

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

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE DE *Magnaporthe grisea*
NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

KLAUS KONRAD SCHEUERMANN
Engenheiro Agrônomo (UDESC)

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro, 2002

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ademir A. Scheuermann e Norma L. Moreira Scheuermann, que estiveram sempre comigo ao longo de minha caminhada incentivando-me a continuar.

Ao Prof. Marcelo G. de Moraes, pela orientação e ensinamentos em biologia molecular.

Aos meus amigos Anderson F. Wamser e Alvadi A. Balbinot Jr., pelo convívio e amizade.

Aos pesquisadores Lucas Miura, José Ângelo Rebelo e João Maciel pelo apoio prestado na realização deste projeto.

Aos colegas de laboratório Mariluci Disconzi, Alex Corrêa, Marcos Vinicius, Grasiela Agnes, Priscila N. Antunes, Precila Lopes, Paulo Gomes, Leandro Hillebrand e Fernanda C. Leite, pelo convívio e auxílio científico.

A CAPES, pela bolsa concedida.

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

ANÁLISE DA VARIABILIDADE DE *Magnaporthe grisea* NO ESTADO DE SANTA CATARINA^{1/}

Autor: Klaus Konrad Scheuermann

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

A rápida perda da resistência das cultivares de arroz à brusone, causada por *Magnaporthe grisea* (Herb.) Barr, é geralmente atribuída à variabilidade genética do patógeno ou ainda à ocorrência de escape durante a seleção de novas cultivares. Com o objetivo de caracterizar a estrutura genética de um grupo de isolados de *M. grisea* em Santa Catarina (SC), plantas com sintomas de brusone foram coletadas em 12 municípios e na Estação Experimental da Epagri em Itajaí (EEI), SC. Os isolados foram analisados através de rep-PCR baseado no transposon *Pot-2*. Para a identificação das raças, um subgrupo de isolados foi inoculado na série internacional de cultivares diferenciais de arroz. As raças identificadas tiveram seu espectro de virulência avaliado em um grupo de cultivares com genes de resistência conhecidos (isolinhas). Isolados que apresentaram características genéticas distintas, foram avaliados quanto a capacidade de recombinação parassexual. Noventa e dois isolados monoconidiais obtidos foram agrupados através de rep-PCR em 13 haplótipos e 2 linhagens. Nove haplótipos encontrados na amostragem dos municípios não foram encontrados na EEI, indicando a ocorrência de escape. Seis raças de *M. grisea* foram identificadas a partir da inoculação de 28 isolados, representando 12 haplótipos na série diferencial, sendo que, 5 destas, foram avirulentas à isolinha que possui os genes de resistência *Pi-1* e *Pi-11*. Por outro lado, o isolado 25, agrupado na raça IA-65, superou 4 das 5 isolinhas testadas. A análise da capacidade de recombinação parassexual mostra a existência de compatibilidade vegetativa associado à ocorrência de anastomoses entre três haplótipos, sendo identificados três possíveis isolados recombinantes.

^{1/} Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (p.73). Fevereiro de 2002.

VARIABILITY ANALYSIS OF *Magnaporthe grisea* IN THE SANTA CATARINA STATE ^{1/}

Author: Klaus Konrad Scheuermann

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

SUMMARY

The short-lived resistance to rice blast, caused by *Magnaporthe grisea* (Herb.) Barr, is either attributed to genetic variability of the pathogen or the occurrence of escape during cultivar resistance selection. In order to characterize the genetic structure of a group of isolates of *M. grisea* in the Santa Catarina State (SC), rice plants with blast symptoms were collected in 12 counties and in the Experimental Station of Epagri (EEI), at Itajaí, SC. The isolates were analyzed by rep-PCR based on the *Pot-2* transposon. For this purpose, a subgroup of isolates was inoculated in the rice international set of differentials. The identified races were evaluated in a group of cultivars with known resistance genes (near-isogenic lines). Isolates with distinct genetic characteristics were evaluated for the occurrence of parasexual recombination. Ninety-two monoconidial isolates were grouped by rep-PCR in to 13 haplotypes and 2 lineages. Nine haplotypes that were found among the samples from the counties were not found in the EEI. This indicative that escape may be playing an important role. Six races of *M. grisea* were identified from the inoculation of 28 isolates (12 haplotypes) in the differential set, 5 were avirulent to the near isogenic line that contains the resistance genes *Pi-1* and *Pi-11*. In contrast, the isolate 25, grouped as the race IA-65, is compatible with all, except one, near isogenic line that were used. Parasexual recombination analysis shows vegetative compatibility in the pairing of three haplotypes. Analysis of anastomosis of these pairings indicates the presence of three putative recombinant isolates.

^{1/} M.Sc. Dissertation in Crop Science (Fitotecnia), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (p.73). February 2002.

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO I	1
1.1. Revisão Bibliográfica	1
1.1.1. A Brusone na orizicultura	1
1.1.1.1. O patógeno	2
1.1.1.2. Fatores predisponentes	4
1.1.1.3. Gama de hospedeiros	5
1.1.1.4. Controle	6
1.1.2. Interação planta-patógeno	7
1.1.2.1. Mecanismos de Variabilidade genética	9
1.1.3. Metodologias de análise populacional	13
1.1.3.1. Estudos populacionais	16
2. CAPÍTULO II	21
Análise molecular da variabilidade genética de isolados de <i>Magnaporthe grisea</i> em cultivares de arroz (<i>Oryza sativa</i>) no Estado de Santa Catarina.	
2.1. Introdução	23
2.2. Materiais e Métodos	24
2.2.1. Amostragem e obtenção dos isolados	24
2.2.2. Extração do DNA	25
2.2.3. Rep-PCR	26
2.2.4. Análise de agrupamento	27
2.2.5. Testes de virulência	27
2.3. Resultados e Discussão	30
3. CAPÍTULO III	42
Variabilidade genética de <i>M. grisea</i> e sua relação com a eficiência de genes de resistência à brusone.	
3.1. Introdução	42
3.2. Materiais e Métodos	45
3.2.1. Testes de virulência	45
3.2.2. Pareamento dos isolados	45
3.2.3. Extração do DNA e análise de recombinação	46
3.3. Resultados e Discussão	47
4. CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
6. APÊNDICES	67

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO II

	Página
1. Escala de notas utilizada para avaliar o espectro de virulência dos isolados.	29
2. Distribuição dos haplótipos de <i>M. grisea</i> obtidos por rep-PCR em SC.	37
3. Resumo das reações à inoculação de 6 raças de <i>M. grisea</i> encontradas em SC na série diferencial de cultivares de arroz ...	39
4. Comparação entre um agrupamento realizado através de inoculação em uma série diferencial de cultivares de arroz e a análise molecular por rep-PCR de 28 isolados	41

CAPÍTULO III

5. Reações de 6 raças de <i>M. grisea</i> identificadas em SC em isolinhas de arroz	49
6. Reações de 28 isolados de <i>M. grisea</i> inoculados na série diferencial de cultivares de arroz e em 3 cultivares comerciais utilizadas em SC	52

APÊNDICES

1. Composição do meio de cultura empregado para produção de micélio de <i>M. grisea</i>	70
2. Mapa de SC indicando os municípios amostrados	69
3. Matriz dos coeficientes de similaridade obtida através da análise por rep-PCR de 73 isolados de <i>M. grisea</i> coletados em 12 municípios no Estado de SC	70
4. Matriz dos coeficientes de similaridade obtida através da análise por rep-PCR de 19 isolados de <i>M. grisea</i> coletados na Estação Experimental da Epagri em Itajaí-SC.	73

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO II

	Página
1. Perfis moleculares de 13 haplótipos de <i>M. grisea</i> (A-M) caracterizados por rep-PCR.....	31
2. Frequência de 13 haplótipos de <i>M. grisea</i> identificados a partir de amostragem de 12 municípios de SC e do viveiro de infecção da EEI.....	34
3. Fenograma de 73 isolados de <i>M. grisea</i> , provenientes de 12 municípios catarinenses.....	35
4. Fenograma de 19 isolados de <i>M. grisea</i> , provenientes da EEI	36

CAPÍTULO III

5. Pareamento de colônias dos haplótipos D e F em meio de cultura	53
6. Fusão de hifas de <i>M. grisea</i> obtida do pareamento dos haplótipos D x E.....	53
7. Padrões moleculares dos haplótipos D, E, e de um isolado resultante do pareamento entre D e E.	55

3. CAPÍTULO III

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *M. grisea* E SUA RELAÇÃO COM A EFICIÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA À BRUSONE

3.1. INTRODUÇÃO

A durabilidade da resistência das cultivares de arroz à brusone, causada pelo fungo *M. grisea*, é um fator importante para a manutenção da estabilidade da produção arrozeira. A principal estratégia utilizada nos programas de melhoramento de arroz tem sido a avaliação dos genótipos sob condições de alta pressão de inóculo do fungo nos viveiros de infecção (Ou, 1963). A manutenção da diversidade de *M. grisea* nestes viveiros é estabelecida com base em estudos populacionais obtidos através da inoculação de isolados do fungo em cultivares diferenciais (Ling & Ou, 1969) ou, mais recentemente, através de análises moleculares da população com o uso de marcadores como MGR 586 (Hamer et al., 1989) e *Pot-2* (Kachroo et al., 1994). As raças e linhagens do patógeno identificadas não apresentam um padrão de virulência característico quando inoculadas em cultivares contendo genes de resistência conhecidos (Zeigler et al., 1995). Segundo Zeigler et al. (1995), os isolados deveriam ser agrupados de acordo com sua reação em um grupo de cultivares com genes de resistência conhecidos, assim cada grupo formado teria um padrão de virulência característico em relação às cultivares contendo os respectivos genes de resistência, facilitando a utilização dos genes pelos

programas de melhoramento. Mackill & Bonman (1992), desenvolveram um grupo de linhas quase isogênicas de plantas de arroz (isolinhas), denominadas C101LAC, C101A51, C104PKT, C101PKT e C105TTP, que possuem os genes de resistência *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-3*, *Pi-4a* e *Pi-4b*, respectivamente. Segundo Correa-Victoria (comunicação pessoal) a isolinha C101LAC possui também o gene *Pi-11*. Estas, e outras isolinhas com genes de resistência conhecidos, se constituem em uma ferramenta útil para os programas que buscam resistência à brusone. Além disso, elas também são importantes em estudos populacionais de *M. grisea* (Chen et al., 1995; Zeigler et al., 1995; Mekwatanakarn et al., 2000; Filippi & Prabhu, 2001), pois permitem a seleção de genes de resistência efetivos contra todos os membros de uma mesma linhagem. Através da combinação de genes que venham a conferir resistência contra todas as linhagens de uma população seria possível a execução da assim denominada “exclusão de linhagens” (Zeigler et al., 1994).

Além de conhecer o comportamento da população do patógeno em relação aos diferentes genes de resistência, é importante também conhecer os mecanismos envolvidos na variabilidade do mesmo, a fim de obter-se uma maior durabilidade da resistência, tornando-a um método mais eficiente para o controle da doença. Entre esses mecanismos, estão a recombinação parassexual, já obtida sob condições controladas (Zeigler et al., 1997), cujo impacto na dinâmica populacional de *M. grisea* na natureza ainda é pouco conhecido. Zeigler et al. (1997), estudando a recombinação parassexual em condições de laboratório, observaram que a ocorrência desse evento é precedida pela formação de tufos miceliais na região de encontro das colônias

entre isolados geneticamente distintos, seguido pela formação de anastomoses. A presença de anastomoses também foi observada entre isolados coletados no campo, indicando que a recombinação parassexual poderia ser um mecanismo importante na variabilidade deste patógeno.

Em SC, apesar da baixa variabilidade genética da população de *M. grisea* (Capítulo 2), a resistência à brusone tem sido eficiente por apenas 3-4 anos após o lançamento de novas cultivares (Epagri, 1998). Embora o escape contribua de modo importante para este fenômeno, não pode ser descartada a possibilidade da ocorrência de mecanismos de variabilidade genética, entre os quais a recombinação parassexual, que poderiam alterar o espectro de virulência dos isolados.

O objetivo do presente trabalho é avaliar o padrão de virulência dos haplótipos e raças de *M. grisea* identificadas em SC em um grupo de cultivares com genes de resistência conhecidos e verificar a ocorrência de recombinação parassexual entre isolados com perfis moleculares e padrões de virulência distintos.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Testes de virulência

Dez isolados representando 6 raças de *M. grisea* identificadas em SC (Capítulo 2) foram inoculados nas isolinhas de arroz: C101LAC, C101A51, C104PKT, C101PKT, C105TTP (Mackill & Bonman, 1992). A esta série foram agregadas as cultivares comerciais Epagri-106, Epagri-108 e Epagri-109 além dos controles Fanny (suscetível) e Oryzica Llanos 5 (resistente). A semeadura foi realizada em vasos plásticos ($V=500\text{ cm}^3$) contendo uma mistura de solo e substrato Eucatex (1:1 v:v). As plantas receberam aplicação de nitrogênio na forma de uréia equivalente a $100\text{ Kg de N.ha}^{-1}$, sendo fornecido 50% da dose no momento da semeadura e o restante 20 dias após.

Para a produção de inóculo, os isolados foram transferidos para placas de Petri com meio de farinha de arroz (Capítulo 2, item 2.2.1) e crescidos por 12-14 dias a 28 °C sob 12 h de luz. Após esse período o micélio superficial foi removido com auxílio de um pincel e as colônias lavadas com água destilada. As placas foram cobertas com um filme plástico transparente perfurado e mantidas nas mesmas condições por 4-6 dias a fim de estimular a esporulação.

As inoculações foram realizadas com 3 repetições, sendo que os procedimentos empregados estão descritos no item 2.2.5.

