, Dias Neto *et al.* (2010), em lavouras de arroz irrigado em Tocantins, identificaram 61 patótipos internacionais em 8 grupos em uma amostra de 479 isolados.

Confirmando estudos anteriores, o uso dos marcadores microssatélites no estudo da variabilidade molecular de *M. oryzae* revelaram alto polimorfismo, mostrando-se altamente informativos e elucidativos (Brondani *et al.*, 2000; Garrido, 2001; Kaye *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004; Chada *et al.*, 2005; Karaoglu *et al.*, 2005; Ramos, 2009).

Estudos anteriores no Brasil com marcadores microssatélites foram conduzidos com uma amostra bastante limitada de isolados do RS (Brondani *et al.*, 2000) o que dificulta a comparação dos resultados. Através do método de estimação bayesiana a população composta por 192 isolados analisados foi estruturada em quatro subpopulações ou linhagens geneticamente distintas onde a variação dentro de subpopulações foi maior que entre subpopulações.

As quatro linhagens mostraram tendência a um agrupamento de acordo com a cultivar de origem e localização geográfica dos isolados. As linhagens denominadas PUITÁ e GURI foram assim denominadas por conterem isolados apenas dessas respectivas cultivares. A linhagem denominada SC agrupou isolados somente originados de SC e a linhagem denominada SB agrupou isolados de ambos estados amostrados (população Sul Brasileira) e diversas cultivares.

Em estudo similar conduzido na Ásia foram genotipados 1372 cepas das 55 amostras populacionais de *M.oryzae* de 15 países, com 10 marcadores microssatélites, sete idênticos aos usados no presente estudo, a estruturação por eles detectada foi em três grupos, com valores de FST altamente significativos, como também observamos, validando a técnica como 100% reprodutível. A subdivisão observada pelos autores foi altamente associada à origem geográfica dos isolados (Tharreau *et al.*, 2013).

Consolo *et al.* (2008) genotiparam 161 isolados de diferentes regiões da Argentina utilizando o marcador Pot-2 que revelou cinco linhagens e observou uma tendência ao agrupamento segundo a cultivar de origem dos isolados, que não se mostrou muito explícita, pois eles consideraram a amostragem muito reduzida.

No Brasil, o perfil genético de 114 isolados originados dos estados de Goiás, Tocantins e Pará utilizando 14 marcadores microssatélites permitiu estruturar em três subpopulações de acordo com a origem geográfica dos isolados (Ramos, 2009).

Recentemente, uma coleção de 492 isolados de *M. oryzae* de todo Brasil foi estruturada em 19 linhagens, utilizando 18 marcadores microssatélites, sendo 10 deles os mesmos utilizados no presente estudo (Gonçalves, 2013). Ainda naquele estudo, houve agrupamento dos isolados em função da cultivar de origem.

A análise da distância genética entre as linhagens identificadas neste estudo mostrou uma menor distância entre linhagens que ocorreram em um mesmo estado (PUITA e SB) e a maior distância de linhagens de estados diferentes (GURI e SC). A linhagem SB foi mais equidistante das outras três linhagens. É possível que o uso de outros marcadores mais eficientes (substituindo-se o *pymrs 77-78*, por exemplo, que se mostrou o menos polimórfico) ou aumentando o número de marcadores, aumentariam a resolução dos agrupamentos (Tharreau *et al.*, 2013; Maciel *et al.*, 2013).

No presente estudo não foi observada relação consistente entre os grupos de patótipos e as linhagens. Embora alguns autores tenham demonstrado que a relação entre filogenia e fenótipo seja relativamente simples (Levy *et al.*, 1991; Zeigler, 1998), a maioria dos trabalhos tem demonstrado que os isolados de uma mesma linhagem apresentam variação de virulência (Levy *et al.*, 1993; Xia *et al.*, 1993; Maciel *et al.*, 2004).

A ocorrência dos mesmos patótipos, em populações definidas geneticamente são um indicativo de que as cultivares diferenciadoras utilizadas neste estudo não revelam toda a diversidade genética existente. Consolo *et al.*,

2008, não encontraram associação entre o perfil genético e de virulência de uma coleção de isolados de *M. oryzae*, o que é consistente com outros resultados, o que sugere que os isolados do mesmo patótipo não estão intimamente relacionados (Zeigler *et al* 1995. ;Javan–Nikkhah *et al.* 2003; Park *et al* ., 2003; NinhThuan *et al* ., 2006) . Conforme relatado nesses estudos anteriores, nossos resultados também demonstram que as informações de linhagem não são ferramentas úteis para prever o espectro de virulência de isolados de *M. oryzae*.

