

ALTERAÇÕES DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia oryzae* COLETADOS EM AMOSTRAS DE ARROZ IRRIGADO NO RIO GRANDE DO SUL

Juan Santos da Silva¹; Artur Becker Karnopp²; Caroline Silva Corim³; Débora Favero⁴; Marcelo Gravina de Moraes⁵

Palavras-chave: avirulência, *Pyricularia oryzae*, *Oryza sativa*, mutação

Introdução

A brusone, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae*, é a doença mais importante da cultura do arroz em todo o mundo (FILIPPI et al., 2015). O mecanismo de resistência do arroz à brusone é baseado na interação gene-a-gene, entre genes de resistência (R) da planta e genes de avirulência (AVR) do fungo. Quando o patógeno perde ou modifica esses genes AVR por mutações pontuais, inserções/deleções (*indels*) ou completa ausência gênica, a planta não consegue mais reconhecer o invasor, resultando em falha da resposta de resistência (Valent et al., 2025). A pressão seletiva para que essas alterações se mantenham nas populações de *P. oryzae* ocorre quando se utiliza, por várias safras consecutivas, cultivares com o mesmo perfil de resistência, promovendo a seleção de patótipos virulentos, fator predominante para a contínua quebra de resistência (PRABHU et al., 2002).

A área semeada de arroz no RS se caracteriza pela forte concentração em poucas cultivares. Na safra de 2024/25 a cultivar com maior área semeada no RS, IRGA 424 RI foi responsável por 54,47% da área (IRGA, 2025). Estudos recentes no RS indicam que a maioria das cultivares utilizadas na região compartilha os mesmos genes R, como Piz5 e Pita (IRGA, dados não publicados). Essa uniformidade genética facilita a disseminação de isolados adaptados. O objetivo do presente estudo é comparar as alterações do padrão de virulência de isolados de amostras coletadas somente da cultivar IRGA 424 RI, comparados a isolados representativos do conjunto de cultivares semeadas no RS.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado em casa de vegetação na Estação Experimental do Arroz do IRGA (EEA/IRGA), localizada no município de Cachoeirinha/RS. Foram coletadas 165 amostras de cultivares de arroz com sintomas característicos de *P. oryzae* nas Regiões Orizícolas do Estado entre 2016 e 2024. As amostras coletadas foram encaminhadas para o Laboratório de Fitopatologia do IRGA, onde foram analisadas pelo método de diagnose, para a confirmação da presença de esporos de *P. oryzae*. Confirmando-se a presença de brusone, foi realizado o isolamento monospórico e posterior crescimento do patógeno em meio de cultura à base de FAA (farelo de aveia, água e ágar). Após, o fungo foi repicado e armazenado a uma temperatura de -20°C para posterior inoculação (FUKUTA et al., 2009). Foi selecionado um grupo de linhagens isogênicas contendo genes os seguintes genes de resistência: Pita, Pita2, Pik, Pi-ii, Pizt e Pi9.

As sementes das linhagens foram germinadas em B.O.D por 120 horas e, após esse período, foram transplantadas, individualmente, cinco plântulas de cada cultivar, além do controle, para tubetes de polipropileno atóxico de 290 cm³, contendo substrato. Passados 23 dias do transplante, com as plantas em estágio V3, realizou-se a inoculação. Cada isolado de *P. oryzae* utilizado na avaliação foi previamente incubado em placas com meio de cultura FAA. Para

¹ Acadêmico de Agronomia/UFRGS, bolsista CNPq, Av. Bonifácio Carvalho Bernardes, 1494. Bairro Carlos Wilkens, Cachoeirinha/RS. 94930-030. juansilva.agr@gmail.com

² Acadêmico de Agronomia/UFRGS, bolsista CNPq, arturbeckerufrgs@gmail.com

³ Acadêmica de Agronomia/UFRGS, estagiária CIEE, carol.corim@gmail.com

⁴ Eng^a. Agr^a, Dra., Seção de Melhoramento Genético/IRGA. debora-favero@irga.rs.gov.br

⁵ Eng^o. Agr^o, Dr., Consultor Técnico da Seção de Melhoramento Genético/IRGA. marcelo-moraes@irga.rs.gov.br

a inoculação, foi acrescentada uma solução a base de gelatina incolor, Tween 20 e água destilada nas placas, que foram raspadas com pincel esterilizado, obtendo-se uma suspensão de 20 mL de esporos, a qual foi inoculada utilizando um compressor via aspersão foliar. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas antes e 72 horas após inoculadas de modo a favorecer a infecção do isolado. A avaliação ocorreu 13 dias após a inoculação e teve como base o critério de decisão de resistência à brusone para linhas monogênicas LTH, em escala desenvolvida pelo Centro Internacional de Pesquisa Agrícola do Japão (FUKUTA et al., 2009). As reações foram classificadas como de resistência ou suscetibilidade.