3.2.2. Pareamento dos isolados

A compatibilidade vegetativa, foi analisada selecionando-se 5 isolados representando 5 haplótipos (A, B, D, E e F) os quais foram transferidos aos pares para placas de Petri contendo meio de cultura de farinha de arroz (2

repetições) e crescidos por 7-10 dias (28 °C) sob um fotoperíodo de 12 h. As combinações que formaram tufo miceliais na região de encontro das colônias, foram selecionadas e pareadas sobre lâminas de vidro inseridas em placas de Petri contendo meio agar-água e crescidas por 5 dias nas mesmas condições anteriores. A presença de anastomoses, foi observada em microscópio óptico, sob aumento de 100X, isoladas, transferidas para placas de Petri com meio de cultura de farinha de arroz e crescidas durante 7 dias. A fim de obter-se isolamentos puros, foram isoladas pontas de hifas de cada colônia e transferidas para novas placas contendo meio de cultura de farinha de arroz.

3.2.3. Extração do DNA e análise de recombinação parassexual

Os procedimentos adotados para extração, amplificação do DNA dos isolados e eletroforese dos produtos de DNA amplificados estão descritos nos itens 2.2.2 e 2.2.3 do Capítulo 2.

Para a análise de recombinação, os produtos amplificados dos isolados resultantes de compatibilidade vegetativa e de seus parentais, foram separados em um mesmo gel de eletroforese, para facilitar a identificação de fragmentos de DNA que sofreram recombinação.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação das raças IA-65, IB-33, IB-37, IB-41, IB-45 e II-1 de *M. grisea*, oriundas do levantamento populacional realizado em SC (Capítulo 2), em um grupo de isolinhas, mostra que nenhuma destas raças foi capaz de infectar todas as isolinhas testadas. Por outro lado, nenhum dos genes de resistência contido nas isolinhas foi efetivo contra todas as 6 raças inoculadas (Tabela 5). A isolinha C101LAC, talvez por apresentar 2 importantes genes de resistência, *Pi-1* e *Pi-11*, foi resistente a 5 das 6 raças testadas, porém mostrou-se suscetível à raça IA-65. Já a isolinha C105TTP, que possui o gene de resistência *Pi-4b* foi somente resistente à raça IA-65.

Em um estudo populacional realizado em Goiás, onde também predominam raças do grupo IB, verificou-se que o gene de resistência de maior importância para o controle da população de *M. grisea* que ocorre nesta região é o *Pi-2*, o qual conferiu resistência a 76,1% dos isolados testados. Neste mesmo trabalho, as isolinhas que apresentam os genes de resistência *Pi-1* e *Pi-11* foram somente resistentes a 55,1% dos isolados testados (Filippi & Prabhu, 2001). Resultados similares foram obtidos por Chen et al. (1995) nas Filipinas, onde o gene *Pi-2* conferiu resistência contra 9 das 10 linhagens de *M. grisea* testadas. De acordo com esses resultados, observam-se variações na eficiência dos diferentes genes de resistência utilizados dependendo da estrutura populacional do patógeno predominante em cada região.

Os programas de melhoramento de arroz, que visam a obtenção de resistência à brusone, têm buscado principalmente a incorporação de genes

que conferem resistência contra um grande número de raças ou linhagens de uma população. Entretanto, de acordo com os resultados de inoculação do presente trabalho, a obtenção de resistência contra as 6 raças de *M. grisea* encontradas em SC seria possível somente se uma cultivar contivesse os genes *Pi-1*, *Pi-11* e *Pi-4b*, sendo que o último gene foi o único que conferiu resistência contra a raça IA-65. Segundo Zeigler et al. (1994), a piramidização de genes de resistência que exclua toda população do patógeno em uma determinada região, é uma das principais alternativas para a obtenção de resistência durável à brusone. Entretanto, cultivares que têm sua resistência baseada somente em genes que governam a interação específica com determinadas raças do patógeno (genes de efeito maior), podem tornar-se suscetíveis quando o conjunto destes genes é superado (Van der Plank, 1968). Em função disso, é importante que a piramidização destes genes seja realizada em cultivares que apresentem níveis elevados de resistência parcial (condicionada por genes de efeito menor) aumentando, deste modo, a estabilidade da resistência (Zeigler et al., 1994). Alternativamente, cultivares que possuam genes de efeito maior poderiam ser manejadas de forma a exercer uma menor pressão de seleção sobre o patógeno, mantendo-se deste modo estáveis os níveis de resistência à brusone no campo (Crill et al., 1981). Por outro lado, pode permitir com que os genes de resistência disponíveis sejam facilmente superados individualmente, inviabilizando um conjunto de genes que dificilmente seriam superados caso utilizados de forma combinada.

Uma segunda alternativa, é o uso de multilinhas, ou seja, cultivares contendo diferentes genes de resistência (Zhu et al., 2000). Entretanto, as

R= Reação de resistência (notas de 0-3)

S= Reação de suscetibilidade (nota ≥ 4)

A inoculação de 28 isolados de *M. grisea* na série diferencial para identificação das raças, revela que o isolado 25 (haplótipo E), infecta 7 das 8 cultivares da série diferencial, além de infectar também as cultivares comerciais Epagri-108 e Epagri-109 (Tabela 6), e as isolinhas C101LAC, C101A51, C104PKT, C101PKT. Portanto, os genes de resistência *Pi-a*, *Pi-k*, *Pi-k^a*, *Pi-k^s*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-3*, *Pi-4a* e *Pi-11* não são efetivos para a resistência ao isolado 25. Somente a cultivar Zenith, a qual possui além do gene de resistência *Pi-a*, os genes *Pi-z* e *Pi-i*, e a isolinha C105TTP, que possui o gene *Pi-4b*, foram resistentes ao isolado 25. Este isolado apresenta uma similaridade inferior a 40% em relação aos demais 91 isolados analisados por rep-PCR no estudo populacional realizado em SC, sendo agrupado em uma linhagem distinta (Figura 3, Capítulo 2). Esta diferença também foi detectada durante a inoculação na série diferencial, sendo o único isolado a ser agrupado em uma raça do grupo IA (Tabela 4, Capítulo 2). No Brasil, a ocorrência de isolados desse grupo, é descrita em levantamentos populacionais realizados nos estados de Goiás (Filippi & Prabhu, 2001) e do Rio Grande do Sul (RS) (Ribeiro & Terres, 1987), sendo que no último, foram identificadas 17 raças do grupo IA, incluindo a raça IA-65. Entretanto, no trabalho realizado no RS não são mencionadas alterações no padrão de virulência de isolados da raça IA-65 pois as inoculações foram realizadas somente nas cultivares que compõem a série diferencial.

Alguns mecanismos de instabilidade genética com potencial de alterar a função de genes de avirulência do patógeno têm sido descritos em *M. grisea*

(Hebert, 1971; Zeigler et al., 1998; Kang et al., 2001). Quatro, dos 8 genes de avirulência mapeados em *M.grisea*, estão localizados em regiões teloméricas e sub-teloméricas dos cromossomos (Dioh et al., 2000). Em leveduras, essas regiões cromossomais estão sujeitas a freqüentes rearranjos ou silenciamento de genes (Gottschiling, 1992; Louis et al., 1994). Esta instabilidade genética também é relatada no locus sub-telomérico Avr2-Yamo em *M. grisea*, onde é observada uma alta freqüência de mutações envolvendo ganho de virulência (Valent & Chumley, 1994). Neste locus, 60% das mutações espontâneas para ganho de virulência se devem à deleções de regiões terminais dos cromossomos que não afetam a viabilidade ou a patogenicidade do fungo (Valent & Chumley, 1994). A localização de genes de avirulência em regiões não essenciais dos cromossomos, poderia explicar o freqüente aparecimento de novas raças virulentas de *M. grisea*.

Um outro possível mecanismo envolvido na alteração do espectro de virulência de *M. grisea*, deve-se à atividade de elementos de transposição (transposons). Estes são apontados, em alguns casos, como a causa de aberrações cromossomais tais como, deleções, inversões, duplicações e translocações (Rothstein et al., 1987). Kang et al. (2001), estudando mutantes de *M. grisea* para ganho de virulência em cultivares de arroz que apresentavam o gene de resistência *Pi-ta*, concluíram que em em 3 dos 11 mutantes analisados, o ganho de virulência foi condicionado pela inserção de um transposon da família *Pot-3* na região localizada entre o promotor e seqüência codificante do gene Avr *Pi-ta*. Além dos mecanismos citados acima, é postulado que a recombinação parassexual pode estar envolvida na

manutenção da diversidade populacional de *M. grisea* (Kumar et al., 1999). No presente trabalho, a análise de 10 combinações de isolados, representando os haplótipos A, B, D, E e F, revelou a existência de compatibilidade vegetativa, visualizada através da formação de tufos miceliais na região de encontro das colônias, entre as combinações D x F, D x E e E x F (Figura 5). A formação de anastomoses, que é uma etapa que precede o processo de recombinação parassexual (Fatemi, et al., 1978), foi observada 5 dias após o pareamento dos isolados em meio de cultura ágar-água (Figura 6).

Tabela 6. Reações de 28 isolados de *M. grisea* inoculados na série diferencial de cultivares de arroz e em 3 cultivares comerciais utilizadas em SC.

Isolado	Raça	Cultivares ^a										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I-25	IA-65	+	-	+	+	+	+	+	+	*	+	+
I-53	IB-33	-	+	-	+	+	+	+	+	*	+	-
I-35	IB-37	-	+	-	+	+	-	+	+	*	+	-
I-63	IB-37	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
I-64	IB-41	-	+	-	+	-	+	+	+	*	+	+
I-67	IB-41	-	+	-	+	-	+	+	+	*	+	+
I-54	IB-41	-	+	-	+	-	+	+	+	*	+	-
I-71	IB-41	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
I-10	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	-
I-14	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
I-23	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-26	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-28	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-31	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
I-32	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-33	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-42	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-62	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-68	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-74	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	-
EEl-14	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
EEl-16	IB-45	-	+	-	+	-	-	+	+	*	+	+
I-06	II-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I-21	II-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I-22	II-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I-30	II-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I-34	II-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I-37	II-1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

+ = Reação de suscetibilidade (nota ≥ 4); - = Reação de resistência (notas de 0-3)

* Não inoculado na respectiva cultivar

^a Código das cultivares: 1-Raminad str.3; 2-Zenith; 3-NP-125; 4-Usen; 5-Dular; 6-Kanto 51; 7-Sha-tiao-tsao; 8-Caloro; 9-E-106; 10-E-108; 11-E-109

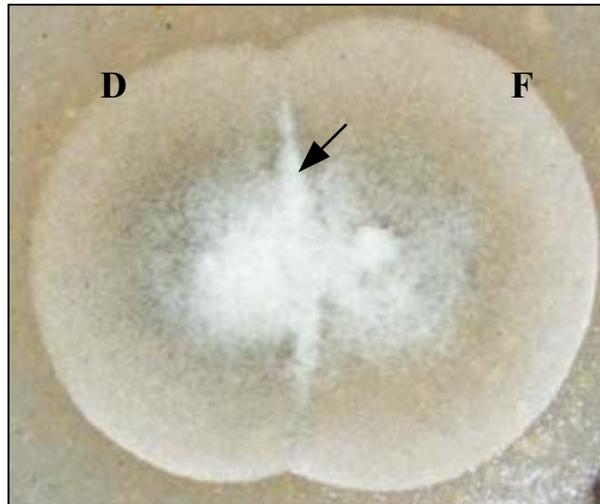


Figura 5. Pareamento de colônias dos haplótipos D e F em meio de cultura. A seta indica a formação de tufos miceliais na região entre as colônias.



Figura 6. Fusão de hifas de *M. grisea* obtida do pareamento dos haplótipos D x E. As hifas foram coradas com lactofenol e azul de tripan (1%).

Considerando o amplo espectro de virulência verificado nos testes com o isolado 25 (haplótipo E), é importante avaliar a capacidade de recombinação parassexual entre este e os demais haplótipos que compõem a população de *M. grisea* em SC. Ao analisarmos a possibilidade de recombinação em 15 isolados obtidos mediante o isolamento de anastomoses provenientes de pareamentos entre os haplótipos D x E, identificou-se três isolados com características comuns a ambos os parentais, sendo um indicativo da ocorrência de heterocariose (Figura 7). Além dos fragmentos comuns a pelo menos um dos isolados parentais, são observados também, fragmentos de DNA distintos de ambos os parentais nos três isolados. Tendo em vista, que a análise dos isolados baseia-se na distribuição do transposon *Pot-2* ao longo do genoma, é possível que tenham ocorrido novas transposições desse elemento durante o período em que os isolados permaneceram em meio de cultura, o que poderia explicar a presença dos fragmentos de DNA até então não observados. Alternativamente, a presença destes fragmentos pode decorrer de eventos de recombinação mitótica em regiões cromossômicas que contenham o elemento *Pot-2*, alterando as distâncias genéticas entre essas cópias.

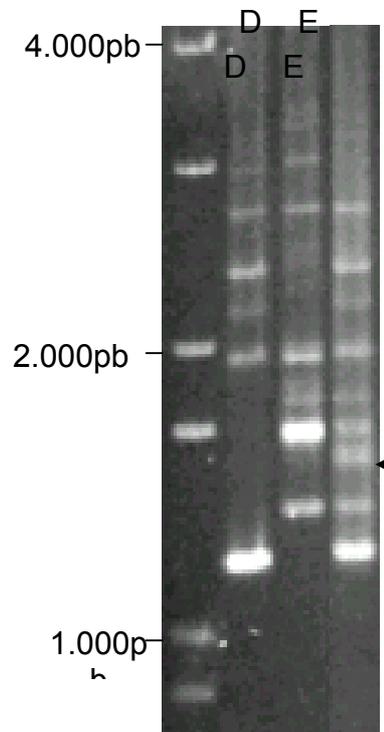


Figura 7. Padrões moleculares dos haplótipos D, E, e de um isolado resultante do pareamento entre D e E. A seta indica um fragmento de DNA ausente em ambos os pararentais.

