

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE PATOGENICA DE *Magnaporthe oryzae* EM DUAS SÉRIES DIFERENCIADORAS

Crispim, Bruna Carla Fagundes¹; Suassuna, Nelson Dias²; Filippi, Marta Cristina de Corsi³; Mello, Raquel Neves⁴

Palavras-chave: patótipos, brusone, melhoramento, irrigado, terras altas,

INTRODUÇÃO

No Brasil, o arroz é cultivado em dois diferentes sistemas de plantio: várzeas e terras altas. Um dos fatores relacionados à baixa produtividade da cultura é o ataque de doenças, principalmente a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* (LIU et al., 2010). A variabilidade elevada das populações é indicada como a principal responsável pela instabilidade das resistências a esse patógeno (KOIZUMI, 2007).

As populações de *M. oryzae* são compostas por raças fisiológicas, ou patótipos, com características distintas de virulência. A diversidade das populações é determinada pela variedade e distribuição dos patótipos, definidos com base nas reações de resistência ou suscetibilidade de uma série internacional, composta por oito cultivares diferenciadoras (ATKINS et al., 1967). Uma série de 29 linhagens isogênicas, derivadas da cultivar japônica suscetível Lijiangxintuanheigu (LTH) e portadoras de 22 genes de resistência, foi desenvolvida a fim de diferenciar a capacidade dos patótipos em suplantar genes de resistência (TSUNEMATSU et al., 2000). O objetivo deste trabalho foi quantificar a diversidade e a complexidade dos patótipos de *M. oryzae* oriundos de sistemas de cultivos de várzeas (irrigado) e de terras altas (sequeiro), utilizando-se a série diferenciadora internacional e a série de linhagens isogênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

A virulência de 57 isolados de *M. oryzae* coletados no ano agrícola 2008/09 foi determinada em casa-de-vegetação. Trinta e oito isolados oriundos do sistema irrigado foram avaliados pela série diferenciadora internacional e, desses, 36 isolados foram testados pela série de linhagens isogênicas LTH. Os outros dois isolados foram eliminados das análises nas linhagens isogênicas em função do elevado número de dados faltantes. Dezenove isolados de terras altas foram analisados nas duas séries. Cada isolado foi cultivado em meio de cultura BDA e, após sete dias, fragmentos de micélio foram transferidos para meio de aveia (VALENT et al., 1986). As placas foram mantidas a 25 °C por 15 dias e, após este período, para indução da esporulação, o micélio foi submetido à estresse por raspagem superficial com alça de vidro. As placas destampadas foram então mantidas sob luz fluorescente por 72 horas. O inóculo foi preparado por meio de inundação das placas de Petri com água destilada e raspagem superficial da cultura. A suspensão de conídios foi quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de 3×10^5 conídios por mililitro.

Cerca de 15 sementes de 16 genótipos das séries diferenciadoras foram plantadas em cada bandeja plástica (30x15x10cm). Quinze dias após a germinação, as plantas de cada bandeja foram inoculadas com 30 ml da suspensão de conídios, utilizando-se um pulverizador deVillbiss. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida entre 19 e 21°C por 24 horas, sendo posteriormente mantidas entre 25 e 29°C e umidade superior à 80%.

¹ Engenheira Agrônoma, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO 462 km 12, 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, berispim@cnpaf.embrapa.br

² Doutor em Fitopatologia, Embrapa Algodão, suassuna@cnpa.embrapa.br

³ Doutora em Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, cristina@cnpaf.embrapa.br

⁴ Doutora em Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, raquelmello@cnpaf.embrapa.br

A avaliação da severidade da doença nas folhas foi realizada sete dias após a inoculação das plantas, utilizando-se a escala de notas de Leung et al. (1988), com modificações: 1 - ausência total de lesões; 2 - pequenas lesões amarronzadas do tamanho de cabeças de alfinete; 3 - lesões pequenas, pouco alongadas e com ausência de esporulação; 5 - lesões típicas, com esporulação abundante, isoladas ou coalescentes; 7 - lesões esporulantes, coalescentes e que ocupam mais de 50% da área foliar; 9 - murcha e morte das folhas.

