

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Arroz e Feijão  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## **Documentos 243**

### **Mapeamento Genético e Piramidização de Genes de Resistência no Desenvolvimento de Multilinhas e Cultivares Compostas de Arroz Irrigado com Resistência Estável à Brusone (*Pyricularia grisea*)**

Relatório Técnico

*Paulo Hideo Nakano Rangel  
Márcio Elías Ferreira  
Gil Rodrigues Santos  
Justino José Dias Neto  
Bruna Jaqueline Ohse Rosa de Araujo  
Leandro Nogueira Ramos  
Liamar Maria dos Anjos Silva  
João Antônio Mendonça  
Cleiciomar Gonçalves de Almeida  
Wagner Macêdo Costa*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Arroz e Feijão**

Rod. GO 462, Km 12  
Caixa Postal 179  
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO  
Fone: (0xx62) 3533 2100  
Fax: (0xx62) 3533 2123  
www.cnpaf.embrapa.br  
sac@cnpaf.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Luís Fernando Stone*  
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*  
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*  
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*  
Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*  
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*  
Foto da Capa: *Sebastião José de Araújo*

**1ª edição**

1ª impressão (2009): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Arroz e Feijão**

---

Mapeamento genético e piramidização de genes de resistência no desenvolvimento de multilinhas e cultivares compostas de arroz irrigado com resistência estável à brusone (*Pyricularia oryzae*): relatório técnico / Paulo Hideo Nakano Rangel ...[et al.]. Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2009.  
65 p. – (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 243)

1. Arroz irrigado – Melhoramento genético vegetal. 2. Arroz – Brusone – Resistência. 3. Arroz irrigado – Variedade resistente. 4. Marcador molecular. I. Rangel, Paulo Hideo Nakano. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

---

CDD 633.18233 (21. ed.)

© Embrapa 2009

# **Autores**

## **Paulo Hideo Nakano Rangel**

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, phrangel@cnpaf.embrapa.br

## **Márcio Elias Ferreira**

Engenheiro agrônomo, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, ferreira@cenargen.embrapa.br

## **Gil Rodrigues Santos**

Engenheiro agrônomo, Doutor em Fitopatologia, professor da Universidade Federal do Tocantins – Campus de Gurupi, Gurupi, TO, gilrsan@uft.edu.br

## **Justino José Dias Neto**

Engenheiro agrônomo, Mestre em Produção Vegetal  
Área de Concentração em Fitopatologia, aluno de Doutorado da Universidade Federal de Brasília, Brasília, DF. jldiasneto@uft.edu.br

## **Bruna Jaqueline Ohse Rosa de Araujo**

Bióloga, Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, estagiária da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, brunajaqueline@gmail.com

## **Leandro Nogueira Ramos**

Engenheiro agrônomo, Mestre em Fitopatologia, pesquisador da Pionner Sementes, Palmas, TO, leandronogr@yahoo.com.br

## **Liamar Maria dos Anjos Silva**

Engenheira agrônoma, Mestre em Produção Vegetal  
Área de Concentração em Fitopatologia, aluno de Doutorado da Universidade Federal de Brasília, Brasília, DF, liamarma@yahoo.com.br

**João Antônio Mendonça**

Biólogo, estudante de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Federal de Goiás, assistente da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO,  
joaoam@cnpaf.embrapa.br

**Cleiciomar Gonçalves de Almeida**

Técnico agrícola, assistente da Embrapa Arroz e Feijão, Formoso do Araguaia, TO,  
cleiciomargoncalves@hotmail.com

**Wagner Macêdo Costa**

Técnico agrícola da Secretaria de Agricultura do Tocantins, Formoso do Araguaia, TO,  
wagin.macedo@hotmail.com

## Apresentação

A cultura do arroz já teve um papel de destaque na economia goiana. Em 1986 foi plantado cerca de um milhão de hectares de arroz no estado. A partir de então, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2009), houve uma queda significativa dessa área e, em 2004/2005, foram plantados apenas 182.300 ha com uma produção de 381.000 toneladas, insuficientes para suprir o parque industrial arroseiro do estado, que importa arroz em casca principalmente da região Sul do Brasil.

Dentre as culturas anuais do Estado do Tocantins, o arroz irrigado continua ocupando posição de destaque do ponto de vista econômico e social. É um dos alimentos tradicionais da dieta da população tocantinense, sendo uma das principais fontes de energia alimentar. O arroz irrigado ocupa neste estado uma área que oscila entre 45.000 a 58.000 ha aproximadamente, com produtividade média em torno de 4.500 kg.ha<sup>-1</sup> (RANGEL, 1995). Em 2005 foi colhida uma área de 58.010 hectares com uma produção de 257.808 toneladas e uma produtividade média de 4.444 kg/ha (SILVA, 2009).

Nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil, a doença causada pelo fungo *Pyricularia grisea* é o principal obstáculo à expansão da rizicultura e ao incremento de produtividade no campo.

A quebra da resistência à brusone nas cultivares de arroz irrigado recentemente lançadas no Centro-Oeste e Norte do Brasil vem sendo verificada muito precocemente, geralmente após um a dois anos de cultivo. Isto é altamente indesejável, visto que o investimento de tempo, de recursos financeiros e de recursos humanos no desenvolvimento de uma nova cultivar é alto, geralmente necessitando de oito a dez anos de pesquisa, envolvendo milhões de reais, e dezenas de pesquisadores e técnicos.

A principal estratégia do projeto foi a piramidização indireta de diferentes alelos da família gênica *Pi* em linhagens elite de arroz, visando propiciar resistência estável à doença. A hipótese de trabalho é que a mistura de linhagens quase-isogênicas de arroz que possuem diferentes genes de resistência à brusone conferirá maior estabilidade de resistência no campo à população de isolados do patógeno. O desenvolvimento do projeto teve como ponto de partida as linhagens RC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> obtidas em programa de melhoramento nos últimos seis anos. Linhagens RC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> resistentes a diferentes raças de *P. grisea* encontradas em regiões de intensa produção de arroz no Centro-Oeste e Norte do Brasil foram selecionadas através da análise da interação patógeno-hospedeiro após a inoculação com isolados monospóricos de fungo identificando aquelas para a formação das cultivares multilinhas e cultivares compostas. Os isolados monospóricos foram oriundos de plantas infectadas por brusone coletadas em diversas lavouras nos municípios de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré, no Tocantins e Luís Alves do Araguaia em Goiás.