É possível que a recombinação parassexual possa ser um dos mecanismos envolvidos na variabilidade de *M.grisea* em SC, tendo implicação nas estratégias de controle recomendadas. Tem sido proposto que um amplo espectro de resistência pode ser desenvolvido pela combinação de genes de resistência que excluam toda a população do patógeno (Zeigler et al., 1994). Entretanto, caso a recombinação parassexual estiver ocorrendo naturalmente em lavouras comerciais, é possível que o surgimento de isolados virulentos possa reduzir a efetividade de muitas combinações de genes maiores de resistência. Por outro lado, combinações estáveis sob condições de ocorrência

de recombinação parassexual, poderiam ser identificadas através da inoculação de isolados recombinantes (Zeigler et al., 1997). Deste modo, é importante que futuramente seja avaliada a frequência e as possíveis alterações no espectro de virulência dos isolados resultantes da recombinação parassexual. Além disso, também é necessário avaliar a capacidade de recombinação na planta, mediante a inoculação concomitante de isolados que apresentem compatibilidade vegetativa em meio de cultura.

Embora a introdução de isolados geneticamente distintos nos viveiros de infecção seja importante para a seleção de novas cultivares de arroz resistentes à brusone, certas medidas devem ser tomadas a fim de impedir que os viveiros atuem de forma a favorecer o patógeno. Nestes locais geralmente são utilizadas cultivares suscetíveis que asseguram a diversidade populacional de *M. grisea*, além de manter elevado os níveis de inoculo das linhagens existentes. Com isso, enquanto na natureza diferentes linhagens raramente entram em contato suficiente para sofrer recombinação, nestes locais estão sendo criadas condições ideais para que este evento ocorra. Em função disso, os viveiros de infecção devem ser implantados em regiões que dificultem a disseminação do patógeno destes para lavouras comerciais.

Assim como o haplótipo E, outros 9 haplótipos foram encontrados em baixa frequência no levantamento populacional realizado em SC (Capítulo 2), indicando a possibilidade de que outros haplótipos pouco frequentes ainda poderão ser identificados em novos estudos populacionais. É necessário que um maior número de isolados seja analisado a fim de identificar esses possíveis haplótipos, possibilitando deste modo uma seleção mais eficiente de

genes de resistência efetivos contra toda a população do patógeno. Além disso, em decorrência do amplo espectro de virulência do haplótipo E, e sua possível capacidade de recombinar-se com outros haplótipos, é importante que que seja realizada uma rotação ente cultivares contendo distintos genes de resistência a fim de impedir o aumento da frequência do mesmo na população do patógeno.

1. CAPÍTULO I

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. A Brusone na orizicultura

Os primeiros registros sobre ocorrência de brusone datam de 1637 na China (Ou, 1972). Desde então, ela tem sido relatada em quase todas as regiões do mundo que cultivam arroz, sendo considerada a doença mais importante da cultura (Ribeiro & Terres, 1987).

Segundo Bedendo (1997), a brusone pode ocorrer em toda a parte aérea da planta, desde os estádios iniciais de desenvolvimento até a fase final de produção de grãos. Os sintomas nas folhas, iniciam pela formação de pequenas lesões necróticas de coloração marrom, que evoluem, aumentando de tamanho e tornando-se elípticas, com margem marrom e centro cinza ou esbranquiçado. Entretanto, o tamanho, a forma e a coloração das lesões, dependem muito das condições climáticas, da idade da lesão e do grau de suscetibilidade da cultivar de arroz (Webster & Gunnel, 1994). Nas bainhas das folhas, principalmente na região da lígula da folha bandeira é comum o surgimento de lesões circundantes, que podem levar até a queda da folha. Em condições favoráveis, as lesões coalescem causando, muitas vezes, a morte da planta inteira (Prabhu & Filippi, 1998).

Nos colmos, principalmente na região dos entre-nós, os sintomas aparecem na forma de manchas elípticas escuras, com centro cinza e bordos marrom avermelhados (Ribeiro, 1988). Na região dos nós, a área infectada torna-se escura, impedindo a circulação da seiva e provocando o acamamento da planta, ou ainda, a quebra do colmo no ponto de infecção do nó (Prabhu & Filippi, 1998). Nas panículas, o fungo pode atacar o nó basal, o raque e as ramificações. A infecção do nó basal da panícula é conhecida como brusone do pescoço e tem um papel relevante na produção. Se a infecção ocorrer logo após a emissão da panícula, os grãos não são formados e a mesma permanece ereta. Quando a panícula é infectada tardiamente, há um enchimento parcial dos grãos, e em alguns casos, por causa de seu peso, ocorre a quebra da base da panícula (Agrios, 1998).

1.1.1.1. O patógeno

O agente causal da brusone é o fungo *Magnaporthe grisea* (Herb.) Barr, que corresponde ao estágio anamórfico *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. *M. grisea* é um ascomiceto que produz ascosporos hialinos, fusiformes, septados (três septos) em uma asca unitunicada (Herbert, 1971). O fungo é heterotálico com controle bipolar para compatibilidade de cruzamento, possuindo genes em diversos loci que controlam o ciclo sexual (Webster e Gunnel, 1994). O fato de existir somente isolados macho-férteis na maioria das regiões orizícolas distantes dos centros de origem do arroz, impede a ocorrência de reprodução sexuada, resultando no predomínio de populações clonais do patógeno (Mekwatanadarn et.al, 1999). A forma mais comum encontrada na natureza, *P.*

grisea, produz conídios caracteristicamente periformes, hialinos, normalmente com dois septos. Um ou três septos raramente são observados (Bedendo 1997). O conídio geralmente germina a partir da célula apical ou basal, sendo a germinação da célula central pouco freqüente (Ou, 1972).

Durante a maturação, enquanto ainda ligado ao conidióforo, o conídio produz em sua extremidade uma mucilagem, que em contato com a água, auxilia sua fixação no hospedeiro (Hamer et al., 1988). Esta mucilagem é rica em manose, a qual tem afinidade com lectina concanavalina A, encontrada nas plantas (Howard, 1994).

A germinação dos conídios e a formação do apressório são controladas por estímulos ambientais não havendo, por exemplo, emissão do tubo germinativo enquanto os conídios forem mantidos em suspensão aquosa. Provavelmente, isto evita a germinação antecipada (Lee & Dean, 1993). O principal estímulo ambiental está ligado à hidrofobicidade da superfície da planta. Segundo Hamer et al. (1988), à medida que aumenta a cerosidade na superfície sobre as quais os conídios são depositados, mais efetiva é a formação do apressório.

A capacidade do apressório em penetrar na planta depende de uma alta pressão de turgor. Perdas da capacidade de formar esta alta pressão são atribuídas a componentes químicos ou alterações genéticas que interferem na via de biossíntese de melanina (Howard, 1994). A melanina compõe a parede celular do apressório, atuando como uma barreira à permeabilidade, permitindo um aumento na concentração de alguns solutos citoplasmáticos (Howard & Ferrari, 1989).

Após a penetração, sob condições favoráveis, as primeiras lesões são observadas dentro de 4 - 5 dias. Na presença de alta umidade relativa, os conídios são produzidos e liberados em menos de 24 h depois do aparecimento das lesões. A maior produção de conídios ocorre entre 3 - 8 dias após o início da esporulação (Agrios, 1998).

1.1.1.2. Fatores predisponentes

De maneira geral, as cultivares utilizadas no sistema de plantio de sequeiro são mais predispostas que aquelas cultivadas no sistema irrigado. Isto se deve, em parte, à maior rigidez da parede celular resultante do aumento na silificação que ocorre quando o arroz é cultivado sob condições de alagamento (Ou, 1985). Embora a doença possa ocorrer em todas as fases de crescimento e desenvolvimento das plantas, estas possuem maior predisposição à doença quando se encontram com 3-4 folhas e durante a floração (Ou, 1972). Independente da fase de desenvolvimento das plantas e da suscetibilidade das cultivares, a ocorrência da brusone depende de uma série de fatores que atuam conjuntamente. Segundo Ribeiro & Sperandio (1998), temperaturas compreendidas entre 20 a 30 °C são favoráveis à doença. Acima de 32 °C, as plantas de arroz apresentam menor predisposição à brusone, enquanto que abaixo de 17 °C são mais sensíveis, mas o fungo tem menor agressividade. No entanto, quando as plantas são mantidas sob temperaturas amenas e posteriormente inoculadas acima de 20 °C, a doença torna-se mais severa. Por esta razão, é que os maiores danos são verificados com temperaturas mínimas próximas a 20 °C.

A doença é favorecida por condições de umidade relativa do ar acima de 90%, sendo que a produção de conídios sobre as lesões tem início quando a umidade atinge 93% (Epagri, 1998). Para a germinação, há necessidade de água livre, pois raramente o conídio germina sob condições de ar saturado. A ocorrência freqüente de orvalho, neblina e chuvas fracas são indicativos de existência de umidade relativa favorável ao patógeno (Ribeiro & Sperandio, 1998).

A severidade da doença é influenciada também pela fertilidade do solo. A presença de níveis elevados de matéria orgânica ou a utilização de nitrogênio em excesso (acima de 60 Kg de N.ha⁻¹) aumenta a predisposição em casos de resistência não específica. Por outro lado, a deficiência de nitrogênio também pode predispor as plantas à doença (Prabhu et al., 1996).

1.1.1.3. Gama de hospedeiros

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

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

1.1.1.4. Controle

O desenvolvimento de cultivares de arroz com resistência durável à brusone é o método mais eficiente e econômico para o controle da doença (Prabhu & Bedendo, 1991). Entretanto, mudanças na composição das raças de *M. grisea* têm resultado em uma rápida “quebra” da resistência. Por esta razão os programas de melhoramento buscam aumentar sua durabilidade diversificando a base genética das novas cultivares (Ahn, 1994).

Além disso, a adoção de um manejo adequado das práticas culturais contribui para o controle da doença. Entre essas medidas destacam-se: a semeadura em épocas recomendadas, evitando-se a semeadura tardia que

provoca modificações no ciclo das cultivares, tornando-as mais predispostas à doença, além de permitir a coincidência dos períodos de emborrachamento e floração com a ocorrência de temperatura e umidade favoráveis à doença; o controle de ervas daninhas, impedindo que estas atuem como hospedeiros intermediários do fungo ou mesmo tornem o microclima da lavoura favorável ao patógeno; a adubação equilibrada, para evitar o crescimento vegetativo exagerado que favorece a doença (Fomba & Taylor, 1994; EMBRAPA, 1999).

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

1.1.2. Interação planta-patógeno

O patossistema *M. grisea*-arroz é um sistema gene-a-gene (Flor 1971) em que na maioria dos casos genes de avirulência (*Avr*) do patógeno apresentam uma correspondência com genes de resistência (*R*) do hospedeiro (Silué et al., 1992). Os genes *Avr* podem codificar proteínas que são reconhecidas diretamente pelo produto do gene *R* correspondente, ou ainda, codificar enzimas envolvidas na produção de moléculas ligantes que permitem

o reconhecimento do patógeno (Orbach et al., 2000). A eficiência de genes *R* depende da natureza de algumas funções que os genes *Avr* podem desempenhar no patógeno independente da função em desencadear a resistência controlada pelos genes *R*. Esta eficiência pode então ser influenciada pelo efeito que mutações nos genes *Avr* provocam na habilidade do patógeno em sobreviver e competir sob condições de campo (Orbach et al., 2000).

M. grisea é um patógeno hemibiotrófico que cresce intracelularmente, ocupando as células da planta individualmente antes de mover-se para a célula subsequente. Não é conhecido se a hifa intracelular é envolvida pela membrana plasmática, como é o caso de haustórios produzidos por fungos biotróficos, ou se ocorre um rompimento da membrana. Também é desconhecido como o fungo libera as proteínas AVR no citoplasma das células da planta (Jia et al., 2000). Estudos envolvendo o sistema *M. grisea*-arroz demonstram a existência de genes *Avr* governando a especificidade com o hospedeiro. O cruzamento entre isolados virulentos e avirulentos para *Eragrostis curvula*, permitiu a identificação do gene *Pwl1*, que governa a virulência para esta espécie. Membros dessa família gênica também são encontrados em isolados que infectam arroz, como o gene *Pwl2* (Kang et al., 1995). Segundo Valent e Chunley (1994), genes *Avr* específicos para cultivares de arroz são comuns em isolados que infectam outras espécies. Além desses, são conhecidos em *M. grisea* ainda os seguintes genes envolvidos na avirulência, *Avr2-Yamo* e *Avr1-Tsuy* (Sweigard et al., 1993), *Pwl3* e *Pwl4* (Kang et al., 1995), *Avr1-Co39* (Farman & Leong 1998), *Avr1-Mara* (Mandel et al.,

1997), *Avr1-ku86* e *Avr1-MedNoi* (Dioh et al., 2000) e *Pi-ta* (Orbach et al., 2000).

A maioria dos genes *Avr* de fungos identificados até o momento são de espécies que colonizam os espaços intercelulares do hospedeiro (Laugé et al., 1998). Estes genes foram clonados usando genética reversa, baseado na identificação de proteínas extracelulares que elicitam a morte programada de células. Entretanto, esta metodologia é pouco eficiente para fungos intracelulares tais como *M. grisea*, sendo necessário o uso da clonagem posicional (Sweigard et al., 1995).