Assim, ao compararmos os resultados aqui obtidos pelos agrupamentos genéticos e fenotípicos, é possível hipotetizar que a determinação de patótipos nos permite uma classificação de diversidade e não um parâmetro de agrupamento dos indivíduos mais similares, a ocorrência do mesmo patótipo em subpopulações diferentes revela a diversidade daquele agrupamento para os genes de avirulência em questão.

Assim a identificação de genes de resistência vai explorar a variabilidade dentro da subpopulação, importante para cada região. As cultivares devem ser direcionadas para cada região, o que observamos pela estruturação populacional aqui relatada mostrando a eficiência dos marcadores utilizados.

Desta forma, a caracterização prévia de populações brasileiras de *M. oryzae*, sugere que o isolamento genético entre elas possa gerar informações chave para determinar estratégias fundamentais no controle da doença.

## 5 CONCLUSÕES

- Existe uma grande diversidade, representada pelo alto número de patótipos de *M. oryzae* nos estados de SC e RS, particularmente com base na série internacional de diferenciadoras, sendo essa a maior diversidade até então relatada no Brasil.
- Patótipos de *M. oryzae* do grupo IH e do grupo BD são predominantes no estado do Rio Grande do Sul e o IB e BF no estado de Santa Catarina.
- Os marcadores microssatélites se mostraram eficientes para estimar a variabilidade genética e estruturar os isolados de *M. oryzae* do sul do Brasil em quatro linhagens de acordo com a cultivar de origem e região geográfica.

## 6 REFERÊNCIAS

ADAME, C.A., KOLLER, W. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. **Current Genetics**, New York, v.42, n. 6, p.332-338, mar. 2003.

AGRIOS, G. N. Plant pathology. 5th ed. San Diego: **Elsevier**. p. 922, 2005.

AGROFIT. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. **[Informações institucionais, técnicas, notícias e publicações]**. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 25 jan. 2014.

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, p.136-153, 1994.

ANDREIT, H. et al. Microsatellite markers for population studies of rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, 2007.

ANJOS, L. M. et al. Identificação de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* em áreas de arroz irrigado no Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, vol. 34, n.3, p.182-185, 2009.

ATKINS, J.G. et al. An international set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.57, p.297-301, 1967.

AZAMBUJA, I. H. V.; MAGALHÃES JUNIOR, A.M.; VERNETTI JUNIOR, F. J. Situação da cultura do arroz no mundo e no Brasil. In: SÉRIE Culturas - Arroz. Porto Alegre: Assembléia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul, 2002. p.11-22. Disponível em: [http://www.rs.gov.br/Download/CAPC/serie\\_culturas\\_arroz.pdf](http://www.rs.gov.br/Download/CAPC/serie_culturas_arroz.pdf). Acesso em: 22 maio 2013.

BALARDIN, R. S. **Doenças do arroz**. Santa Maria :Orum, 2003. 59 p.

BEDENDO, I. P.; PRABHU, A. S. Doenças do arroz. In: MANUAL de Fitopatologia. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 79-9

BERGAMINFILHO. A.;KIMATI. H.;AMORIN. L.Manual de fitopatologia : princípios e conceitos. 3ª ed. São Paulo: **Agronômica Ceres** , 1995. v. 1, p. 919

BRONDANI, C. et al. Development of microsatellite markers for genetic analysis of *Pyriculariagrisea*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p.230-245, 1998.

BRONDANI, R.P.V. et al. Genetic structure of wild rice *Oryzoglumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. **Genetics**, Austin, v.125, p.115-123, 2000.

CASSETARI, D. N. **Brusone (*Pyriculariagrisea*Sacc) em arroz de sequeiro no estado de Mato Grosso**: I-Identificação de raças fisiológicas, II-Influência do nitrogênio, fósforo e potássio na infecção do patógeno. 1996. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras MG., 1996.

CHADHA, S. ; GOPALAKRISHNA, T. Genetic diversity of Indian isolates of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) using molecular markers. **Current Science**, New York, v. 88, p.1466–1469, 2005.

CHADHA, S. ; GOPALAKRISHNA, T. Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. **Current Science**, New York, v. 93, n. 5, p.690-673, 2007.

CONSOLO, V.F.; CORDO, C.A.; SALERNO, G.L. DNA fingerprint and pathotype diversity of *Pyricularia oryzae* populations from Argentina.**Plant Pathology**, Oxford, vol.37, p. 357–364, 2008.

CORNELIO; V.M.O. et al. Identificação de raças fisiológicas de *Pyriculariagrisea* em arroz no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, p.1016-1022, 2003.

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

COUCH, B.C.; KOHN, M.L. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. Grisea*. **Mycologia**, New York, v.94, n.4, p. 683–693, 2002.

[DEAN, R.A.](#) et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*.[Nature, Reino Unido](#), v. 21, p.980-986, 2005.