A diversidade de patótipos foi determinada utilizando-se os índices N_1 (SHANNON e WEAVER, 1949) e G (STODDART e TAYLOR, 1988). Ambos medem o efeito proporcional da abundância e da distribuição dos diferentes patótipos, sendo G inversamente proporcional à N_1 . A riqueza foi estimada utilizando-se curvas de rarefação baseadas no tamanho da amostra da menor população e calculada através do pacote R Vegan (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008). Para avaliar a distribuição das populações, foi adicionado o índice de equitabilidade E_5 (LUDWIG e REYNOLDS, 1988). Utilizando-se o programa computacional SAS macro <jackboot.sas> (disponível on line a partir do SAS Institute, Cary, NC), os patótipos foram submetidos à 1.000 reamostragens (bootstrapping) à um intervalo de confiança de 95%. O programa foi modificado para permitir o cálculo de índices de diversidade, de equitabilidade, intervalos de confiança e de dois índices de complexidade de virulência, C_i e C_p (GRÜNWARD et al., 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade refere-se à variedade específica ou interespecífica em uma determinada comunidade, habitat ou região. Neste trabalho, a população de isolados oriundos do sistema irrigado apresentou maior diversidade do que a população de isolados de terras altas, medida pelos índices N_1 e G , tanto através da série internacional quanto da série composta por linhagens isogênicas (Tabela 1). Para os patótipos oriundos do sistema irrigado, o valor de N_1 , estimado pela série diferenciadora internacional, foi de 21,095 e o valor de G foi de 0,054, enquanto que N_1 para patótipos oriundos do sistema de terras altas foi 4,407 e G foi 0,363. De maneira similar, utilizando-se as linhagens isogênicas, os patótipos oriundos de sistema irrigado apresentaram maior diversidade em ambos os índices ($N_1=26,706$ e $G=0,051$), comparados aos patótipos do sistema de terras altas ($N_1=12,44$ e $G=0,108$).

A diversidade também pode ser medida através de dois índices: riqueza (número de patótipos presentes em um determinado ambiente) e equitabilidade (distribuição dos patótipos no ambiente). Também nesse caso, tanto para a série internacional quanto para as linhagens isogênicas, foi detectada maior diversidade na população de isolados do sistema irrigado do que na população de terras altas, tanto pela riqueza de patótipos (respectivamente, 24 e 8 patótipos, pela série internacional, e 31 e 15 patótipos, pelas linhagens isogênicas) quanto pela equitabilidade (respectivamente, $E_5=0,872$ e $E_5=0,515$, pela série diferenciadora, e $E_5=0,725$ e $E_5=0,722$, pelas linhagens isogênicas).

Embora tenha sido detectada menor diversidade dos isolados oriundos de cultivos de terras altas, esses isolados foram capazes de suplantam mais genes de resistência do que os isolados de sistema irrigado, conforme medido pelos índices de complexidade C_i , que avalia o número médio de genes de virulência por isolado, e C_p , que considera o número médio de alelos de virulência por patótipo. Por esses índices, os isolados do sistema de terras altas apresentaram valores de $C_i=6,32$ e de $C_p=5,5$, utilizando-se a série de diferenciadoras internacionais, e de $C_i=26,32$ e de $C_p=25,6$, com as linhagens isogênicas, enquanto os isolados do sistema irrigado apresentaram $C_i=4,16$ e $C_p=3,67$, utilizando-se a série de diferenciadoras internacionais, e $C_i=24,03$ e $C_p=23,23$, com as linhagens isogênicas.

Uma estrutura genética altamente variável é a principal característica das populações de *M. oryzae* em todo o mundo (THARREAU et al., 2009). Tanto a série diferenciadora internacional quanto as linhagens isogênicas foram capazes de captar essa variabilidade nas populações nacionais. Adicionalmente, os resultados aqui obtidos indicam alta complexidade das populações, o que frequentemente é atribuído à instabilidade genética desse patógeno e à perda

de genes de avirulência (THARREAU et al., 2009). Entretanto, a constituição dos genes de resistência e a consequente pressão de seleção sobre os genes de avirulência somente explicam uma pequena parte do mecanismo associado ao padrão aqui observado de variação patogênica, uma vez que a maioria das cultivares de arroz plantadas comercialmente no Brasil não apresenta genes maiores de resistência à *M. oryzae*. Ao lado da pressão de seleção, mutação e migração têm sido apontadas como as principais forças atuando na geração de novas virulências em *M. oryzae* (THARREAU et al., 2009; LIU et al., 2010). Nosso entendimento, no entanto, de como esses mecanismos atuam na geração e na distribuição de novos patótipos e, consequentemente, participam da formação da variabilidade genética de populações desse patógeno nas regiões produtoras e nos sistemas de cultivo nacionais, permanece limitado.

Tabela 1. Diversidade de patótipos em diferentes populações de *Magnaporthe oryzae*, utilizando-se duas séries de plantas diferenciadoras.

Estatística	Série Internacional ⁽¹⁾		Total	Linhagens Isogênicas ⁽²⁾		Total
	Irigado	Terras Altas		Irigado	Terras Altas	
Tamanho da população	38	19	57	36	19	55
Índices de Riqueza						
g_{obs} ⁽³⁾	24	8		31	15	
g_{max}	256	256		229	229	
Índices de diversidade						
N_f	21,095 (17,619–24,572) ⁽⁴⁾	4,407 (2,537–6,278)		26,706 (22,213–31,199)	12,44 (9,445–15,435)	
G	0,054 (0,029–0,079)	0,363 (0,146–0,580)		0,051 (0,013–0,089)	0,108 (0,021–0,195)	
Índices de equitabilidade						
E_s	0,872 (0,776–0,967)	0,515 (0,346 – 0,685)		0,725 (0,559-0,891)	0,722 (0,547-0,897)	
Índices de complexidade						
C_i	4,16	6,32	4,88	24,03	26,32	24,82
C_p	3,67	5,5	4,35	23,23	25,6	23,72