Estudos envolvendo os mecanismos de defesa da planta de arroz ao patógeno, identificaram pelo menos 30 loci de resistência à brusone sendo 20 destes de resistência qualitativa e 10 de resistência quantitativa (QTLs) (Wang et al., 1994). Os genes que conferem resistência qualitativa foram confirmados serem não-alélicos (Kinoshita, 1991). Dentro deste grupo, diversos loci são conhecidos por conterem mais de um alelo para resistência. Análises genéticas de 51 combinações de cultivar/isolado examinadas no IRRI (International Rice Research Institute) mostraram que em 30 casos estudados a resistência foi condicionada por dois genes dominantes, e em 15 casos por um gene dominante e nos demais casos por genes recessivos. (Yu et al., 1987).

1.1.2.1. Mecanismos de variabilidade genética

M. grisea se notabiliza por expressar um grande número de formas virulentas ou famílias, também designadas de raças (Ou, 1985), embora se reproduza assexuadamente. O mecanismo pelo qual novas raças do patógeno

emergem é um problema que tem recebido grande atenção. Embora a extensão dos determinantes da instabilidade das raças esteja sendo debatido, parece claro que novas raças aparecem no campo quando novas cultivares de arroz resistentes à brusone são introduzidas (Valent & Chunley, 1991).

Entre os mecanismos envolvidos na variabilidade de *M. grisea* estão a recombinação sexual e parassexual e a ocorrência de mutação, em muitos casos provocada por deleções de genes *Avr* e inserções de elementos de transposição (transposons e retrotransposons). As mutações podem ocorrer também devido a erros na duplicação cromossômica. Estes erros ocorrem tanto na meiose (mutação germinal) quanto na mitose (mutação somática) (Kistler & Miao, 1992). Mutações somáticas podem ser facilmente visualizadas na forma de setores com características morfológicas diferenciadas em colônias de fungos assexuados e haplóides em meio de cultura. Quando *M. grisea* é cultivado por sucessivas gerações em meio de cultura, por exemplo, cerca de 0,5% dos conídios são mutantes para o gene *Buf1*, responsável pela biossíntese de melanina. Esta taxa de mutação é elevada se comparada com taxas normais de mutação somática verificada em outros genes (Camargo, 1995).

A significância da recombinação sexual em muitos microorganismos pode ser obscura pelo grau de reprodução assexual na natureza (Zeigler et al., 1997). Um importante aspecto levantado é se todas as populações dentro de uma espécie microbiana se comportam de modo similar em relação à capacidade e frequência de recombinação sexual. Leslie & Klein (1996), propõem que a recombinação sexual em espécies de fungos como *M. grisea*

pode ser mantida em populações residindo próximo aos centros de origem, ou em locais onde as condições ambientais são heterogêneas e favoráveis ao patógeno. Em estudos populacionais realizados na Índia e Tailândia, países localizados nos centros de origem do arroz, a alta diversidade populacional identificada é associada à ocorrência de reprodução sexual nestes locais (Kumar et al., 1999; Mekwatanadarn et.al, 1999).

A recombinação parassexual representa uma alternativa ao ciclo sexual, visto que este raramente ocorre. Neste caso, hifas haplóides sofrem anastomose, resultando em células heterocarióticas que, por sua vez, podem sofrer cariogamia, originando uma célula diplóide. Durante este processo, pode ocorrer o pareamento de cromossomos homólogos e conseqüente recombinação mitótica (Zeigler, 1998). As células diplóides podem germinar dando origem a um micélio diplóide, ou podem, em alguns casos, reverter ao estado haplóide por um processo envolvendo perdas progressivas de um cromossomo de cada par de cromossomos homólogos (aneuploidia) (Crawford et al., 1986). Xia et al. (1993) relatam que isolados de *M. grisea* com padrões moleculares distintos originaram, espontaneamente, uma maior freqüência de novos haplótipos quando cultivados concomitantemente do que em culturas puras. Zeigler et al. (1997), ao cultivarem simultaneamente isolados com características genéticas distintas, observaram a formação de tufo miceliais na região de encontro das colônias associados à formação de anastomoses. Estas, quando analisadas revelaram, em alguns casos, indivíduos com características comuns a ambos os parentais indicando a ocorrência de recombinação. A formação de anastomoses também foi observada entre

isolados provenientes do campo, sendo um indício de que a recombinação parassexual esteja ocorrendo na natureza, sendo um dos responsáveis pelo surgimento de novas raças do patógeno (Zeigler et al., 1997).

Análises de mutantes espontâneos de *M. grisea* para ganho de virulência em *Eragrostis* sp., mostraram que o gene de avirulência *Pwl2*, que impede o fungo de infectar esta espécie tinha sido perdido nestes mutantes (Sweigard et al., 1995). Diah et al. (2000) descobriram certa instabilidade no *locus Avr2-Yamo* associada à uma alta frequência de mutações para virulência em isolados de arroz. Cerca de 60% das mutações espontâneas de avirulência para virulência neste *locus* se devem a deleções na extremidade do cromossomo que não afetam a viabilidade ou a patogenicidade do fungo. A localização de genes de avirulência em regiões não essenciais do cromossomo poderia explicar o aparecimento de raças virulentas pela deleção de pequenas regiões cromossômicas (Orbach et al., 2000).

Tendo em vista os mecanismos envolvidos na variabilidade do patógeno, os elementos de transposição estão entre os mais estudados. Esses elementos provocam mudanças em estruturas gênicas e nas funções de diversos microorganismos (Nishimura et al., 2000). Em *M. grisea* foram identificados sete transposons, incluindo retrotransposons, os quais se transpõem através de um RNA intermediário e transposons de DNA, os quais se transpõem diretamente por clivagem e inserção (Nishimura et al., 2000; Kang et al., 2001). A diversidade destes elementos pode contribuir para rearranjos no genoma envolvendo genes que controlam a virulência desta espécie (Kachroo et al., 1997). O estudo de mutantes espontâneos que sofreram ganho de virulência

para o gene de resistência *Pi-ta*, revelou que a perda de função do gene *Avr* correspondente, foi devido à inserção de um transposon da família *Pot-3*. Isto demonstra que a transposição pode mudar o espectro de virulência em *M. grisea*, podendo ser um importante mecanismo de variabilidade genética (Kang et al, 2001).

1.1.3. Metodologias de análise populacional

Os diversos estudos envolvendo a análise da variabilidade de *M. grisea* têm utilizado diferentes metodologias de análise. Inicialmente, a identificação das raças foi baseada nas reações observadas na série internacional de cultivares diferenciais de arroz (Raminad str. 3, Zenith, NP-125, Usen, Dular, Kanto 51, CI 8970 e Caloro), proposta por Atkins et al. (1967). De acordo com esta metodologia, os isolados do fungo são inoculados na série diferencial quando estas atingem o estágio de 3-4 folhas, utilizando uma suspensão de conídios cuja concentração varia $1-5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ (Xia et al., 2000). Após a inoculação, as plantas são incubadas sob umidade acima de 90% e temperaturas entre 20 e 28°C. As reações das cultivares aos diversos isolados do fungo são avaliadas 7-10 dias após a inoculação (Levy et al., 1993).

Com o avanço da biologia molecular, foram desenvolvidas técnicas que possibilitam um melhor agrupamento dos isolados além reduzir o número de inoculações. Entre estas técnicas está o RFLP, polimorfismo baseado no tamanho do fragmento de restrição. O polimorfismo observado por esta técnica, se deve a diferenças na sequência de nucleotídeos ao longo da fita de DNA entre os indivíduos que estão sendo comparados devido a inserções, deleções,

translocações ou outros rearranjos que ocorrem durante o processo evolutivo. (Grant & Shoemaker, 1998). Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é digerido, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. As diferenças são detectadas pela hibridização de um fragmento de DNA isolado (sonda) com fragmentos de DNA obtidos pela ação de uma endonuclease. A similaridade entre a seqüência de nucleotídeos da sonda e a seqüência complementar de nucleotídeos de um fragmento revela o polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Em estudos com *M. grisea*, as sondas são baseadas em seqüências de elementos repetitivos do DNA do fungo, denominados MGRs, os quais se encontram dispersos ao longo de todo genoma (Romao & Hamer, 1992). Existem três diferentes MGRs designados MGR 583, MGR 586 e MGR 603. Eles geralmente são encontrados em maior número em genomas de *M.grisea* patogênicas ao arroz (Hamer et al., 1989) onde são observados aproximadamente 50-60 fragmentos de restrição que hibridizam com MGR 586, quando o DNA de *M. grisea* é digerido com *Eco RI*. Porém, em alguns locais se observam padrões moleculares de *M. grisea* patogênicos a espécies como milho, com uma freqüência do elemento MGR 586 similar ao encontrado em isolados patogênicos ao arroz (Zeigler et al., 1994).

Além do RFLP, tem-se utilizado também em alguns trabalhos envolvendo variabilidade do fungo, o RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) desenvolvido por Williams et al. (1990), o qual assim como as técnicas baseadas em RFLP, permite detectar polimorfismos de segmentos de DNA distribuídos em todo genoma do organismo. A diferença metodológica

básica entre ambas as técnicas é que enquanto os marcadores RFLP se baseiam na hibridização de DNA, o RAPD se baseia na amplificação de DNA. Deste modo, a técnica RAPD não requer o desenvolvimento prévio de sondas específicas para o organismo de interesse. Outra grande vantagem, é a utilização de um conjunto único de oligonucleotídeos iniciadores arbitrários para qualquer organismo. Comparada ao RFLP, a técnica de RAPD, por se basear na reação em cadeia da polimerase (PCR), é mais sensível na detecção de polimorfismos ao nível de DNA.

O AFLP, polimorfismo baseado no tamanho do fragmento amplificado, é uma técnica que também pode ser utilizada em estudos populacionais do patógeno. Esta metodologia baseia-se na amplificação de subgrupos de fragmentos de restrição usando PCR. Para isso, o DNA é clivado com enzimas de restrição, seguido pela ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos, gerando DNA molde para a amplificação (Vos et al., 1995). As seqüências dos adaptadores orientam à subsequente pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Nucleotídeos seletivos são incluídos no terminal 3' dos oligonucleotídeos utilizados na etapa final de amplificação, permitindo a ocorrência da amplificação de fragmentos de restrição que contenham os nucleotídeos flanqueando o sítio de restrição (Vos et al., 1995). Entre as vantagens desta técnica estão a exigência de quantidades de DNA relativamente pequenas e a não utilização de hibridização. Além disso, a possibilidade de usar temperaturas de anelamento mais elevadas confere ao AFLP uma maior reprodutibilidade quando comparado ao RAPD. A principal fonte de ambigüidade na comparação dos padrões AFLP é a variação na

intensidade das bandas, que provavelmente se deve a diferenças na eficiência do PCR. Como consequência, a leitura de fragmentos menores pode depender do nível de detecção e da quantidade de DNA utilizado (Savelkoul et al., 1999).

A técnica mais recente utilizada nos estudos populacionais de *M. grisea* é o rep-PCR, que baseia-se na detecção do transposon *Pot-2* (George et al., 1998). *Pot 2* que apresenta uma seqüência de 1.857 pb, é um dos mais abundantes elementos repetitivos de *M. grisea* (mais de 100 cópias por genoma), sendo encontrado com número similar de cópias tanto em isolados que infectam arroz, como em isolados que infectam outras espécies (Kachroo et al., 1994). O rep-PCR identifica polimorfismos pela amplificação das seqüências entre as cópias do elemento repetitivo distribuídas ao longo do genoma. Esta técnica combina a simplicidade da PCR com os polimorfismos detectados pela variação no tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). São amplificados fragmentos de 400 pb a 23.000 pb, gerando suficiente polimorfismos para detecção de diferenças genéticas entre isolados da mesma espécie (George et al., 1998). Em uma análise de 2 coleções de isolados de *M. grisea*, oriundas das Filipinas e Índia, realizada a fim de comparar as técnicas de MGR 586 e *Pot-2*, concluiu-se que ambas agrupam os isolados de forma muito similar (George et al., 1998).

1.1.3.1. Estudos populacionais

No que se refere aos resultados obtidos nos diversos estudos de variabilidade realizados até então, Ribeiro & Terres (1987) ao analisarem 127 isolados coletados entre os anos 1979 e 1986 encontraram 36 raças no Estado

do Rio Grande do Sul através de testes fenotípicos baseados nas reações dos isolados na série diferencial. Maciel et al. (2001), identificaram pelo menos 5 diferentes linhagens a partir de isolados coletados entre 1999 e 2001 usando rep-PCR, confirmando a existência de variabilidade genética do fungo no Estado do Rio Grande do Sul.

Levy et al. (1991), com o objetivo de verificar a eficiência do marcador MGR 586 e, ao mesmo tempo estudar a dinâmica populacional do patógeno nos Estados Unidos, analisou 42 isolados obtidos de um banco de isolados coletados nos últimos 30 anos, representando a maioria das linhagens que ocorrem em cultivares comerciais nos Estados Unidos. Foram identificadas 8 linhagens, classificadas em 7 raças (IB-1, IC-17, IG-1, IB-45, ID-13, IH-1 e IB-49), sendo que alguns grupos, como IB-49 e IG-1, apresentaram menos que 40% de similaridade na análise dos polimorfismos por MGR 586. Em um segundo levantamento realizado no estado do Arkansas foram analisados 470 isolados coletados em 1992 identificando-se 4 linhagens e 4 raças, sendo todas as raças comuns às encontradas no primeiro levantamento (Xia et al., 2000). Esta baixa variabilidade se explica em função de que o grupo de cultivares comerciais plantadas nos Estados Unidos é pequeno e possui poucos genes de resistência específicos à raça. Por exemplo, em meados da década de 80, 70% da área orizícola do Estado do Arkansas foi plantado somente com uma cultivar. Esta extensiva monocultura, associada à curta estação de crescimento e a condições climáticas desfavoráveis à doença, deve ter contribuído decisivamente para uma redução na diversidade do patógeno (Xia et al., 2000).