DIAS NETO, J. D. et al. Hot spots for diversity of *Magnaporthe oryzae* physiological races in irrigated rice fields in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, p.252-260, 2010.

DUTTA, D. et al. Effect of different active fungicides molecules on the management of Rice blast disease. **International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology**, Londres, v.5, p.247-254, 2012.

ELLIS, M. B. **Dematiaceus Hyphomycetes**. Kew: CMI. 1971. 608 p.

EPAGRI. **Sistema de produção de arroz irrigado em Santa Catarina**. 2.ed. rev. e atual. Florianópolis: Epagri, 2005. 87p. (Sistemas de Produção 32)

FILIPPI, M. C. et al. Genetic diversity and virulence pattern in field populations of *Pyricularia grisea* from rice cultivar Metica-1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.26-35, 2002.

FILIPPI, M.C.; PRABHU A.S. ; LEVY, M. Differential Compatibility of *Pyricularia grisea* isolates with some Brazilian irrigated rice cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.447-450, 1999.

GARRIDO, L. R. **Identificação, desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipervariáveis do genoma de *Magnaporthe grisea* na análise da estrutura de populações do patógeno infectando plantações de arroz (*Oryza sativa*)**. 2001. 193 f. Tese (doutorado em Fitopatologia)- Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

GAZZOLA, R; WANDER, A. E; SOUZA, G. D. S. E. Comércio internacional de arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre, 2009.

GONÇALVES, F. J. **Estrutura populacional de isolados de *Magnaporthe oryzae* (couch & Kohn) de regiões produtoras de arroz (*Oryza sativa*) no Brasil**. 2013. 104 p. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

HAMER, J. E. et al. Mechanism for surface attachment in spores of *Magnaporthe grisea*: the rice blast pathogenic fungus. **Science**, Oxford, v. 239, n. 4837, p. 288-290, 1988.

HEARNE, C.M., GHOSH, S., TODD, J.A. Microsatellites for linkage analysis of genetic-traits. **Trends in Genetics**, Londres, v.8, n.8, p. 288-294, 1992.

HOWARD, R. J ; VALENT, B. Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Oxford, v.50, p. 491-512, 1996.

IBGE. **Anual Estatístico do Brasil**. 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/pub/2012ProducaoAgricola/>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

IBGE. **Anual Estatístico do Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/pub/2013ProducaoAgricola/>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

IRRI. **Bringing hope, improving lives, strategic plan, 2007-2015**. Manila: IRRI, 2006.

KARAOGLU, H.; MAN YING LEE, C.; MEYER W. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. **Molecular Biology Evolutionary**, Oxford, v.22, n.3, p.639–649, 2005.

KAYE, C. et al. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. **Fungal Genetics Biology**, New York, v.40, p. 207–214, 2003.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Londres, v. 35, n.1, p.25-34, 1997.

KHUSH, G. S.; VIRK, P. S. Rice improvement: past, present and future. In: KANG, M. S. (Ed). **Crop Improvement: challenges in the twenty-century**. New York: Food Products Press, 2002. p. 17-42

KUMAR, J. et al. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. **Genetics**, Austin, v.152, n. 3, p.971-984, 1999.

LEVY, M. et al. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 1, p. 95-102, 1991.

LING, K.C.; OU, S.H. Standardization of the international race numbers of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, p.339-342, 1969.

MACIEL, J.L.N. et al. Padrão molecular e de virulência de isolados de *Pyricularia grisea* do Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira** Brasília, v.29, p.504-510, 2004a.

MACIEL, J.L.N. et al. Análise da variabilidade genética de duas cultivares *RaminadStr. 3* utilizadas como diferenciadoras de raças de *Pyricularia grisea*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.631-637, 2004b.

MAPA. **Produção de grãos no Brasil**. Disponível em: <<http://www.mapa.gov.br/pub/produçaoagroas/>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Zurich, v.124, p.163-180, 2002.

MIAH, G. et al. Blast resistance in Rice: a review of conventional breeding to molecular approaches. **Molecular Biology Reports**, Saint Paul, v. 40, n.3, p. 2369-88, 2013.

NEI, M. Genetic distance between populations. **Nature**, Reino Unido, v. 106, p.283-292, 1972.

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

OU, S. H. Pathogenic variability and host resistance of the rice blast fungus, *Pyricularia grisea* Cavara. **Annual Review Phytopathology**, Saint Paul, v.18, p.167-187, 1980.

OU, S.H. **Rice Diseases**. 2nd ed. Kew, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1985. 380p.

PRABHU, A. S. et al. Genetic and phenotypic characterization of isolates of from the rice cultivars Epagri 108 and 109 in the state of Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 566-573, 2002.