Foram realizadas, também, a caracterização genética dos isolados de *Pyricularia grisea* através de marcadores moleculares microssatélites, a identificação de marcadores moleculares microssatélites polimórficos em linhagens parentais recorrentes e linhagens doadoras de genes de resistência à brusone distribuídos nos 12 cromossomos de arroz, a genotipagem de plantas oriundas das linhagens RC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> com marcadores microssatélites polimórficos e selecionadas as que possuem maior percentual médio de conversão ao genoma de linhagens parentais recorrentes para realização do RC<sub>4</sub>, desenvolvidos ensaios de campo para avaliação

das características agronômicas das linhagens  $RC_3F_4$ , e desenvolvidos ensaios de campo com cultivares multilinhas e cultivares compostas para avaliação das características agronômicas e os testes de resistência à brusone no campo.

O conhecimento técnico-científico adquirido no projeto servirá de base para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à brusone no programa de melhoramento de arroz.

*Os autores*

# Sumário

<b>Dados Gerais do Projeto</b> .....	<b>9</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>9</b>
<b>Objetivos do Projeto</b> .....	<b>12</b>
<b>Metas Propostas</b> .....	<b>12</b>
<b>Principais Etapas Executadas</b> .....	<b>12</b>
1) Coleta e identificação de raças fisiológicas de <i>Magnaporthe grisea</i> isoladas de plantas de arroz coletadas em lavouras comerciais de Goiás, Tocantins e Pará e em armadilhas de brusone .....	12
2) Variabilidade genética de isolados monospóricos de <i>Magnaporthe grisea</i> (Barr.) coletados em regiões tropicais brasileiras.....	12
3) Mapeamento genético de locos de resistência a <i>Magnaporthe grisea</i> em linhagens puras recombinantes de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) .....	13
4) Obtenção e avaliação da resistência à brusone em condições controladas e das características agronômicas no campo .....	13
5) Introgessão assistida de genes de resistência à brusone para obtenção de linhagens quase- isogênicas de arroz .....	14
<b>Teses Defendidas e Publicadas</b> .....	<b>14</b>
<b>Trabalhos Publicados</b> .....	<b>14</b>
1) Artigos publicados em periódicos .....	14
2) Resumos em Congressos .....	14
<b>Resultados Alcançados</b> .....	<b>15</b>
1) Coleta e identificação de raças fisiológicas de <i>Magnaporthe grisea</i> isoladas de plantas de arroz coletadas em lavouras comerciais de Goiás, Tocantins e Pará e em armadilhas de brusone .....	15
Introdução .....	15
Materiais e Métodos .....	16
Coleta de plantas infectadas.....	16
Produção do inóculo (Isolados monospóricos) .....	17
Identificação de raças fisiológicas de <i>Magnaporthe grisea</i> .....	18
Resultados e Discussão .....	21
Conclusões .....	26
2) Variabilidade genética de isolados monospóricos de <i>Magnaporthe grisea</i> (Barr.) coletados em regiões tropicais brasileiras.....	26
Introdução .....	26
Materiais e Métodos .....	27
Isolados de <i>M. grisea</i> .....	27
Produção de micélio para extração de DNA .....	28
Genotipagem de isolados de <i>M. grisea</i> com marcadores microssatélites .....	28
Análises estatísticas .....	28
Resultados e Discussão .....	29
Análise de diversidade genética e eficiência de marcadores microssatélites na discriminação de isolados de <i>M. grisea</i> .....	29

Estrutura genética de população de isolados de <i>M. grisea</i> .....	33
Distância genética par-a-par entre isolados de <i>M. grisea</i> .....	34
Conclusões .....	38
3) Mapeamento genético de locos de resistência a <i>Magnaporthe grisea</i> em linhagens puras recombinantes de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) .....	38
Introdução .....	38
Materiais e Métodos .....	39
População de mapeamento.....	39
Obtenção, cultivo e armazenagem dos isolados de <i>M. grisea</i> .....	39
Plantio das linhagens parentais .....	39
Esporulação e inoculação .....	40
Avaliação de fenótipo da interação patógeno-hospedeiro.....	40
Avaliação da interação do isolado <i>M. grisea</i> P33 e linhagens puras recombinantes do cruzamento Chorinho x Amaro .....	40
Extração de DNA, reações de amplificação e seleção de locos polimórficos .....	41
Construção do mapa genético .....	42
Mapeamento de locos de resistência à brusone.....	42
Resultados e Discussão .....	43
Conclusões .....	47
4) Obtenção, avaliação da resistência à brusone em condições controladas e das características agronômicas no campo .....	48
Introdução .....	48
Materiais e Métodos .....	49
Obtenção das linhagens resistentes à brusone .....	49
Avaliação de virulência de raças de <i>M. grisea</i> em condições de laboratório.....	50
Avaliação das características agrônômica das linhagens resistentes à brusone em condições de campo .....	52
Resultados e Discussão .....	52
Avaliação das linhagens quanto à virulência de raças de <i>M. grisea</i> em condições controladas .....	52
Avaliação das características agrônômicas das linhagens resistentes à brusone em condições de campo.....	54
Constituição das multilinhas utilizando linhagens RC <sub>3</sub> F <sub>5</sub> .....	55
5) Introgessão assistida de genes de resistência à brusone para obtenção de linhagens quase- isogênicas de arroz .....	55
Introdução .....	55
Materiais e Métodos .....	55
Resultados e Discussão .....	55
<b>Considerações Gerais.....</b>	<b>57</b>
<b>Referências .....</b>	<b>58</b>



# Mapeamento Genético e Piramidização de Genes de Resistência no Desenvolvimento de Multilinhas e Cultivares Compostas de Arroz Irrigado com Resistência Estável à Brusone (*Pyricularia grisea*) Relatório Técnico

---

*Paulo Hideo Nakano Rangel*  
*Márcio Elias Ferreira*  
*Gil Rodrigues Santos*  
*Justino José Dias Neto*  
*Bruna Jaqueline Ohse Rosa de Araujo*  
*Leandro Nogueira Ramos*  
*Liamar Maria dos Anjos Silva*  
*João Antônio Mendonça*  
*Cleiciomar Gonçalves de Almeida*  
*Wagner Macêdo Costa*

## Dados Gerais do Projeto

**Título do Projeto:** Mapeamento genético e piramidização de genes de resistência no desenvolvimento de multilinhas e cultivares compostas de arroz irrigado com resistência estável à brusone (*Pyricularia grisea*).