⁽¹⁾ Raminad, Zenith, NP125, Usen, Dular, Kanto51, ShaTioTsao e Caloro

⁽²⁾ IRBLac-A (*Pia*), IRBLac-C (*Pia*), IRBLi-F5 (*Pij*), IRBLks-F5 (*Pik-s*), IRBLks-S (*Pik-s*), IRBLk-Ka (*Pik*), IRBLkp-K60 (*Pik-p*), IRBLz-Fu (*Piz*), IRBLz5-CA (*Piz-5*), IRBLzt-T (*Piz-t*), IRBLta-K1 (*Pita*), IRBLt-K59 (*Pit*), IRBLsh-S (*Pish*), IRBLsh-B (*Pish*), IRBL1-CL (*Pit*), IRBL3-CP4 (*Piz*), IRBL5-M (*Pis*), IRBL7-M (*Pit*), IRBL9-W (*Piz(t)*), IRBL12-M (*Piz(t)*), IRBL19-A (*Piz(t)*), IRBLkm-Ts (*Pik-m*), IRBL20-IR24 (*Piz(t)*), IRBLta2-Pi (*Pita-2*), IRBLta2-Re (*Pita-2*), IRBLta-CP1 (*Pita*), IRBL11-Zh (*Piz(t)*), IRBLz5-CA (*Piz-5*) e LTH

⁽³⁾ g_{obs} , número de patótipos observados; g_{max} , número máximo de patótipos esperados

⁽⁴⁾ Intervalo de confiança calculado por "bootstrapping", utilizando-se n da menor população

CONCLUSÃO

As populações de *M. oryzae* de sistema irrigado apresentam maior diversidade de patótipos, enquanto as populações de terras altas apresentam complexidade mais elevada, quando analisadas tanto através da série diferenciadora internacional quanto das linhagens isogênicas. Apesar dessas diferenças, ambas as populações apresentam altas variabilidade e complexidade, o que torna vulnerável qualquer resistência que venha a ser utilizada no campo.

O monitoramento da estrutura das populações de *M. oryzae* e a avaliação da dinâmica temporal dos genes de avirulência no campo providenciarão ferramentas valiosas para a previsão da emergência de novas virulências. Essas informações, somadas ao conhecimento dos genes de resistência disponíveis para os programas de melhoramento, deveriam constituir a base da tomada de decisão para os programas visando resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINS, J.G.; ROBERT, A.L.; ADAIR, C.R.; GOTO, K.; KOZAKA, T.; ANAGITA, R.; YAMADA, M.; MATSUMOTO, S. An international set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, v.57, p.297-301, 1967.
- GRÜNWARD, N.J.; GOODWIN S.B.; MILGROOM, M.G.; FRY, W.E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, v.93, p.738-746, 2003.
- KOIZUMI, S. Durability of resistance to rice blast disease. In: FUKUTA, Y.; VERA CRUZ, C.M.; KOBAYASHI, N. (Ed.). **JIRCAS Working Report no. 53: A differential system for blast resistance for stable rice production environment**. Tsukuba: JIRCAS, 2007. p.1-15.
- LEUNG, H.; BORROMEO, E.S.; BERNARDO, M.A.; NOTTENGHEN, J.L. Genetic analysis of virulence in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, v.78, p.1227-1233, 1988.
- LIU, J.; WANG, X.; MITCHELL, T.; HU, Y.; LIU, X.; DAI, L.; WANG, G. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice – *Magnaporthe oryzae* interaction. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p.419-427, 2010.
- LUDWIG, J.A.; REYNOLDS, J.F. **Statistical Ecology: a primer on methods and computing**. 1st. ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 337p.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <<http://www.R-project.org>>. 2008.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. 1st. ed. Urbana: University of Illinois Press, 1949. 117p.
- STODDART, J.A.; TAYLOR J.F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**, v.118, p.705-711, 1988.
- THARREAU, D.; FUDAL, I.; ANDRIANTSIMIALONA, D. SANTOSO; UTAMI, D.; FOURNIER, E.; LEBRUN, M.; NOTTENGHEM, J. World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. In: WANG, G.; VALENT, B. (Ed.). **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease**. Dordrecht: Springer, 2009. p.209-215.
- TSUNEMATSU, H.; YANORIA, M.J. T.; EBRON, L.A.; HAYASHI, N.; ANDO, I.; KATO, H.; IMBE, T.; KHUSH, G.S. Development of monogenic lines of rice for blast resistance. **Breeding Science**, v.50, p.229-234, 2000.
- VALENT, B.; CRAWFORD, M.S.C.; WEAVER, G.; CHUMLEY, F.G. Genetic studies of pathogenicity and fertility of *Magnaporthe grisea*. **Iowa State Journal of Research**, v.60, p.569-594, 1986.