Uma estrutura populacional simples também foi observada na Europa a partir de estudos realizados em 41 isolados coletados durante 14 anos e provenientes de 5 países. A diversidade genética dos isolados foi analisada por MGR 586 e os resultados comparados com o grau de similaridade para fatores de virulência (Roumen et al., 1997). Baseado na análise molecular, os isolados foram agrupados em 5 linhagens, com similaridade inferior a 65%. Dentro de cada linhagem, 2 ou mais haplótipos com similaridade superior a 80% foram identificados. Cada linhagem apresentou um padrão de virulência característico sendo composta por raças de padrão muito similar. Na maioria dos casos, a classificação de um isolado em linhagem poderia ser inferido como uma raça (Roumen et al., 1997).

Na Colômbia, observou-se uma variabilidade cerca de 5 vezes superior a encontrada nos Estados Unidos (Levy et al., 1993). Esta avaliação foi realizada a partir de 151 isolados obtidos de amostras de 15 cultivares utilizadas na estação experimental de Santa Rosa (CIAT). Neste local, as condições climáticas são ideais para a ocorrência da doença, além de ser mantido um grupo de cultivares suscetíveis que asseguram a estabilidade da população de *M. grisea* que ocorre na região. As amostras foram coletadas durante 1988 e 1990 e os isolados obtidos analisados por MGR 586. Foram identificadas 6 linhagens, as quais quando inoculadas na série diferencial, resultaram na identificação de 39 raças.

Estudo similar foi conduzido nas Filipinas em 1992, onde se implantaram 3 coleções de 38 cultivares, semeadas em 2 estações de crescimento e amostradas semanalmente após o aparecimento dos sintomas. Obteve-se com

isso um total de 1.516 isolados, originando 130 haplótipos agrupados em 10 linhagens (Chen et al., 1995). Em nível de linhagem, a composição da população do patógeno permaneceu constante nas duas estações de crescimento amostradas. No entanto, ocorreram variações na frequência das linhagens além de mudanças significativas nos haplótipos entre estações. Assim, a estrutura da população poderia ser resultado de um modo de reprodução clonal associado a mutações, migrações ou seleção do ambiente. Neste mesmo trabalho, foram identificados isolados que apresentaram compatibilidade vegetativa em uma mesma coleção de cultivares, indicando que a recombinação (sexual ou parassexual) também possa ter contribuído para a variabilidade da população (Chen et al., 1995).

Grande parte dos estudos envolvendo análise da variabilidade de *M. grisea* foram conduzidos fora dos centros de origem do arroz, tendo-se poucas informações sobre a complexidade da população do patógeno nestes locais. Em função disso Kumar et al. (1999), realizaram um estudo na região do Himalaia (norte da Índia), uma área localizada dentro dos centros de origem do arroz (Chang, 1976). Nesta região, existe uma diversidade de cultivares, as quais foram mantidas em vales isolados durante milhares de anos sob vários sistemas de cultivo em um ambiente heterogêneo, que favorece o patógeno. A partir de amostras coletadas entre 1992-1995 em 29 localidades (vales), obteve-se 483 isolados que, ao serem analisados por MGR 586, foram agrupados em 45 linhagens diferentes. A diversidade populacional do patógeno no Himalaia foi superior à encontrada nas Filipinas e na Colômbia (Kumar et al., 1999). Em alguns vales, a detecção de uma ou poucas linhagens é

consistente com uma propagação exclusivamente clonal conforme descrito em outros locais da Ásia, América e Europa (Levy et al., 1993; Chen et al., 1995; Roumen et al., 1997). Porém em outros vales, a ocorrência de um grande número de linhagens sugere a existência de microrregiões que abrigam populações favorecidas por condições específicas daquele local. A identificação de isolados sexualmente compatíveis indica que esta região oferece condições para a manutenção da fertilidade sexual. Para organismos onde não se conhece a reprodução sexual na natureza, a análise populacional pode ser importante também para identificar regiões geográficas que abrigam populações que se recombina sexualmente. Tais populações podem servir como fonte de diversidade genética para superar a resistência obtida pelos programas de melhoramento (Kumar et al., 1999).

2. CAPÍTULO II

ANÁLISE MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Magnaporthe grisea* EM CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa*) NO ESTADO DE SANTA CATARINA

2.1. INTRODUÇÃO

A brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr. é a doença mais destrutiva da cultura do arroz, podendo ser encontrada em diversos ecossistemas de cultivo (Ou, 1985). A incorporação de resistência em cultivares comerciais é o método mais econômico e efetivo para o manejo da doença (Prabhu & Bedendo, 1991). No entanto, a resistência das cultivares tem sido rapidamente perdida devido à diversidade e à instabilidade da virulência do fungo causador da brusone (Ou, 1980; Correa-Victoria & Zeigler, 1993; Zeigler et al., 1995). O emprego de métodos inadequados para a seleção de genótipos resistentes (Chen et al., 1995) e o uso extensivo de determinadas cultivares geneticamente muito próximas, contribuem para a curta durabilidade da resistência observada a campo (Zhu et al., 2000).

A maior ênfase da pesquisa em brusone do arroz é a identificação de novos genes que confirmam resistência durável e a incorporação dos mesmos em cultivares em uso. Para tanto, é necessário conhecer a estrutura genética

do patógeno e a interação das diversas raças com as cultivares de arroz. Os métodos convencionais de análise populacional de *M. grisea*, baseiam-se na reação à inoculação do patógeno em uma série internacional de cultivares diferenciais de arroz (Atkins et al., 1967; Ling & Ou, 1969), sendo esta, a principal metodologia empregada nos estudos populacionais realizados no Brasil (Ribeiro & Terres, 1987; Filippi & Prabhu, 2001).

A utilização de marcadores moleculares é uma ferramenta importante em diversos trabalhos de análise populacional em *M. grisea*. Hamer et al., (1989), identificaram uma família de fragmentos repetitivos de DNA, designados MGR 586, os quais são conservados principalmente em isolados que infectam arroz. Como resultado, MGR 586 foi utilizado em metodologias baseadas em RFLP para caracterizar a variabilidade genética do fungo em diversos locais (Levy et al. 1991; Levy et al., 1993; Chen et al., 1995; Roumen et al., 1997; Xia et al., 2000). Kachroo et al. (1994) identificaram *Pot-2*, um transposon de 1.857 pb, o qual é um dos mais abundantes elementos repetitivos de DNA encontrados em *M. grisea*, sendo possível sua utilização em estudos populacionais através da técnica de rep-PCR. George et al. (1998) em uma análise de coleções de isolados de *M. grisea* oriundas das Filipinas e Índia usando MGR 586 e *Pot-2*, concluíram que ambas agrupam os isolados de forma muito similar.

Santa Catarina (SC) é quarto maior produtor de arroz do Brasil (Neumann, 2001), sendo que a cultura ocupa uma área de aproximadamente 130.000 ha (Epagri, 1998). O cultivo em SC se caracteriza por adotar sistema pré-germinado de plantio em praticamente toda área orizícola, e o uso de um

número reduzido de cultivares, o que torna o ambiente uniforme. A estrutura populacional de *M. grisea* em SC é ainda pouco conhecida. Miura et al. (1998) verificaram a ocorrência de raças dos grupos IC, ID, IE, IG e II. Entretanto, permanece desconhecida a distribuição e a frequência das raças do patógeno nas diversas regiões orizícolas de SC e sua incidência nas principais cultivares comerciais utilizadas. O estudo da variabilidade genética do fungo utilizando técnicas moleculares em SC, poderia ampliar o número de isolados analisados em um curto período. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade de *M. grisea* em lavouras comerciais de arroz no Estado de Santa Catarina utilizando técnicas moleculares e testes de virulência, a fim de obter informações sobre a estrutura populacional do patógeno para uma seleção mais eficiente de novas cultivares resistentes à brusone.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Amostragem e obtenção dos isolados

Foram coletadas 183 amostras em 98 propriedades distribuídas em 21 municípios, localizados em duas regiões do zoneamento agroclimático para a cultura do arroz em SC: uma região que compreende o Baixo e Médio Vale do Itajaí e outra que compreende o Litoral Norte e Sul de SC (Epagri, 1998). Para a amostragem, foram selecionadas aproximadamente 6 panículas, ou folhas, com sintomas de brusone provenientes de 2 a 3 locais de cada lavoura, durante os meses de janeiro, fevereiro e março de 2001. Além de lavouras comerciais, foram amostrados os viveiros de infecção e os campos de multiplicação de sementes da Estação Experimental da Epagri em Itajaí, SC (EEI).

Para o isolamento de *M. grisea*, as amostras foram incubadas em câmara úmida por 24-48 h a 28 °C sob um fotoperíodo de 12 h. Os conídios que surgiram, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (ágar, 15 g.L⁻¹) e crescidos por 24 h a 28 °C. A partir dos conídios germinados, realizaram-se os isolamentos monoconidiais, os quais foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura de farinha de arroz (farinha de arroz, 20 g; ágar, 15 g; sacarose, 5 g.L⁻¹), e crescidos por 5 dias a 28 °C. As colônias monoconidiais foram então repicadas para novas placas de Petri com meio de farinha de arroz contendo tiras de papel de filtro (1x1 cm) sobre as quais os isolados cresceram durante 10 dias. As tiras de papel foram

secas a 28 °C por 8 dias, e posteriormente armazenadas em envelopes de papel a – 70 °C (Borromeo et al., 1993).

2.2.2. Extração do DNA

Noventa e dois isolados foram crescidos em 50 mL de meio de cultura (Apêndice 1), sob agitação durante 10-14 dias a 28 °C no escuro. O micélio obtido, após secagem e moagem na presença de nitrogênio líquido, foi transferido (150 mg) para um tubo de microcentrífuga e misturado com 750 µL de tampão de extração (CTAB, 55 mM; Tris 100 mM, pH 8,0; EDTA, 10 mM; NaCl, 0,7 M) e 15 µL de mercaptoetanol. A mistura foi incubada a 65°C durante 30 min e, posteriormente, foi acrescentado 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1 v:v:v) e centrifugado por 5 min a 18.400 g (temperatura ambiente). O sobrenadante foi transferido para um tubo novo, adicionado 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v:v) e centrifugado do mesmo modo anterior. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo contendo 750 µL de isopropanol (- 20 °C), incubado no gelo por 10 min e centrifugado a 18.400 g por 5 min (temperatura ambiente). Finalmente, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% duas vezes, seco e ressuspendido em 40 µL de tampão TE (Tris, 10 mM, pH 8,0; EDTA, 1 mM). A quantidade e qualidade do DNA extraído foram estimadas através de leitura em um espectrofotômetro Beckman DU 65 e o DNA armazenado a –20 °C. Todas as extrações foram realizadas com duas repetições.

2.2.3. Rep-PCR

O DNA dos 92 isolados foi submetido à amplificação por rep-PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *Pot2-1* (5'-CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT-3') e *Pot2-2* (5'-CCCTCATTCGTCACACGTTC-3') (Gibco/BRL) desenvolvidos a partir do elemento repetitivo *Pot-2* (George et al., 1998).

As reações foram realizadas em volume final de 25 μ L contendo 500 ng de DNA, tampão de reação contendo Tris-HCl, 10 mM, pH 9,2; KCl, 25 mM, 0,48 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Gibco/BRL), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Gibco/BRL). As amplificações foram realizadas em um termociclador PTC-100TM (MJ Research), e submetidos a 30 ciclos de amplificação divididos em duas etapas: 95 °C por 2,5 min para desnaturação no primeiro ciclo e 94 °C por 1 min nos quatro ciclos subseqüentes, sendo a temperatura de anelamento de 62 °C por 1 min e a de extensão 68 °C por 10 min. Na segunda etapa, composta por 26 ciclos, o tempo de desnaturação foi de 30 s, sendo mantidas as demais condições. Um período de extensão de 15 min a temperatura de 65 °C foi adicionado ao final do último ciclo.

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese (47 V por 20 h) em gel de agarose 0,6% (Gibco/BRL) contendo tampão TBE (Tris, 90 mM, pH 8,3; ácido bórico, 90 mM; solução EDTA, 2 mM). As repetições foram separadas em um mesmo gel para verificar a reprodutibilidade dos resultados. O gel, corado com brometo de etídio (0,5 μ g.mL⁻¹), foi visualizado sob luz

ultravioleta e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado Kodak (EDAS 120).

2.2.4. Análise de agrupamento

Para determinar a similaridade genética entre os isolados, foram analisados todos os fragmentos de DNA com tamanho entre 1.100 e 5.500 pb. A presença ou ausência destes fragmentos, foi convertido em uma matriz binária na qual foi atribuído valor 1 para a presença e 0 para ausência de cada fragmento. As matrizes de similaridade foram calculadas utilizando o coeficiente de simples associação pelo programa NTSYS-PC (Rohlf, 1992) e os agrupamentos construídos pelo método UPGMA (Crisci et al., 1983). Cada fenograma foi reconstruído 100 vezes pelo programa PAUP 4.0 (Swofford, 1998) para verificar a freqüência com que os grupos foram formados.

2.2.5. Testes de virulência

Vinte e oito isolados representando 12 haplótipos, foram inoculados nas cultivares da série diferencial (Raminad str.3, Zenith, NP-125, Usen, Dular, Kanto 51, Sha-tiao-tsao e Caloro proposta por Atkins et al. (1967), acrescidas das cultivares Epagri-108 e Epagri-109 e Epagri-106. A semeadura foi realizada em vasos plásticos ($V=500\text{ cm}^3$) contendo uma mistura de solo e substrato Eucatex para paisagismo (1:1 v:v), a fim de obter-se 5 plantas por vaso. As plantas receberam aplicação de nitrogênio na forma de uréia equivalente a $100\text{ Kg de N.ha}^{-1}$, sendo fornecido 50% da dose no momento da semeadura e o restante 20 dias após.