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

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; ARAÚJO, L. G. Pathotypic diversity of *Pyricularia grisea* from improved upland rice cultivars in experimental plots. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 468-473, 2002.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e o seu controle. In: A CULTURA do arroz no Brasil. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 1999. p. 262-307

PUCHIO, A. F.; MUCHOVEJ, J. J. O gênero *Pyricularia* e seus teleomorfos. **RAAP**, Passo Fundo, v. 2, p. 175-208, 1994.

RAMOS, L.N. **Estrutura populacional e parâmetros epidemiológicos de isolados de *Magnaporthe grisea* (Barr.)**. 2009.105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília (UNB), Brasília-DF, 2009.

RANGEL, P.H.N. et al. BRS Alvorada and BRSGO Guar - irrigated rice cultivars for the states Goiás and Tocantins. **Crop Breeding and Applied**

**Biotechnology**, Washington, v.6, p.319-322, 2006.

RIBEIRO, A. S. Prevalência de raças de *Pyricularia oryzae* Cav. No Rio Grande de Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.15, p.175-183, 1980.

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, p. 316-321, 1987.

RIBOT, C. et al. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Journal Plant Physiology**, Minniapolis, v. 165, p.114-124, 2008.

SANTOS, G. R.; KORNDÖRFER, G.H.; PRABHU, A.S. Eficiência do silício combinado com nitrogênio e tratamento de sementes no controle de doenças do arroz irrigado por inundação. **Bioscience**, Goiânia, v. 19, p.43-49, 2003.

SANTOS, A. B.; RABELO, R. R. **Informações técnicas para a cultura do arroz irrigado no estado do Tocantins**. Santo Antônio de Goiás-GO: EMBRAPA/ CNPAF, 2008. p. 135 (Documento 218.)

SCHEUERMANN, K. K. **Análise da variabilidade de *Magnaporthe grisea* no estado de Santa Catarina**. 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2002.

SCHEUERMANN, K. K.; EBERHARDT, D.S. Avaliação de fungicidas para o controle da brusone de panícula na cultura do arroz irrigado. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.10, n.1, p. 23-28, 2011.

SILVA, G. B. et al. Estimation of phenotypic diversity in field populations of *Magnaporthe grisea* from two upland rice cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 5-12, 2007.

SILVA, G. B. et al. Use of local rice cultivars as additional differentials to identify pathotypes of *Pyricularia oryzae*. **Bragantia**, São Paulo, v. 70, p. 860-868, 2011.

SOSBAI. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI. 164p, 2011. (Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 5. Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 27.)

TAKAN, J.P. et al. *Magnaporthe oryzae* populations adapted to finger millet and rice exhibit distinctive patterns of genetic diversity, sexuality and host interaction. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.50,p.145–158, 2012.

TALBOT, N.J. et al. Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom

expression. **Physiology Molecular Plant Pathology**, Londres, v.50, p.179–195, 1997.

THARREAU, D. et al. World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 2009. p.209–215

THOME, G.C.H. et al. Melhoramento para resistência parcial a moléstias fúngicas em cereais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p. 365-371, 1999.

TOLEDO, J. ; ESCOBAR, R. **Pyricularia o brusone del trigo**. Santa Cruz, Bolívia: CIAT, 2002. 20p.

YAEGASHI, H.; UDAGAWA, S .The taxonomical identity of the perfect state of *Pyricularia grisea* and its allies. **Can J Bot**, Hong Kong, v.56, p. 180–183, 1978.

VALENT, B.; CHUMLEY, F. G. Genetic analysis of host species specificity in *Magnaporthe grisea*. **Molecular for Crop Protection**, New York, v.4, p.83-93, 1987.

VALENT, B.; CHUMLEY, F. G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Annual Review Phytopathology**, Saint Paul, v.29, p. 443-467, 1991.

VALENT, B.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. **Genetics**, Austin, v.127, p. 87-101, 1991.

VIEIRA, J. et al. **Cultivares de arroz da Epagri**: descrição e caracterização. Florianópolis: Epagri, EPAGRI, 2007. 76p. (**Boletim Técnico**, 138)

WEBSTER, R.K.; GUNNELL, S.P. **Compendium of Rice Diseases**. St. Paul: APS, 1992. 62 p.

XIA, J.Q. et al. DNA fingerprinting to examine micrographic variation in the *Pyricularia grisea* (*Magnaporthe grisea*) population two rice fields in Arkansas. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n.10, p. 1029-1045, 1993.

XU, J. R.; XUE, C. Time for a blast: genomics of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 3, n. 3, p. 173-176, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Londres, v.11, p.11-16, 2002.

ZEIGLER, R. S. et al. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 4, p. 443-451, 1995.

ZHOU, E. Y. et al. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AVR-Pita alters virulence. **Fungal Genetics and Biology**, Oxford, v.6, p.38-49, 2007.