**Referência da Chamada:** EDITAL UNIVERSAL CNPq 01/2006

**Processo:** CNPq 472444/2006-9

**Coordenador do Projeto:** Dr. Paulo Hideo Nakano Rangel

**Instituição:** Embrapa Arroz e Feijão

**Período de Vigência:** 01/10/2006 a 22/06/2009.

### Equipe do Projeto:

Dr. Paulo Hideo Nakano Rangel – Embrapa Arroz e Feijão

Dr. Márcio Elias Ferreira – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Gil Rodrigues Santos – Universidade Federal do Tocantins (UFT) – Campus de Gurupi

Justino José Dias Neto – Estudante do Curso de Mestrado em Produção Vegetal da UFT

Liamar Maria dos Anjos Silva - Estudante do Curso de Mestrado em Produção Vegetal da UFT.

Bruna Jaqueline Ohse Rosa de Araujo – Estudante do Curso de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília.

Leandro Nogueira Ramos – Estudante do Curso de Mestrado em Fitopatologia da Universidade de Brasília.

João Antônio Mendonça – Assistente de Pesquisa da Embrapa Arroz e Feijão

Cleiciomar Gonçalves de Almeida - Assistente de Pesquisa da Embrapa Arroz e Feijão

Wagner Macêdo Costa - Assistente de Pesquisa da Embrapa Arroz e Feijão

## Introdução

A cultura do arroz já teve um papel de destaque na economia goiana. Em 1986 foi plantado cerca de um milhão de hectares de arroz no estado. A partir de então, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2009), houve uma queda significativa dessa área e, em 2004/2005, foram

plantados apenas 182.300 ha com uma produção de 381.000 toneladas, insuficientes para suprir o parque industrial arrozeiro do estado, que importa arroz em casca principalmente da região Sul do Brasil.

Dentro do programa de recuperação da cultura do arroz no Centro-Oeste, dois projetos de arroz irrigado estão atualmente sendo implantados. O Projeto Luís Alves do Araguaia, localizado na região do médio Araguaia, que em pleno funcionamento terá uma área cultivada de 15.500 ha, tendo sua primeira etapa (1.730 ha) já concluída e em produção. A segunda etapa encontra-se em fase de implantação e deverá ter em torno de 7 mil hectares e a terceira, aproximadamente 6,5 mil hectares. Este projeto tem grande conotação social, já que, segundo estimativas, poderá gerar 1.500 empregos diretos e de 4 a 6 mil indiretos, inclusive pelo surgimento de indústrias de beneficiamento na região. O Projeto Flores de Goiás fica localizado no vale do Rio Paranã, no nordeste goiano e terá uma área total de 26.500 ha. Por estar situado na região mais pobre de Goiás, o Projeto Flores terá grande significado social, devendo beneficiar centenas de pequenos agricultores.

Dentre as culturas anuais do Estado do Tocantins, o arroz irrigado continua ocupando posição de destaque do ponto de vista econômico e social. É um dos alimentos tradicionais da dieta da população tocantinense, sendo uma das principais fontes de energia alimentar. O arroz irrigado ocupa neste estado uma área que oscila entre 45.000 a 58.000 ha aproximadamente, com produtividade média em torno de 4.500 kg.ha<sup>-1</sup> (RANGEL, 1995). Em 2005 foi colhida uma área de 58.010 hectares com uma produção de 257.808 toneladas e uma produtividade média de 4.444 kg/há (SILVA, 2009).

Com um clima propício ao cultivo do arroz, topografia plana, água em abundância e posição estratégica em relação às grandes capitais do Norte e Nordeste, o Estado do Tocantins constitui atualmente em uma das regiões mais promissoras para a expansão da rizicultura brasileira, podendo tornar-se o principal fornecedor de arroz para os centros consumidores das regiões Norte e Nordeste.

Apesar do imenso potencial para o cultivo do arroz irrigado e de já se encontrarem implantados projetos agro-industriais, localizados nos municípios de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão, Cristalândia e Pium, a região necessita de uma maior atuação da pesquisa, capaz de fornecer um produto competitivo e que atenda os anseios do mercado consumidor principalmente das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil.

Nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil, a doença causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. (telomorfo *Magnaphorte grisea*) é o principal obstáculo à expansão da rizicultura e ao incremento de produtividade no campo.

Os programas de melhoramento genético de arroz (*Oryza sativa* L.) não têm sido eficazes no desenvolvimento de cultivares com resistência estável ao principal fungo que ataca a cultura, a *Pyricularia grisea*. O fungo provoca na planta do arroz uma infecção sistêmica, conhecida como brusone, que afeta significativamente o desenvolvimento e a produtividade da planta de arroz, causando manchas e lesões nas folhas, panículas e grãos. A infecção, eventualmente, leva à morte da planta. A quebra da resistência à brusone nas cultivares de arroz irrigado recentemente lançadas no Centro-Oeste e Norte do Brasil vem sendo verificada muito precocemente, geralmente após um a dois anos de cultivo. Isto é altamente indesejável, visto que o investimento de tempo, de recursos financeiros e de recursos humanos no desenvolvimento de uma nova cultivar é alto, geralmente necessitando de oito a dez anos de pesquisa, envolvendo milhões de reais, e dezenas de pesquisadores e técnicos. A doença constitui-se, portanto, em um dos mais importantes fatores limitantes ao plantio do arroz no Brasil. Para o agricultor, uma epidemia de brusone no campo onera os custos de produção de grãos em cerca de 15 a 18% e provoca significativas perdas de produtividade e qualidade do produto.

O mercado de grãos de arroz, o terceiro mais importante do país, necessita urgentemente de novas estratégias de melhoramento genético que acelerem o desenvolvimento varietal, minimizando o risco de epidemias e de perdas de produtividade devido à brusone. O Brasil é um grande consumidor de arroz mas ainda não produz todo o arroz que necessita, valendo-se de importação de aproximadamente 10%

da produção nacional para suprir a demanda interna. A ocorrência de epidemias de brusone e a quebra precoce de resistência das cultivares lançadas coloca em risco a nossa produção e pode levar a níveis ainda maiores de importação de grãos de arroz, o que é altamente indesejável para o país. A doença é tão importante que o principal objetivo do melhoramento genético do arroz irrigado nos últimos anos, especialmente para as regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil, tem sido obtenção de resistência estável à brusone.