Para a extração de DNA o micélio de *P. oryzae* foi cultivado em caldo de farelo de aveia a 28°C, pH 6,0 e incubado em agitador a 120 rpm por sete dias. O micélio do fungo foi coletado do caldo. O DNA genômico foi extraído usando o método de brometo de cetil-trimetil-amônio (CTAB) e usado nos experimentos (LEE et al., 1988). A concentração de DNA genômico foi determinado no Fluorômetro Qubit3.0 (ThermoScientific Inc, EUA). O PCR para amplificação dos DNAs dos AVR's e a identificação dos fragmentos foram realizados de acordo com CHENG et al. (2020).

Resultados e Discussão

A análise da fenotipagem e genotipagem dos 165 isolados revela uma alteração importante do padrão de virulência quando comparamos os isolados obtidos de amostras da cultivar IRGA 424 RI com os isolados do conjunto das cultivares. Para esta análise, foi avaliada a alteração da funcionalidade, através da fenotipagem da virulência nas linhagens isogênicas, e da presença (ou alteração do fragmento) da região codificante do DNA de 5 genes de *P. oryzae*: AVR-Pii, AVR-Pita, AVR-Pizt, AVR-Pik e AVR-Pi9 - Figuras 1 e 2). O AVR-Pita foi analisado em duas possíveis interações: AVR-Pita x Pi-ta e AVR-Pita x Pi-ta2. A funcionalidade foi verificada através da inoculação em linhagens isogênicas de arroz contendo os respectivos genes R. Isolados sem alterações de um determinado gene e que foram incompatíveis com a linhagem isogênica contendo o respectivo gene R foram considerados funcionais. Já os que não apresentaram alterações nos AVR's através da análise do fragmento, mas foram compatíveis, foram considerados não funcionais, possivelmente devido a casos de mutação pontual. Isolados que não apresentaram o gene AVR (AVR ausente) ou que apresentaram alteração do fragmento (inserção ou deleção do gene AVR), e que ainda apresentaram reações compatíveis com a respectiva linhagem isogênica, também foram considerados não funcionais.

O resultado mais impactante é a ausência de isolados com AVR Pita funcional entre os isolados obtidos somente de IRGA 424 RI. Esse resultado indica principalmente que a perda do gene desse AVR ou, em menor frequência, possíveis mutações podem ter sido uma das causas da quebra de resistência dessa cultivar na safra 2018/19 (MARIOT et al., 2020). Outro caso importante é a redução de isolados funcionais para AVR Pizt entre os coletados de IRGA 424 RI, indicando que esse pode se tratar de uma segunda mutação que tenha causado a perda de resistência dessa cultivar. A maior presença de inserções, deleções e mutações pontuais nos genes AVR-Pita e AVR-Piz-t pode indicar um histórico de uso mais intenso de genes R correspondentes nas cultivares com maior área semeada, levando à seleção de variantes virulentas. Por outro lado, dois genes, AVR Pi-ii e AVR Pi9 apresentam uma maior frequência em isolados de IRGA 424 RI. A ausência de resistência dessa cultivar a esses isolados é um indicativo da ausência dos respectivos genes R em IRGA 424 RI.

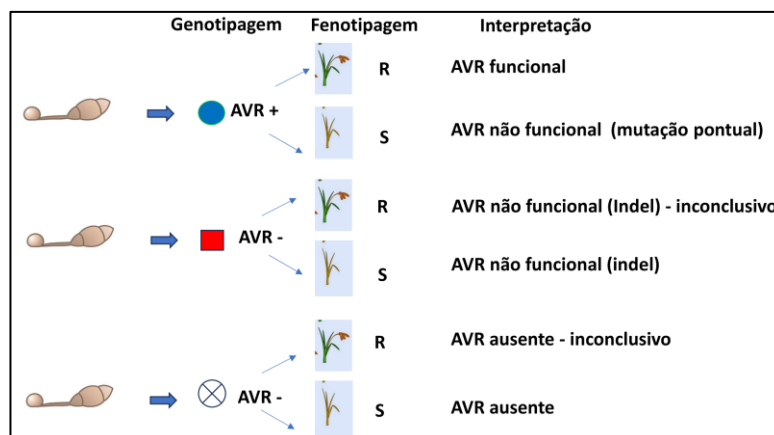


Figura 1. Interpretação das interações entre isolados de *P. oryzae* e linhagens isogênicas.