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

A inoculação foi realizada quando as plantas atingiram o estágio de 3-4 folhas (± 21 dias) com uma suspensão de $0,5-2,5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹. Utilizou-se 30 mL dessa suspensão em cada repetição, sendo feitas duas repetições para cada isolado. As plantas foram então incubadas em caixas plásticas sob alta umidade e mantidas em câmara de crescimento sob um fotoperíodo de 12 h a 26 °C. As reações das cultivares aos isolados foram avaliadas 10 dias após a inoculação, utilizando-se a escala diagramática com notas de 0-9 descritas na Tabela 1. A identificação das raças foi realizada de acordo com Ling & Ou (1969).

Tabela 1. Escala de notas utilizada para avaliar o espectro de virulência dos isolados.

Nota	Sintomatologia	Reação
0	Sem sintomas	Resistente
1	Pequenas pintas marrons, com tamanho da cabeça de um alfinete	Resistente
2	Grandes pontuações de cor marrom, com 1-2mm de diâmetro, necrótico, sem centro esporulativo	Resistente
3	Pequenas lesões arredondadas ou ligeiramente alongadas, com centro cinzento, borda marrom, com número significativo de lesões nas folhas superiores	Resistente
4	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone com 3mm ou mais cobrindo menos que 4% da área foliar	Suscetível
5	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone ocupando 4-10% da área foliar	Suscetível
6	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone ocupando 11-25% da área foliar	Suscetível
7	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone ocupando 26-50% da área foliar	Suscetível
8	Lesões ocorrendo em 51-75% da área foliar e presença de muitas folhas mortas	Suscetível
9	Mais que 75% da área foliar afetada	Suscetível

Fonte: Prabhu & Filippi, 1998.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Setenta e três isolados monoconidiais foram obtidos a partir de folhas e panículas com sintomas de brusone em 12 municípios amostrados (Apêndice 2) e 19 isolados obtidos na amostragem da EEI. A análise do perfil eletroforético dos 92 isolados, baseado na ocorrência e distribuição de 27 fragmentos de DNA obtidos por rep-PCR, revela a existência de 13 padrões moleculares distintos (haplótipos) (Figura 1). A avaliação da frequência dos haplótipos identificados, indica que há um predomínio dos haplótipos A (53%) e B (28%). Sendo que os demais 11 haplótipos, ocorrem em uma frequência de 1-3% (Figura 2).

A análise de agrupamento dos 73 isolados obtidos na amostragem dos municípios, revela que, com exceção do haplótipo E, os demais haplótipos apresentam uma similaridade, baseada em rep-PCR, superior a 80%, sendo agrupados em uma mesma linhagem (Figura 3) (Apêndice 3). O haplótipo E, por apresentar similaridade inferior a 40%, foi agrupado em uma linhagem distinta.

Estes resultados indicam a ocorrência de uma baixa diversidade na população de *M. grisea* nas lavouras comerciais amostradas no Estado de SC. Estudos populacionais realizados em regiões tropicais onde se localiza o centro de origem do arroz, como a Índia (Chang, 1976), mostram uma elevada diversidade populacional do patógeno, sendo identificadas 45 linhagens através de MGR 586 (Kumar et al., 1999). Nesta região, diversas espécies selvagens de arroz crescem naturalmente em ecossistemas heterogêneos, o

que favorece a ocorrência de mecanismos de variabilidade genética em *M. grisea*, como a reprodução sexual e a recombinação parassexual, que contribuem para a diversidade populacional observada (Kumar et al., 1999).

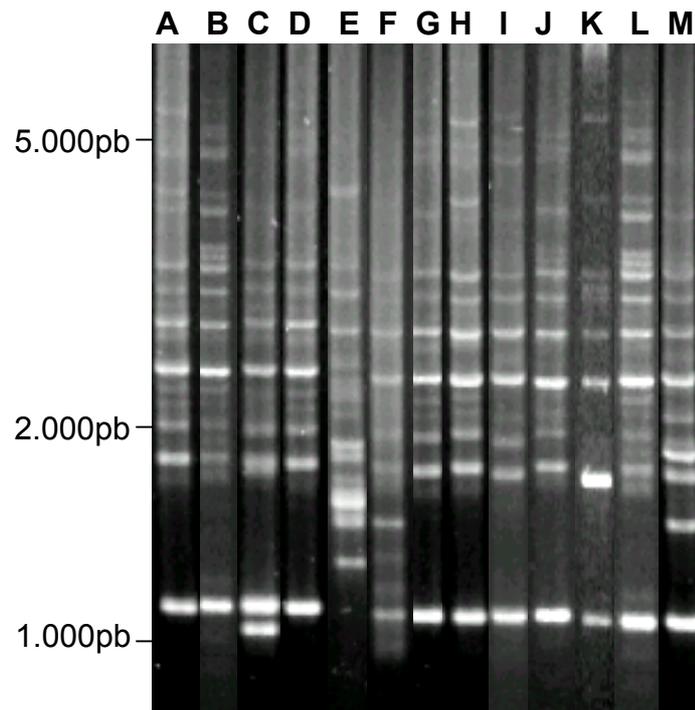


Figura 1. Perfis moleculares de 13 haplótipos de *M. grisea* (A-M) caracterizados por rep-PCR. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose 0,6% e corados com brometo de etídio ($0,5\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Em regiões tropicais distantes dos centros de origem do arroz, como na Colômbia, também se observa uma alta diversidade na população do patógeno, sendo identificadas 39 raças agrupadas em 6 linhagens (Levy, et al., 1993). Entretanto, neste local, as condições climáticas são favoráveis à doença, e os levantamentos populacionais são realizados na Estação Experimental de Santa Rosa (CIAT), onde são mantidos grupos de cultivares suscetíveis que asseguram a estabilidade da população de *M. grisea* que ocorre na região. (Correa-Victoria, et al., 1993). No entanto, a mesma diversidade populacional

não foi observada em estudos realizados nos Estados Unidos, onde foram identificadas somente 8 raças agrupadas em 8 linhagens (Levy et al., 1991). Segundo Xia et al. (2000), a baixa diversidade encontrada nos Estados Unidos se deve a fatores como a recente introdução da cultura do arroz no país (1694) e a utilização de um número restrito de cultivares comerciais. Estas possuem poucos genes de resistência específicos a raça e são submetidas a uma curta estação de cultivo, o que tende a reduzir o espectro de virulência da população do patógeno. No Brasil, a cultura do arroz também é de introdução recente, além disso, em SC se adota um sistema de cultivo uniforme aliado à utilização de um número restrito de cultivares em praticamente todo Estado, o que pode contribuir para a baixa variabilidade encontrada.

A análise de agrupamento dos 19 isolados obtidos na amostragem da EEI, revela uma similaridade baseada em rep-PCR superior a 80%, sendo todos os isolados agrupados em uma mesma linhagem (Figura 4) (Apêndice 4). Comparando-se o grupo de haplótipos encontrado na amostragem dos municípios, em relação ao que foi encontrado na EEI, verificou-se no primeiro a ocorrência de 12 haplótipos (A – L), não sendo encontrado o haplótipo M, o qual foi identificado somente na amostragem da EEI. Entretanto, esse haplótipo foi encontrado na cultivar Fanny, altamente suscetível, e utilizada somente em estações de melhoramento, o que pode justificar a ausência do haplótipo M nas lavouras comerciais amostradas. Por outro lado, ao avaliarmos a diversidade do patógeno na EEI, observa-se a ocorrência de apenas 4 haplótipos (A, B, H e M), o que mostra a necessidade de introduzir-se nos viveiros de infecção, os haplótipos que foram encontrados nas amostras

obtidas das lavouras comerciais. A utilização de técnicas moleculares como rep-PCR em estudos populacionais de *M.grisea*, possibilita a análise de um maior número de isolados em menor tempo. Deste modo, é possível a identificação de haplótipos que ocorrem em baixa frequência, os quais normalmente estão ausentes nos viveiros de infecção.

Segundo Zeigler et al. (1994), a “quebra” da resistência das cultivares de arroz à brusone, pode ser atribuída a dois fatores: uma alta variabilidade do patógeno e/ou a ocorrência de escape durante a seleção de novas cultivares. Em determinadas regiões, onde as condições ambientais são favoráveis ao patógeno, mecanismos de variabilidade genética intrínsecos de *M. grisea* são efetivos, gerando um grande número de haplótipos os quais seriam os responsáveis pela assim denominada “quebra” da resistência. Em outros locais, as condições ambientais são menos favoráveis ao patógeno resultando em uma baixa diversidade populacional. Entretanto, podem existir haplótipos ocorrendo em baixa frequência, muitas vezes não identificados nos levantamentos populacionais e por isso ausentes nos viveiros de infecção. Neste caso, as cultivares em teste não são submetidas à inoculação com esses haplótipos, e ao serem lançadas comercialmente tornam-se rapidamente suscetíveis devido ao aumento da frequência destes haplótipos na população.

A identificação de apenas 13 haplótipos agrupados em duas linhagens em todo levantamento, mostrando uma baixa variabilidade e a ausência na EEI de 9 haplótipos encontrados no campo, indica a ocorrência do fenômeno de escape e sugere que este pode ser o fator mais importante para curta durabilidade da resistência à brusone em SC.

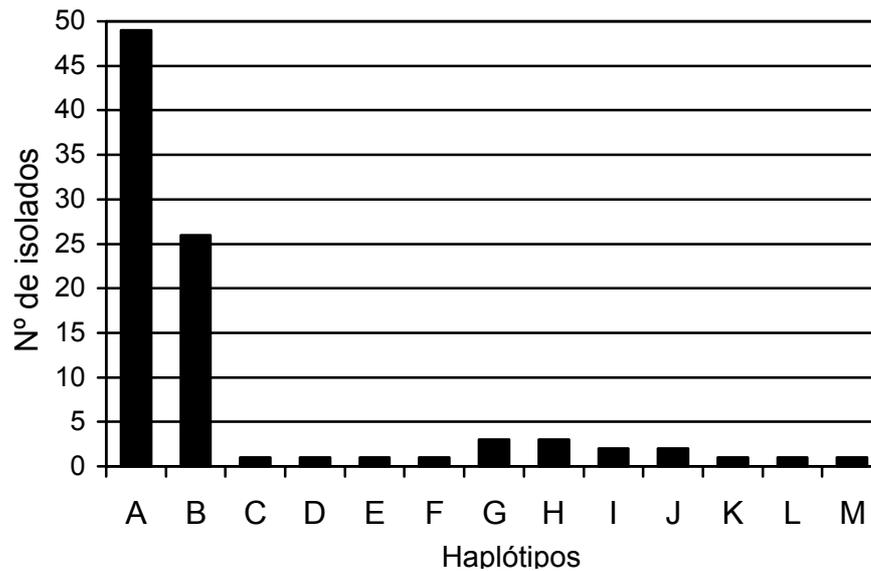


Figura 2. Frequência de 13 haplótipos de *M. grisea* identificados a partir de amostragem de 12 municípios de SC e do viveiro de infecção da EEI.

A análise da distribuição dos haplótipos A e B nos municípios amostrados, revela sua ocorrência em 11 e 8 municípios, respectivamente. Esses haplótipos somente não foram identificados nos municípios que tiveram um baixo número de isolados analisados (menor de 4), com exceção ao município de Araquari onde foram obtidos 11 isolados, e o haplótipo B não foi identificado (Tabela 2). Possivelmente, com a análise de um maior número de isolados, seja possível a identificação de ambos haplótipos também nesses locais.