A principal estratégia do projeto foi a piramidização indireta de diferentes alelos da família gênica *Pi* em linhagens elite de arroz, visando propiciar resistência estável à doença. A hipótese de trabalho é que a mistura de linhagens quase-isogênicas de arroz que possuem diferentes genes de resistência à brusone conferirá maior estabilidade de resistência no campo à população de isolados do patógeno. A premissa básica do projeto foi que cultivares com genes de resistência introgrididos de diferentes fontes de resistência (alelos *Pi* distintos em locos distintos) dificultará a quebra de resistência no processo de co-evolução planta-patógeno, conferindo maior longevidade às cultivares resistentes. Isto poderia ser obtido, por exemplo, pela introgressão simultânea de diferentes alelos da família *Pi* em uma mesma cultivar ("cultivar composta") utilizando marcadores ligados aos genes de resistência. No entanto, até o momento, o conhecimento dos locos gênicos responsáveis por resistência a isolados de brusone coletados no Brasil é simplesmente nulo, assim como de marcadores moleculares flanqueando tais locos. Alternativamente, neste projeto, a piramidização de genes foi obtida de maneira indireta, através da introgressão não simultânea de alelos de resistência identificados em diferentes linhagens doadoras para uma mesma linhagem elite recorrente. Assim, as linhagens quase-isogênicas à linhagem elite recorrente poderiam ser misturadas para constituir uma cultivar multilinha, utilizada comercialmente. A cultivar multilinha teria o mesmo fenótipo que o parental recorrente, porém, possuiria alelos distintos da família *Pi* em diferentes locos gênicos. O projeto desenvolveu, portanto, linhagens quase-isogênicas detentoras de diferentes genes de resistência ao patógeno e utilizou-as na confecção de cultivares multilinhas com resistência estável à brusone. O projeto testou ainda a mistura de linhagens quase-isogênicas obtidas de diferentes linhagens elite recorrentes, mais que possuem característica agrônomicas similares, como porte, arquitetura, ciclo, tipo de grão, entre outras, formando as cultivares compostas. A comparação entre os dois tipos, cultivares multilinhas e cultivares compostas, em relação à resistência ao patógeno oferecerá importante indicativo da eficiência da metodologia na obtenção de resistência estável à brusone.

O desenvolvimento do projeto teve como ponto de partida as linhagens  $RC_3F_4$  obtidas em programa de melhoramento nos últimos seis anos. Linhagens  $RC_3F_4$  resistentes a diferentes raças de *P. grisea* encontradas em regiões de intensa produção de arroz no Centro-Oeste e Norte do Brasil serão selecionadas através da análise da interação patógeno-hospedeiro após a inoculação com isolados monospóricos de fungo foram identificadas para a formação das cultivares multilinhas e cultivares compostas. Os isolados monospóricos foram oriundos de plantas infectadas por brusone coletadas em diversas lavouras nos municípios de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré, no Tocantins e Luís Alves do Araguaia em Goiás.

Foram realizadas também a caracterização genética dos isolados de *Pyricularia grisea* através de marcadores moleculares microssatélites, a identificação de marcadores moleculares microssatélites polimórficos em linhagens parentais recorrentes e linhagens doadoras de genes de resistência à brusone distribuídos nos 12 cromossomos de arroz, a genotipagem de plantas oriundas das linhagens  $RC_3F_4$  com marcadores microssatélites polimórficos e selecionadas as que possuem maior percentual médio de conversão ao genoma de linhagens parentais recorrentes para realização do  $RC_4$ , desenvolvidos ensaios de campo para avaliação das características agrônomicas das linhagens  $RC_3F_4$ , e desenvolvidos ensaios de campo com cultivares multilinhas e cultivares compostas para avaliação das características agrônomicas e os testes de resistência à brusone no campo.

O conhecimento técnico-científico adquirido no projeto servirá de base para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à brusone no programa de melhoramento de arroz.

## Objetivos do Projeto

- 3.1. Coletar e identificar as raças fisiológicas de isolados de *P. grisea* prevalentes no Centro-Oeste e Norte do Brasil.
- 3.2. Caracterizar geneticamente os isolados de *P. grisea* através de marcadores moleculares microssatélites.
- 3.3. Identificar marcadores microssatélites polimórficos em linhagens parentais recorrentes e linhagens doadoras de genes de resistência à brusone, distribuídos nos 12 cromossomos de arroz.
- 3.4. Desenvolver linhagens quase-isogênicas resistentes a diferentes raças de *P. grisea*.
- 3.5. Desenvolver ensaios de campo para avaliação das características agronômicas das linhagens RC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> e os níveis de resistência à brusone no campo.
- 3.6. Desenvolver ensaios de campo com cultivares multilinhas e cultivares compostas para avaliação das características agronômicas e os testes de resistência à brusone no campo.
- 3.7. Genotipagem de plantas oriundas das linhagens RC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> com marcadores microssatélites polimórficos e selecionadas as que possuem maior percentual médio de conversão ao genoma de linhagens parentais recorrentes para realização do RC<sub>4</sub>.

## Metas Propostas

- 4.1. Desenvolver e testar metodologia de seleção assistida por marcadores moleculares que permita rápida conversão de linhagens de arroz com diferentes genes de resistência à brusone.
- 4.2. Construir multilinhas e cultivares compostas pelas misturas de linhagens com diferentes genes de resistência à brusone.
- 4.2. Obter pelo menos uma nova cultivar (multilinha ou composta) resistente à brusone ao término do projeto.

## Principais Etapas Executadas

### 1) Coleta e identificação de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* isoladas de plantas de arroz coletadas em lavouras comerciais de Goiás, Tocantins e Pará e em armadilhas de brusone

Foram realizadas coletas de plantas com sintomas típicos de brusone nas folhas e panículas em lavouras comerciais de arroz dos estados de Goiás (Luís Alves), Tocantins (Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré) e Pará. Das amostras coletadas foram produzidos e analisados 534 isolados monospóricos de *M. grisea*. A identificação das raças se deu através da avaliação das combinações de reações na série internacional de diferenciadoras após inoculação dos isolados monospóricos. Foram identificadas 61 raças nas regiões avaliadas. Estas raças estão presentes em oito dos nove grupos de patótipos. Os dez mais prevalentes foram compostos pelas raças IA-1, IC-1, ID-1, IA-65, ID-9, IB-1, IA-33, IA-41, IA-9 e IB-41 que representam, respectivamente, 20,6, 11,8, 10,86, 6,18, 5,43, 4,49, 4,31, 3,75, 3,18 e 3% do total de raças identificadas. Uma maior quantidade de raças foi verificada nos municípios de Lagoa da Confusão e em Formoso do Araguaia. Ao se analisar a prevalência das raças em cada um dos locais, pode se verificar uma mudança quanto à composição das dez raças prevalentes. De um total de 250 isolados monospóricos obtidos nas áreas experimentais de multilinhas e variedades compostas distribuídos em fazendas localizadas nos municípios de Lagoa da Confusão e Formoso do Araguaia, foram identificadas 45 raças fisiológicas. Também foram identificadas 37 raças procedentes de 284 isolados monospóricos originários de cultivares comerciais plantados em áreas do Tocantins (Lagoa da Confusão, Formoso do Araguaia e Dueré), Goiás (Luís Alves) e Pará (Paragominas). Os dados mostraram que existe alta variabilidade do fungo *M. grisea* nas regiões avaliadas, principalmente nas áreas orizícolas localizadas no Estado do Tocantins.