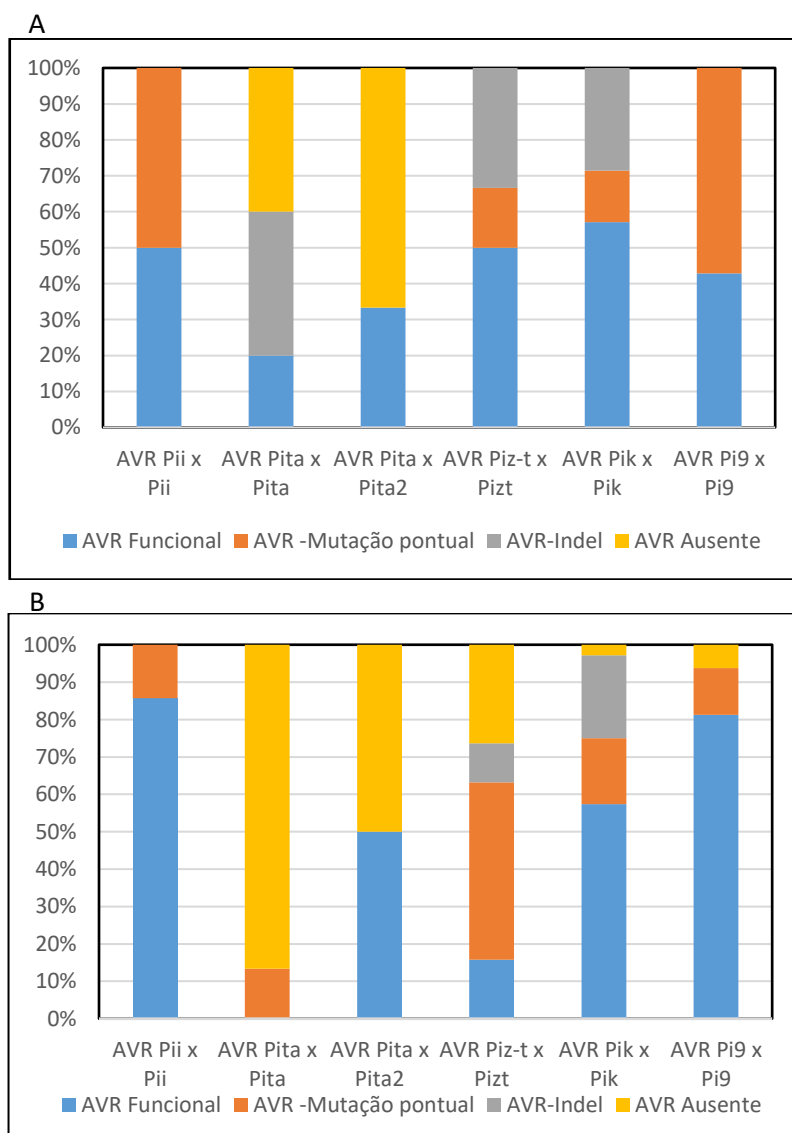


Figura 2. Frequência de funcionalidade de genes AVR de *P. oryzae* Interações entre isolados obtidos de diversas cultivares de arroz irrigado (A) e isolados obtidos da cultivar IRGA 424 RI (B).

Conclusões

Os isolados obtidos de IRGA 424 RI apresentam alteração da virulência em relação aos isolados obtidos de todas as cultivares. Estas alterações explicam a perda de resistência dessa cultivar e indicam a vulnerabilidade de outros genótipos com mecanismos de resistência similar.

Agradecimentos

A toda a equipe da Seção de Melhoramento Genético do IRGA e ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica.

Referências

- CHEN, S. et al. (2020). A Rapid Survey of Avirulence Genes in Field Isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Plant Disease*, 104(3), 717-723.
- FILIPPI, M.C.C. et al. Brusone no arroz. Embrapa Arroz e Feijão-Folder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2015.
- FUKUTA, Y. et al. Genetic characterization of universal differential varieties for blast resistance developed under the IRRI-Japan Collaborative Research Project using DNA markers in rice (*Oryza sativa* L.). JIRCAS Working Report, v. 63, p. 35-68, 2009.
- LEE, S. B. et al. (1988). A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet. Newsl*, 35, 23-24.
- MARIOT, C.H.P.; FAVERO, D.; FONSECA, G.M.; MORAES, M.G. A quebra da resistência à brusone e o manejo de doenças em arroz irrigado. IRGA, Cachoeirinha, 2020, 12p. (Circular Técnica 4).
- VALENT, B. et al. (2025). Dynamic Gene-for-Gene Interactions Undermine Durable Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 38(2):104-117.