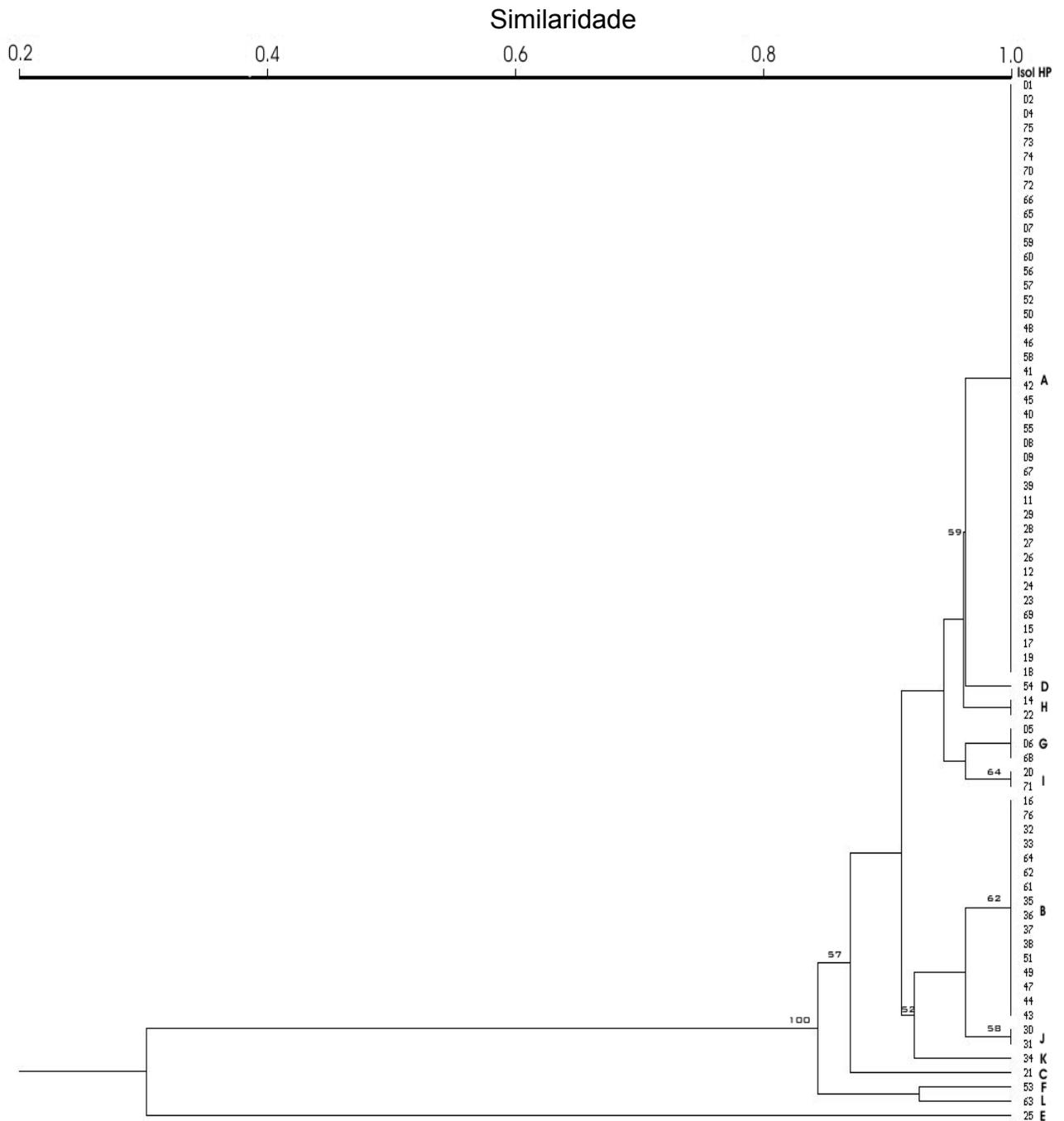


Figura 3. Fenograma de 73 isolados de *M. grisea*, provenientes de 12 municípios catarinenses. Os isolados (isol.) foram agrupados por rep-PCR em 12 haplótipos (HP) baseado no método UPGMA (Crisci et al., 1983). Os valores nos braços do fenograma representam a frequência com que os grupos são formados.



Figura 4. Fenograma de 19 isolados de *M. grisea*, provenientes da EEI. Os isolados (isol.) foram agrupados por rep-PCR em 4 haplótipos (HP) baseado no método UPGMA (Crisci et al., 1983). Os valores nos braços do fenograma representam a frequência com que os grupos são formados.

No que se refere à comparação da variabilidade do patógeno entre municípios, identificou-se em Massaranduba a ocorrência de 7 haplótipos em 11 isolados analisados, sendo este, o local de maior diversidade genética (Tabela 2). Massaranduba é o segundo maior produtor de arroz de SC em área plantada, sendo um dos poucos municípios onde ainda são encontradas propriedades que realizam dois cultivos em uma mesma safra. Em função disso, geralmente são utilizadas cultivares com ciclos diferentes, as quais são distintas geneticamente, o que pode favorecer a manutenção de uma maior diversidade na população do patógeno.

A avaliação da diversidade de *M. grisea* na cultivar Epagri-106, mostra que entre 9 isolados analisados, o que representa 9,8% do total, foram identificados 6 haplótipos (A,B,C,H,I,J), o que corresponde a 46% da

diversidade haplotípica encontrada em toda a população amostrada. A cultivar Epagri-106 foi lançada no início da década de noventa, sendo classificada pela Epagri como suscetível à brusone. O extenso período de utilização comercial desta cultivar aliado à elevada suscetibilidade à doença, pode explicar a diversidade haplotípica identificada. Sob o ponto de vista epidemiológico, a manutenção de cultivares altamente suscetíveis no campo assegura a diversidade populacional do patógeno, dificultando com isso o manejo da doença. A cultivar Epagri-106 ainda é utilizada em algumas propriedades por apresentar ciclo precoce, o que viabiliza a realização de dois cultivos. Cultivares com características agronômicas similares, porém com maior resistência à brusone deveriam ser recomendadas, na tentativa de substituir a cultivar Epagri-106 e com isso eliminar os haplótipos que se mantêm devido a utilização desta cultivar.

Tabela 2. Distribuição dos haplótipos de *M. grisea* obtidos por rep-PCR em SC.

Municípios	Nº de isolados	Cultivares amostradas	Haplótipos Identificados
Araquari	11	I,III,IV,V	A,G,H
Forquilha	3	IV	A,B,G
Garuva	10	IV,V,VI,VII	A,B,L
Guaramirim	14	II,IV,V,VIII	A,B,J,K
Ilhota	3	IV,V	A
Joinville	6	IV,V,VII	A,B,E
Luís Alves	1	IV	A
Maracajá	4	II	A,B
Massaranduba	11	II,IV,V	A,B,I,C,D,F,H
Navegantes	2	V	B
Nova Veneza	7	IV,VI	A,B,I
São João do Itaperiú	1	V	A
Epagri/EEI	19	II,IV,VII,IX,X,XI, XII,XIII,XIV	A,B,H,M

I-EMPASC102; II-E-106; III-E-107; IV-E-108; V-E-109; VI-E-110; VII-E-112;
VIII-IRGA-410; IX-Fanny; X-CI8970; XI-Caloro; XII-IRGA-419; XIII-IR-841; XIV- Roxo.

A inoculação de 28 isolados (12 haplótipos) na série diferencial, resultou na identificação de seis raças (Tabela 3), as quais representam três grupos (IA, IB e II) dos nove grupos de raças internacionais (Ling & Ou, 1969), confirmando a baixa variabilidade genética observada pela análise molecular dos isolados. A raça predominante é a IB-45, a qual foi identificada em 63% das inoculações realizadas (Tabela 4). Seis isolados são avirulentos as 8 cultivares da série diferencial, porém causam doença quando inoculados na cultivar Epagri-106, mostrando que não sofreram perda de virulência, sendo agrupados na raça II-1. Resultado similar também foi observado na Colômbia, onde 21% dos isolados analisados apresentaram este comportamento (Levy et al., 1993). Coincidentemente todos os isolados pertencentes a raça II-1 foram obtidos de cultivares que não estão sendo extensivamente usadas em SC como EMPASC-102, Epagri-106 e BR-IRGA-410.

A partir da inoculação de 7 isolados do haplótipo A na série diferencial, foram identificadas 2 raças, sendo este comportamento também observado durante a inoculação de 8 isolados do haplótipo B, onde foram identificadas 3 raças (Tabela 4). Estas reações mostram a existência de variações no padrão de virulência entre isolados de um mesmo haplótipo obtido por rep-PCR. A interação entre raças, determinadas mediante inoculação em uma série de cultivares diferenciais e linhagens determinadas por MGR 586, foi estudada por Zeigler et al. (1995). Neste estudo, a inoculação de 234 isolados, agrupados em 6 linhagens, em um grupo de 21 cultivares diferenciais, permitiu a identificação de 71 raças, mostrando não existir uma perfeita correlação entre linhagens e raças. Xia et al. (2000), observaram que, além da ocorrência de

mais de uma raça em um mesmo haplótipo, uma mesma raça pode ser encontrada em diferentes haplótipos. Esse resultado também foi observado no presente trabalho, mostrando que o agrupamento dos isolados em haplótipos ou linhagens não prediz com exatidão o fenótipo de virulência de *M. grisea*, em função de se basear em um marcador molecular possivelmente neutro, que não está necessariamente ligado a genes de avirulência do patógeno. Por outro lado, discrepâncias no espectro de virulência também são observadas entre isolados de uma mesma raça. Durante as inoculações na série diferencial, foram inoculadas as cultivares Epagri-108 e Epagri-109, sendo que isolados da raça, IB-41 e IB-45 apresentaram em alguns casos, diferenças no padrão de virulência nessas cultivares. Wolf & Schwarzbach (1975), apontam o agrupamento dos isolados baseado na sua reação em uma série diferencial de hospedeiros como a melhor forma de classificação. No patossistema *M. grisea*-arroz, isso seria possível caso as raças fossem agrupadas de acordo com a interação de genes de avirulência do patógeno com genes de resistência em uma série de cultivares quase isogênicas (isolinhas).

Tabela 3. Resumo das reações à inoculação de 6 raças de *M. grisea* encontradas em SC na série diferencial de cultivares de arroz.

Cultivar	Raças internacionais					
	IA-65	IB-33	IB-37	IB-41	IB-45	II-1
Raminad str.3	S	R	R	R	R	R
Zenith	R	S	S	S	S	R
NP-125	S	R	R	R	R	R
Usen	S	S	S	S	S	R
Dular	S	S	S	R	R	R
Kanto 51	S	S	R	S	R	R
Sha Tiao Tsao	S	S	S	S	S	R
Caloro	S	S	S	S	S	R

R= Reação de resistência (notas de 0-3)

S= Reação de suscetibilidade (nota ≥ 4)

Segundo Chen et al. (1995), a estrutura populacional de um patógeno é fortemente influenciada pela população hospedeira, de modo que o número e diversidade de cultivares amostradas interfere na variabilidade obtida. Neste trabalho, apesar serem amostradas 14 cultivares, cerca de 60% das amostras são oriundas das cultivares Epagri-108 e Epagri-109, as quais ocupam em torno de 90% da área orizícola de SC. Além disso, as coletas das amostras com sintomas de brusone foram realizadas em uma safra onde as condições climáticas foram favoráveis à doença somente na fase final do ciclo da cultura, o que pode ter desfavorecido a ocorrência de alguns haplótipos do patógeno. A utilização de um grupo de cultivares com diferentes níveis de resistência distribuídas em várias regiões do Estado e a coleta de amostras em diversos anos de cultivo provavelmente permitiria a identificação de linhagens não observadas no presente trabalho.

O conhecimento das diferentes raças ou linhagens de *M.grisea* que ocorrem em uma determinada região, permite aos programas de melhoramento a seleção de genes de resistência efetivos contra toda a população do patógeno. Além disso, a partir dos isolados coletados nos levantamentos populacionais, é possível a realização de estudos visando identificar os mecanismos envolvidos na variabilidade de *M. grisea* em cada região. Deste modo poderiam ser adotadas medidas de controle mais eficientes para o controle da doença.

Tabela 4. Comparação entre um agrupamento realizado através de inoculação em uma série diferencial de cultivares de arroz e a análise molecular por rep-PCR de 28 isolados.

Isolado	Origem		Haplótipo	Raça
	Município	Cultivar		
10	EEl	Roxo	A	IB-45
23	Joinville	E-109	A	IB-45
26	Guaramirim	E-109	A	IB-45
28	Araquari	E-109	A	IB-45
42	Guaramirim	E-108	A	IB-45
67	Garuva	E-109	A	IB-41
74	Nova vaneza	E-108	A	IB-45
32	Navegantes	E-109	B	IB-45
33	Navegantes	E-109	B	IB-45
35	Forquilha	E-108	B	IB-37
37	Maracajá	E-106	B	II-1
62	Garuva	E-109	B	IB-45
64	Garuva	E-109	B	IB-41
EEl-14	EEl	Fanny	B	IB-45
EEl-16	EEl	IRGA-419	B	IB-45
21	Massaranduba	E-106	C	II-1
54	Massaranduba	E-108	D	IB-41
25	Joinville	E-109	E	IA-65
53	Massaranduba	E-108	F	IB-33
06	Araquari	EMPASC-102	G	II-1
68	Forquilha	E-108	G	IB-45
14	Araquari	E-108	H	IB-45
22	Massaranduba	E-106	H	II-1
71	Nova vaneza	E-108	I	IB-41
30	Guaramirim	E-106	J	II-1
31	Guaramirim	E-106	J	IB-45
34	Guaramirim	IRGA-410	K	II-1
63	Garuva	E-109	L	IB-37

4. CONCLUSÕES

1. No Estado de Santa Catarina a população de *M. grisea* apresenta baixa variabilidade genética;
2. A ausência de 9 haplótipos de *M. grisea* encontrados em lavouras comerciais na Estação Experimental de Itajaí, indica a ocorrência de escape;
3. Raças de *M. grisea* do grupo IB são predominantes em lavouras comerciais de Santa Catarina;
4. A isolinha C101LAC, que apresenta os genes de resistência *Pi-1* e *Pi-11*, é efetiva contra todas raças identificadas, exceto a raça IA-65;
5. Há indícios da ocorrência de recombinação parassexual entre isolados provenientes de lavouras comerciais de Santa Catarina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ATKINS, J.G.; ROBERT, A. L.; ADAIR, C.R. et al. An international set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.57, p.297-301, 1967.

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

BORROMEO, E.S.; NELSON, R.J.; BONMAN, J.M; LEUNG, H. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice and weed hosts. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.4, p.393-399, 1993.

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

CHANG, T.T. The origin, evolution, cultivation, dissemination, and diversification of Asian and African rices. **Euphytica**, Wageningen, v.25, p.425-441, 1976.

CHEN, D.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG, H. et al. Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.10, p.1011-1020, 1995.

CORREA-VICTORIA, F.J.; ZEIGLER, R.S. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot spot" breeding site in eastern Colombia. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.10, p.1029-1035, 1993.

CRAWFORD, M.S.; CHUNLEY, F.G.; WEAVER, C.G. Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. **Genetics**, Chapel Hill, v.114, p.1111-1129, 1986.

CRILL, P.; HAM, Y.S.; BEACHELL, H.M. The rice blast disease in Korea and its control with race prediction and gene rotation. **Korean Journal of Breeding**, Suwon, v.13, n.2, p.106-114, 1981.