### 2) Variabilidade genética de isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea* (Barr.) coletados em regiões tropicais brasileiras

Foram avaliados 114 isolados monospóricos de *M. grisea* obtidos nos municípios de Lagoa da Confusão, Dueré, Formoso do Araguaia (Tocantins), Luís Alves do Araguaia (Goiás) e Paragominas (Pará) visando estudar a variabilidade genética e a estrutura de população desses isolados. Na genotipagem automática em sequenciador de DNA, utilizou-se 14 marcadores microssatélites, marcados com fluorocromo. Os marcadores

microssatélites mostraram-se altamente eficientes para detectar estruturação em população de isolados monospóricos de *M. grisea*. A análise das relações genéticas desses isolados, através do programa Structure sugeriu uma estruturação em três grupos, através do melhor  $K=3$ . O dendrograma sugeriu que os isolados estavam separados através de certa estruturação genética, em sua maioria correspondendo às regiões geográficas. A alta diversidade genética observada na população de isolados, assim como a evidência de estruturação sugerem a necessidade de monitoramento específico e emprego de estratégias adequadas (ex., multilinhas, piramidização) pelos programas de melhoramento genético para as subpopulações detectadas.

### **3) Mapeamento genético de locos de resistência a *Magnaporthe grisea* em linhagens puras recombinantes de arroz (*Oryza sativa* L.)**

A localização de genes de resistência no genoma de arroz e o desenvolvimento de estratégias de emprego de genes de resistência completa e/ou parcial no melhoramento genético é parte importante do desenvolvimento de variedades melhoradas. A identificação e localização no genoma de genes de resistência à brusone na interação entre isolados de *M. grisea* coletados no Brasil e variedades de arroz é ainda inédita. Nenhum gene de resistência a isolados específicos do patógeno coletados no Brasil foi mapeado no genoma de arroz até o momento. O objetivo deste trabalho foi identificar regiões do genoma de arroz associadas ao controle de resistência à brusone, utilizando isolados do patógeno coletados na região Central do Brasil e variedades tradicionais de arroz do Banco de Germoplasma da Embrapa. Para isto, uma população de linhagens puras recombinantes (RILs - *Recombinant Inbred Lines*) derivadas do cruzamento entre as variedades Chorinho (variedade tradicional - resistente) e Amaroó (variedade comercial - suscetível) foi utilizada para mapear locos de resistência ao isolado P33 (raça fisiológica ID-10), coletado em Formoso do Araguaia, TO. A fenotipagem de resistência à doença nas linhagens oriundas da população foi realizada em condições controladas de casa de vegetação. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios monospóricos ( $3 \times 10^5$  conídios/ml) e avaliadas com base em uma escala de notas (1 a 9) de fenótipo da interação patógeno-hospedeiro. A genotipagem da população segregante foi feita com 124 marcadores microssatélites (SSR) distribuídos no genoma de arroz, utilizando um sequenciador automático ABI-3700. Foi construído um mapa genético dos 12 cromossomos de arroz, com 1240 cM e distância de recombinação média entre marcadores de 10,0 cM. A fenotipagem da população RILs e testes de ligação com os 124 locos microssatélites genotipados possibilitou a identificação de três locos no cromossomo 7 (RM7441, RM505 e RM234) e dois locos no cromossomo 8 (RM7285 e RM3153), significativamente associados ao controle de resistência ao isolado *M. grisea* P-33. O loco mapeado no cromossomo 7 foi provisoriamente denominado *Pi-Ch1* e o mapeado no cromossomo 8, *Pi-Ch2*. Os alelos de resistência ao patógeno nas duas regiões genômicas foram doados pela variedade tradicional de arroz Chorinho. Marcadores microssatélites ligados a genes de resistência à brusone em outros cruzamentos e mapeados no presente estudo corroboram os resultados dos testes de ligação.

### **4) Obtenção, avaliação da resistência à brusone em condições controladas e das características agrônômicas no campo**

Foram obtidas 26 linhagens resistentes sendo, 13 oriundas da cultivar BRS Formoso, duas da Diamante e 11 da CNA 8502. Estas linhagens juntamente com quatro testemunhas (Diamante, CNA 8502, BRS Formoso e Metica 1) e cinco fontes de resistência à brusone (CNAi 9022, Oryzica Llanos 5, Oryzica Llanos 4, Oryzica 1 e 5287), foram inoculadas em condições controladas com as dez raças mais prevalentes de *Magnaporthe grisea* em lavouras comerciais e áreas experimentais dos municípios de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré no Estado do Tocantins, Luís Alves no Estado de Goiás e Paragominas no Pará. As raças utilizadas foram: IA-1, IC-1, ID-1, IA-65, ID-9, IB-1, IA-33, IA-41, IA-9 e IB-41. Simultaneamente as 26 linhagens resistentes mais quatro testemunhas, (BRS Formoso, Diamante, CNA 8502 e Metica 1) foram avaliadas nos Ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) nos anos agrícolas 2006/07, 2007/08 e 2008/09 em vários ambientes de Goiás e Tocantins. Baseando-se nos resultados da caracterização agrônômica no campo e a reação às raças prevalentes de brusone obtidas em condições controladas, foram formadas quatro multilinhas, três com linhagens oriundas da cultivar BRS Formoso; CNA10901 + CNA10891; CNA10902 + CNA10891; CNA10901 + CNA10891 e uma com linhagens oriundas da cultivar Diamante; CNA10905 + CNA10906.

## 5) Introgessão assistida de genes de resistência à brusone para obtenção de linhagens quase-isogênicas de arroz

Dentre as 27 famílias de linhagens quase-isogênicas ( $RC_3F_5$ ) foram selecionadas as dez linhagens mais promissoras com base na análise de características agrônômicas em ensaios de campo e dentro de cada uma delas foram selecionadas 100 plantas para genotipagem, com 17 marcadores microssatélites distribuídos nos cromossomos de arroz, totalizando 17.000 genótipos analisados. Os marcadores microssatélites utilizados na genotipagem foram: RM116, RM171, RM222, RM235, RM481, RM6810, RM22, RM201, RM307, RM408, RM422, RM1164, RM190, OG10, RM300, RM7200, RM447. Em cada uma das dez famílias foram selecionadas de três a dez plantas com maior grau de conversão para o genoma das cultivares recorrentes de arroz, com base na comparação do genótipo multiloco observado em cada planta e o genótipo observado em cada parental recorrente. Desta forma, as plantas  $RC_3$  resistentes à brusone e geneticamente mais similares às respectivas linhagens parentais recorrentes foram selecionadas. Sementes  $RC_3F_1$  e  $RC_4$  foram então obtidas destas famílias para o desenvolvimento de linhagem quase-isogênicas, e confecção de multilinhas de resistência à brusone do arroz.

## Teses Defendidas e Publicadas

ARAUJO, B. J. O. R. de. **Mapeamento genético de locos de resistência a *Magnaporthe grisea* em linhagens puras recombinantes de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2008. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

DIAS NETO, J. J. ***Magnaporthe grisea*: biologia e identificação de patótipos isolados de plantas de arroz na região tropical do Brasil**. 2008. 97 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.

RAMOS, L. N. **Estrutura populacional e parâmetros epidemiológicos de isolados de *Magnaporthe grisea* (Barr)**. 2009. 132 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SILVA, L. M. dos A. **Identificação de patótipos de *Magnaporthe grisea* coletados durante o desenvolvimento de multilinhas e variedades compostas de arroz irrigado no Estado do Tocantins**. 2008. 95 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.

## Trabalhos Publicados

### 1) Artigos publicados em periódicos

DIAS NETO, J. J.; SANTOS, G. R.; ANJOS, L. M. dos; CUNHA, A. C. F.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Rice irrigated fields of Central Brazil are hot spots for diversity of *Magnaporthe grisea* physiological races. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF (No prelo).

### 2) Resumos em Congressos

CASTRO NETO, M. D.; SANTOS, G. R.; DIAS NETO, J. J.; RANGEL, P. H. N.; SILVA, L. M. A.; RIBEIRO, F. F. Reação de genótipos de arroz de terras altas às principais doenças em Formoso do Araguaia no Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 210, ago. 2008. Suplemento. ref. MEL-044. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

CASTRO NETO, M. D.; SANTOS, G. R.; DIAS NETO, J. J.; RANGEL, P. H. N.; SILVA, L. M. A.; RIBEIRO, F. F. Resistências de genótipos de arroz de terras altas à doenças no sul do Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 209, ago. 2008. Suplemento. ref. MEL-043. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

DIAS NETO, J. J.; SANTOS, G. R.; SILVA, L. M. A.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E.; CUNHA, A. C. F.; CANJÃO, E. R.; CASTRO NETO, M. D. Agressividade de raças de *Pyricularia grisea* em Série Internacional de Diferenciadoras no Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 186, ago. 2008. Suplemento. ref. EPI-054. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

DIAS NETO, J. J.; SANTOS, G. R.; SILVA, L. M. A.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E.; CUNHA, A. C. F.; CANJÃO, E. R.; CASTRO NETO, M. D. Identificação de raças fisiológicas de *Pyricularia grisea* em arroz no Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 186, ago. 2008. Suplemento. ref. EPI-053. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

PINHO, B. R. B.; SANTOS, G. R.; DIAS NETO, J. J.; SILVA, L. M. A.; CASTRO NETO, M. D.; RANGEL, P. H. N.; CUNHA, A. C. F. Avaliação da resistência de genótipos de arroz em várzeas no Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 208, ago. 2008. Suplemento. ref. MEL-037. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

SANTOS, G. R.; CASTRO NETO, M. D.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E.; DIAS NETO, J. J.; SILVA, L. M. A.; SARMENTO, R. A. Avaliação de uma coleção de germoplasma de arroz para resistência às principais doenças no sul do Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 206, ago. 2008. Suplemento. ref. MEL-029. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

SANTOS, G. R.; SILVA, L. M. A.; DIAS NETO, J. J.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E.; CANJÃO, E. R.; CUNHA, A. C. F.; CASTRO NETO, M. D. Esporulação de *Pyricularia grisea* do arroz em culturas com diferentes idades. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 183, ago. 2008. Suplemento. ref. EPI-042. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

SILVA, L. M. A.; SANTOS, G. R.; DIAS NETO, J. J.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E.; CUNHA, A. C. F.; CANJÃO, E. R.; CASTRO NETO, M. D. Identificação de raças de *Pyricularia grisea* em multilinhas e variedades compostas de arroz irrigado no Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 233, ago. 2008. Suplemento. ref. MIC-076. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

SILVA, L. M. A.; SANTOS, G. R.; DIAS NETO, J. J.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E.; CANJÃO, E. R.; CUNHA, A. C. F.; CASTRO NETO, M. D. Severidade de *Pyricularia grisea* em multilinhas e variedades compostas no Sul do Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 233, ago. 2008. Suplemento. ref. MIC-077. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

## Resultados Alcançados

### 1) Coleta e identificação de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* isoladas de plantas de arroz coletadas em lavouras comerciais de Goiás, Tocantins e Pará e em armadilhas de brusone<sup>1</sup>

#### Introdução

Dentre as doenças do arroz, a brusone causada pelo fungo *Magnaporthe grisea*, anamorfo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., é uma das mais importantes pela sua ampla distribuição geográfica e capacidade de destruição (NUNES et al., 2007). A doença tem sido um desafio para os orizicultores, constitui-se um dos fatores limitantes da produtividade do arroz irrigado (várzeas) e de sequeiro (terras altas), em todo o território

<sup>1</sup> Parte da Dissertação apresentada pelo estudante JUSTINO JOSÉ DIAS NETO ao Mestrado em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal – Área de Concentração em Fitopatologia.

brasileiro e no mundo (IGARASHI et al., 1986). A severidade da brusone depende de uma série de condições relacionadas à resistência do hospedeiro, a presença de raças do patógeno e a prevalência de fatores do ambiente favoráveis ou não à doença (BEDENDO, 1997). Os prejuízos são variáveis causando perdas significativas na produtividade, sendo que, sob condições favoráveis, as perdas podem chegar até 100% (SANTOS; BIAVA, 2004). A cada 1% de severidade nas folhas e panículas, as perdas de produtividade variaram de 2,7 a 1,5%, em cultivares de ciclo precoce e tardio, respectivamente (PRABHU et al., 1989). Os fungicidas utilizados no controle do patógeno não tem apresentado eficiência, contribuindo para o encarecimento do processo de produção (SANTOS et al., 2003).