CRISCI, J.V.; ARMENGOL, M.F.L. **Introducción a la teoría práctica de la taxonomía numérica**. Washington: Secretaria General de la organización de los Estados da Americanos, 1983. 131p.

DIOH, W.; THARREAU, D.; NOTTEGHEM, J.L. et al. Mapping of Avirulence Genes in the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea*, With RFLP and RAPD Markers. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.13, n.2, p.217-227, 2000.

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

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

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

FATEMI, J.; NELSON, R.R. Inter isolate heterokaryosis in *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, p.1791-1794, 1978.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. p.23-51. (EMBRAPA-CENARGEM Documento, 20).

FILIPPI, M.C.; PRABHU, A.S. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.1, p.27-35, 2001.

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

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

GEORGE, M.L.C; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG,H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.3, p.223-229, 1998.

GOTTSCHLING, D. E. Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity in vivo. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.89, p.4062-4065, 1992.

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

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

HAMER, J.E.; FARRAL, L.; ORBACH, M.J. et al. Host species-specific conservation of family of repeat DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, p.9981-9985, 1989.

HEBERT, T.T. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.1, p. 83-87, 1971.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in a presporium function. **Experimental Mycology**, New York, v.13, 403-418, 1989.

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

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

KACHROO, P.; LEONG, S.A.; CHATTOO, B.B. *Pot-2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Gene Genetics**, Berlin, v.245, p.339-348, 1994.

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

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

KANG, S.; LEBRUN, M.H.; FARRALL, L.; VALENT, B. Gain of virulence caused by insertion of a *Pot3* transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.14, n.5, p.671-674, 2001.

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

KISTLER, H.C.; MIAO, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v.30, p.131-152, 1992.

KUMAR, J.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. **Genetics**, Chapel Hill, v.152, p.971-984, 1999.

LAUGÉ, R.; JOOSTEN, M.H.A.J.; HAANSTRA, J.P.W. et al. Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.9014-9018, 1998.

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

LESLIE, J.F.; KLEIN, K.K. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. **Genetics**, Chapel Hill, v.144, p.557-567.1996.

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

LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F.S.; ZEIGLER, R.S. et al. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colômbia. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.12, p.1427-1433, 1993.

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

LOUIS, E.J.; NAUMOVA, E.S.; LEE, A. et al. The chromosome end in yeast: Its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. **Genetics**, Chapel Hill, v.136, p.789-802, 1994.

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

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

MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, n.7, p.746-749, 1992.

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

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

MEKWATANAKARN, P.; KOSITRATANA, W.; LEVY, M. et al. Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice lines near-isogenic for major resistance genes. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.1, p.60-70, 2000.

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

MIURA, L.; THEODORO, G.F.; TSCHOEKE, P.H. Determinação de raças de *Pyricularia grisea* isoladas de arroz irrigado no Estado de Santa Catarina. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v.24, n.1, p.78, 1998.

NEUMANN, R.I. **Anuário do arroz**. Santa Cruz do Sul: Gazeta grupo de comunicações, 2001.128p.

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

ORBACH, M.; FARRALL, L.; SWEIGARD, J.A. et al. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, n.11, p.2019-2032, 2000.

OU, S.H. A proposal for an International program of research on the rice blast disease. In: THE RICE blast disease. Maryland: Johns Hopkins, 1963. p.441-446.

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

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

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

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

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; ZIMMERMANN, J.P. Genetic control of blast in relation to nitrogen fertilization in upland rice. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.5, p.339-347, 1996.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; Avaliação de resistência à doenças de arroz. In: CURSO INTERNACIONAL DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE ARROZ, 1998, Goiás, Goiânia: EMBRAPA, 1998. p.2-4 .

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

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

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

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc.**, version 1.7. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Setauket, New York: Exeter, 1992.

ROMAO, J.; HAMER, J. Genetic organization of a repeated DNA sequence family in the rice blast fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p.5316-5320, 1992.

ROUMEN, E.; LEVY, M.; NOTTEGHAM, J.L. Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.103, p.363-371, 1997.

ROTHSTEIN, R.; HELMS, C. ROSENBERG, N. Concerted deletions and inversions are caused by mitotic recombination between delta sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.7, p.1198-1207, 1987.

SAVELKOUL, P.H.M.; AARTS, H.J.J.; HASS, L. et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.10, p.3083-3091, 1999.

SILUÉ, D.; NOTTEGHEM, J.L.; THARREAU, D. Evidence for a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.577-580, 1992.

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

SWEIGARD, J.A.; CARROLL, A.M.; FARRAL, L. et al. Identification, cloning, characterization of PWL2, a gene for host-species specificity in the rice blast fungus. **Plant Cell**, Rockville, v.7, n.8, p.1221-1233, 1995.

SWOFFORD, D.L. PAUP. **Phylogenetics analysis using parsimony (and others methods)**. Version 4.0. Sunderland: SINAUER Ass., 1998.

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

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

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

VAN DER PLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic press, 1968. 206p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

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

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

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

WOLFE, M.S.; SCHWARZBACH, E. The use of virulence analysis in cereal mildews **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.297-307, 1975.

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

XIA, J.Q.; CORRELL, J.C.; LEE, F.N. et al. DNA Fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.10, p.1029-1035, 1993.

XIA, J.Q.; CORRELL, J.C.; LEE, F.N.; ROSS, W.J. Regional population diversity of *pyricularia grisea* in Arkansas and the influence of host selection. **Plant disease**, St. Paul, v.84, n.8, p.877-884, 2000.

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

ZEIGLER, R.S.; CUOC, R.P.; BERNARDO, D.H. et al. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.4, p.443-451, 1995.

ZEIGLER, R.S.; SCOTT, R.P.; LEUNG, H. et al. Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.3, p. 284-294, 1997.

ZEIGLER, R.S. Recombination in *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p.249-276, 1998.

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

6. APÊNDICES

Apêndice 1. Composição do meio de cultura empregado para produção de micélio de *M. grisea*.

Macroelementos	Quant. (g)	Microelementos	Quant. (μg)
NaNO ₃	0,60	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2
KCl	0,52	H ₃ BO ₃	1,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,52	MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	1,52	FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,5
Dextrose	10,0	CaCl ₂ .6 H ₂ O	0,17
Peptona	2,0	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,16
Extrato de levedura	1,0	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,15
Ácido casamino	1,0	Na ₄ .EDTA	5,0
		Biotina	0,01
		Pyridoxina	0,01
		Tiamina	0,01
		Riboflavina	0,01
		Ácido para-aminobenzoico	0,01
		Ácido nicotínico	0,01

Apêndice 2. Mapa de SC indicando os municípios amostrados.



Apêndice 3. Matriz dos coeficientes de similaridade obtida através da análise por rep-PCR de 73 isolados de *M. grisea* coletados em 12 municípios no Estado de SC.

	I01	I02	I04	I05	I06	I07	I08	I09	I11	I12	I14	I15	I16	I17	I18	I19	I20	I21	I22	I23	I24	I25	I26	I27	I28	I29	I30	I31	I32	I33	I34	I35	I36	I37	I38	I39	I40	I41										
I02	100																																															
I04	100	100																																														
I05	96	96	96																																													
I06	96	96	96	100																																												
I07	100	100	100	96	96																																											
I08	100	100	100	96	96	100																																										
I09	100	100	100	96	96	100	100																																									
I11	100	100	100	96	96	100	100	100																																								
I12	100	100	100	96	96	100	100	100	100																																							
I14	96	96	96	92	92	96	96	96	96	96																																						
I15	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96																																					
I16	92	92	92	88	88	92	92	92	92	92	88	92																																				
I17	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92																																			
I18	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100																																		
I19	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100																																	
I20	92	92	92	96	96	92	92	92	92	92	88	92	85	92	92	92																																
I21	88	88	88	92	92	88	88	88	88	88	85	88	81	88	88	88	96																															
I22	96	96	96	92	92	96	96	96	96	96	100	96	88	96	96	96	88	85																														
I23	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96																													
I24	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100																												
I25	29	29	29	33	33	29	29	29	29	29	33	29	29	29	29	29	29	25	33	29	29																											
I26	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100	100	29																										
I27	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100	100	29	100																									
I28	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100	100	29	100	100																								
I29	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100	100	29	100	100	100																							
I30	88	88	88	92	92	88	88	88	88	88	85	88	96	88	88	88	88	85	85	88	88	33	88	88	88	88																						
I31	88	88	88	92	92	88	88	88	88	88	85	88	96	88	88	88	88	85	85	88	88	33	88	88	88	88	100																					
I32	92	92	92	88	88	92	92	92	92	92	88	92	100	92	92	92	85	81	88	92	92	29	92	92	92	92	96	96																				
I33	92	92	92	88	88	92	92	92	92	92	88	92	100	92	92	92	85	81	88	92	92	29	92	92	92	92	96	96	100																			
I34	85	85	85	81	81	85	85	85	85	85	88	85	92	85	85	85	77	74	88	85	85	37	85	85	85	85	88	88	92	92																		
I35	92	92	92	88	88	92	92	92	92	92	88	92	100	92	92	92	85	81	88	92	92	29	92	92	92	92	96	96	100	100																		
I36	92	92	92	88	88	92	92	92	92	92	88	92	100	92	92	92	85	81	88	92	92	29	92	92	92	92	96	96	100	100	92																	
I37	92	92	92	88	88	92	92	92	92	92	88	92	100	92	92	92	85	81	88	92	92	29	92	92	92	92	96	96	100	100	92	100																
I38	92	92	92	88	88	92	92	92	92	92	88	92	100	92	92	92	85	81	88	92	92	29	92	92	92	92	96	96	100	100	92	100	100															
I39	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100	100	29	100	100	100	100	88	88	92	92	85	92	92	92	92	92	92	92	100	100								
I40	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100	100	29	100	100	100	100	88	88	92	92	85	92	92	92	92	92	92	92	100	100								
I41	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100	100	29	100	100	100	100	88	88	92	92	85	92	92	92	92	92	92	92	100	100								
I42	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	96	100	92	100	100	100	92	88	96	100	100	29	100	100	100	100	88	88	92	92	85	92	92	92	92	92	92	92	100	100	100							

Apêndice 3. Continuação.

I42	I43	I44	I45	I46	I47	I48	I49	I50	I51	I52	I53	I54	I55	I56	I57	I58	I59	I60	I61	I62	I63	I64	I65	I66	I67	I68	I69	I70	I71	I72	I73	I74	I75			
92																																				
92	100																																			
100	92	92																																		
100	92	92	100																																	
92	100	100	92	92																																
100	92	92	100	100	92																															
92	100	100	92	92	100	92																														
100	92	92	100	100	92	100	92																													
92	100	100	92	92	100	92	100	92	100	92																										
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92																									
88	81	81	88	88	81	88	81	88	81	88	81	88																								
96	88	88	96	96	88	96	88	96	88	96	88	96	92																							
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96																						
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100																					
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100																				
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100																			
92	100	100	92	92	100	92	100	92	100	92	100	92	81	88	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	
92	100	100	92	92	100	92	100	92	100	92	100	92	81	88	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	
77	85	85	77	77	85	77	85	77	85	77	85	77	88	81	77	77	77	77	77	77	77	77	77	85	85											
92	100	100	92	92	100	92	100	92	100	92	100	92	81	88	92	92	92	92	92	92	92	92	92	100	100	85										
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92									
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92	100								
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92	100	100							
96	88	88	96	96	88	96	88	96	88	96	88	96	85	92	96	96	96	96	96	96	96	88	88	74	88	96	96	96								
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92	100	100	100	96							
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92	100	100	100	96	100						
92	85	85	92	92	85	92	85	92	85	92	85	92	81	88	92	92	92	92	92	92	85	85	70	85	92	92	92	96	92	92						
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92	100	100	100	96	100	100	92				
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92	100	100	100	96	100	100	92	100			
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92	100	100	100	96	100	100	92	100	100		
100	92	92	100	100	92	100	92	100	92	100	92	100	88	96	100	100	100	100	100	100	100	92	92	77	92	100	100	100	96	100	100	92	100	100	100	
92	100	100	92	92	100	92	100	92	100	92	100	81	88	92	92	92	92	92	92	92	100	100	85	100	92	92	92	88	92	92	85	92	92	92	92	

Apêndice 4. Matriz dos coeficientes de similaridade obtida através da análise por rep-PCR de 19 isolados de *M. grisea* coletados na Estação Experimental da Epagri em Itajaí-SC.

	I03	I10	I13	IEEI01	IEEI14	IEEI16	IEEI17	IEEI18	IEEI02	IEEI21	IEEI23	IEEI25	IEEI03	IEEI38	IEEI40	IEEI06	IEEI06a	IEEI07
I10	92																	
I13	92	100																
IEEI01	85	92	92															
IEEI14	85	92	92	100														
IEEI16	85	92	92	100	100													
IEEI17	92	100	100	92	92	92												
IEEI18	92	100	100	92	92	92	100											
IEEI02	92	100	100	92	92	92	100	100										
IEEI21	92	100	100	92	92	92	100	100	100									
IEEI23	85	92	92	100	100	100	92	92	92	92								
IEEI25	85	92	92	100	100	100	92	92	92	92	100							
IEEI03	88	96	96	88	88	88	96	96	96	96	88	88						
IEEI38	85	92	92	100	100	100	92	92	92	92	100	100	88					
IEEI40	85	92	92	100	100	100	92	92	92	92	100	100	88	100				
IEEI06	85	92	92	100	100	100	92	92	92	92	100	100	88	100	100			
IEEI06a	85	92	92	100	100	100	92	92	92	92	100	100	88	100	100	100		
IEEI07	85	92	92	100	100	100	92	92	92	92	100	100	88	100	100	100	100	
IEEI09	92	100	100	92	92	92	100	100	100	100	92	92	96	92	92	92	92	92