Na cultura do arroz, os programas de melhoramento têm criado diversas variedades com resistência vertical, porém, elas quebram a resistência em apenas um a dois anos de cultivo comercial. As causas foram atribuídas à mudança no padrão de frequência da população das raças do patógeno (LEVY et al., 1993); a não detecção de uma raça patogênica durante o processo de seleção de uma linhagem (CORREA-VICTORIA; ZEIGLER, 1993) e à evolução do patógeno em resposta a pressão seletiva exercida devido à resistência da cultivar lançada ou uso de fungicidas específicos, além da migração de populações do patógeno de uma região a outra (LEUNG et al., 1993). Outras implicações seria a exposição inadequada dos materiais à diversidade populacional do patógeno durante os programas de melhoramento, o que, segundo Filippi et al. (1999), a diversidade patogênica é geralmente alta em campos experimentais e nos locais de testes de seleção para melhoramento de cultivares e também a alta variabilidade do fungo causador da doença que é composto de patótipos, ou raças fisiológicas, com características de virulência distintas (CORREA-VICTORIA; ZEIGLER, 1993).

Para o desenvolvimento e recomendação de cultivares de arroz resistentes a brusone, é importante o conhecimento da diversidade e prevalência das raças fisiológicas nas regiões onde as cultivares serão recomendadas. Como a população do patógeno é altamente variável e dinâmica, faz-se necessário uma amostragem e identificação das raças prevalentes para que os genes empregados nas novas cultivares sejam eficazes na conferência de resistência às principais raças do patógeno. O trabalho teve como objetivo identificar as raças fisiológicas de *M. grisea* prevalentes em lavouras comerciais de arroz nos Estados do Tocantins, Goiás e Pará.

## Materiais e Métodos

### Coleta de plantas infectadas

As coletas foram realizadas nos anos agrícolas 2006/2007 e 2007/2008 em pólos representativos de produção comercial de arroz irrigado em diversas lavouras no Estado do Tocantins, nos municípios de Lagoa da Confusão, Dueré e Formoso do Araguaia, no projeto "Luís Alves" município de Luís Alves do Araguaia no Estado de Goiás e Paragominas no Estado do Pará. As plantas doentes foram coletadas em nove cultivares comerciais sendo, três (Best 2000, BRSMG Curinga e BRS Primavera) de terras altas e seis (Epagri 108, Epagri 109, Epagri 112, Epagri 114, QM 13, Piracema) de arroz irrigado. Foram realizadas, também, coletas em ensaio de avaliação de multilinhas e cultivares compostas de arroz irrigado, denominado de armadilha de brusone (Tabela 1). A relação entre as cultivares onde foram realizadas as coletas e os municípios é mostrada na Figura 1.

**Tabela 1.** Tratamentos do ensaio de multilinhas e cultivares compostas de arroz irrigado no qual foram realizadas as coletas de plantas de arroz com sintomas típicos de brusone, na safra 2007/2008.

Trat	Tratamentos	Composição
01	Formoso	CNA (10891, 10894, 10899, 10902, 10904)
02	Diamante	CNA (10905, 10906)
03	CNA8502	CNA (10910, 10914, 10918, 10923, 10926, 10927)
04	Formoso + Diamante	CNA (10891, 10899, 10905, 10906)
05	Formoso + CNA8502	CNA (10891, 10894, 10899, 10914, 10926, 10927)
06	Diamante + CNA8502	CNA (10905, 10906, 10910, 10914)
07	Formoso + Diamante + CNA8502	CNA (10891, 10899, 10905, 10906, 10914, 10926)
08	Formoso	Testemunha
09	Diamante	Testemunha
10	CNA8502	Testemunha
11	EPAGRI 109	Testemunha



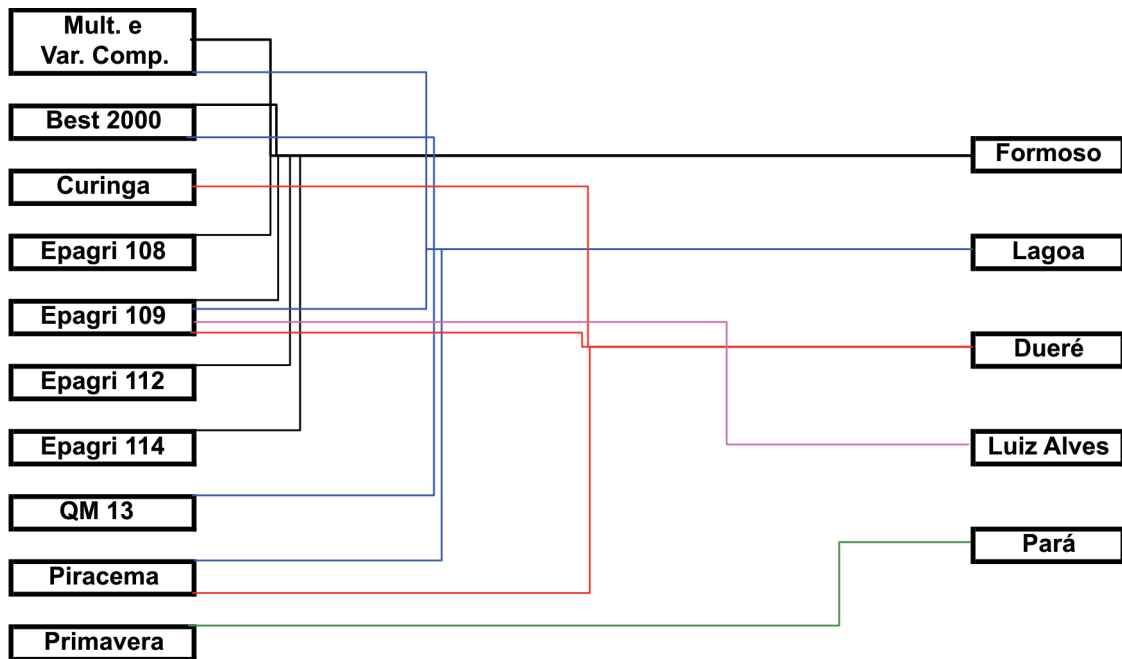


Fig. 1. Diagrama esquemático da relação entre municípios e cultivares em cada região onde foram realizadas coletas de arroz com sintomas típicos de brusone, safras 2006/2007 e 2007/2008.

As coletas foram realizadas em duas épocas distintas, sendo uma na fase vegetativa de folhas infectadas e outra na fase reprodutiva para panículas. As coletas nas folhas foram realizadas em plantas com idade entre 25 a 55 dias, constituindo-se o período mais crítico para a brusone na fase vegetativa. Foram coletadas as folhas que apresentavam reação de susceptibilidade à brusone e com lesões esporulativas, principalmente naquelas mais novas para possibilitar o isolamento. Durante as coletas foram evitadas áreas tratadas com fungicidas, sendo realizada nestes locais após quinze dias da aplicação, quando ocorreu reincidência da doença ou passado o período residual do fungicida. Evitou-se coletar folhas mais velhas, pois estas normalmente apresentam lesões que teoricamente já esgotaram a produção de esporos, e/ou apresentam contaminações por outros organismos, tais como bactérias e fungos saprofitos dificultando o isolamento.

Todo material coletado recebeu identificação individual quanto ao município, propriedade, denominação da parcela na propriedade, cultivar plantada, data de plantio e de coleta e as coordenadas geográficas do local obtidas através de GPS. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em embalagens de papel e transportadas para laboratório, sendo secas à sombra, em temperatura ambiente por 24 horas com a finalidade de reduzir a umidade evitando-se contaminação e proliferação de microrganismos, além de evitar que o fungo esporulasse durante o armazenamento. Em seguida, as amostras foram armazenadas em refrigerador a 4°C até o isolamento.

Após a emissão das panículas, as parcelas onde se realizou a coleta de folhas foram localizadas com auxílio de GPS e amostras com sintomas típicos de brusone e com lesões esporulativas na panícula, ráquis e ramificações foram coletadas, sendo as mesmas identificadas, secadas na sombra por 24 horas e armazenadas em refrigerador a 4°C até o isolamento.

### Produção do inóculo (Isolados monospóricos)

A obtenção dos isolados monospóricos ocorreu no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi. Cada uma das amostras coletadas deu origem a apenas um isolado monospórico, sendo produzidos um total de 534 isolados. As amostras anteriormente coletadas foram retiradas do refrigerador e em seguida recortadas, sendo utilizados apenas fragmentos de folhas e de panículas com lesões típicas de brusone. Estes fragmentos, sem assepsia, foram

então colocados em câmara úmida constituída de placas de Petri estéreis com guardanapos de papel umedecido em água destilada estéril. Todas as amostras, após serem colocadas em câmara úmida, foram identificadas conforme sua origem e acondicionadas em câmara incubadora tipo B.O.D., com temperatura ajustada em 25°C por 24 horas, para possibilitar a esporulação do fungo nas lesões. Com o auxílio de uma lupa ótica e utilizando uma agulha de ponta fina realizou-se a transferência dos conídios das lesões esporuladas para placas de Petri estéreis, contendo meio de cultura agar-água (20g de agar para 1,0L de água) autoclavado (120°C durante 30 minutos), que foi espalhado sobre a superfície do meio com alça de platina. Após a transferência do esporo para o meio ágar-água, as placas foram vedadas com fita PVC, identificadas e colocadas em câmara incubadora tipo B.O.D. com temperatura ajustada para 25°C, por 48 horas até a germinação dos conídios no meio de cultura. Posteriormente com o auxílio de uma lupa e bisturi, os conídios germinados foram repicados e transferidos para meio de cultura BDA (250g batata + 20g dextrose + 20g agar por litro de água, acrescido de 250mg do antibiótico Ampicilina). Após 14 dias de incubação a 25°C os isolados monospóricos estavam crescidos. Posteriormente, foram realizadas repicagens dos isolados para tubos de ensaios com meio de cultura BDA, sendo mantidos a 25°C para crescimento, até tomar toda a superfície do meio de cultura, em seguida foram congelados a -18°C.

### Identificação de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea*

A identificação das raças fisiológicas de *M. grisea* foi realizada por meio da análise visual do fenótipo, através da interação patógeno-hospedeiro após a inoculação dos isolados monospóricos na Série Internacional de Diferenciadoras (SID) (Tabela 2) (ATKINS et al., 1967). Inicialmente, foram padronizados os métodos de inoculação, avaliação das plantas e as condições ambientais pelas quais as etapas da identificação das raças foram expostas. Segundo Prabhu e Filippi (2006), a padronização é importante, pois as reações estão sujeitas às variações quanto ao estado nutricional, idade das plantas na época de inoculação, densidade de plantio, condições microclimáticas durante o período de incubação, colonização do patógeno e posterior desenvolvimento das lesões.

**Tabela 2.** Grupos, série internacional de diferenciadoras de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* e sua origem.

Grupo	Diferenciadora	Origem
A	Raminad Str-3	Filipinas
B	Zenith,	E.U.A.
C	NP-125	Índia
D	Usen,	China
E	Dular	Paquistão
F	Kanto 51	Japão
G	Sha-tiao-tsao	China
H	Caloro	E.U.A.

Fonte: Adaptado de Prabhu e Filippi (2006).

A fase de identificação das raças foi composta basicamente por quatro etapas: a) Plantio das diferenciadoras, b) Multiplicação do inóculo, c) Inoculação do patógeno nas diferenciadoras e d) Avaliação das reações, sendo esta seguida da entrada dos dados na chave de identificação.

**a) Plantio das variedades diferenciadoras** - As variedades diferenciadoras foram semeadas em bandejas plásticas com dimensões de 38 x 28 x 7 cm, utilizando-se doze sementes por linha. Cada bandeja conteve todas as oito variedades diferenciadoras internacionais. Foram utilizados para o plantio 3,5 litros de substrato comercial PLANTMAX, autoclavados a 120°C, por 30 minutos antes do semeio nas bandejas. O semeio foi realizado em bandejas que foram mantidas em casa-de-vegetação climatizada com temperatura controlada para 25°C, para crescimento das plântulas até o momento da inoculação. Não foi realizada adubação de plantio, pois o substrato utilizado apresentou teores adequados de nutrientes, mostrando-se suficiente para manutenção dos processos fisiológicos das plantas sem

o aparecimento de sintomas de deficiência até o seu descarte. Aos quinze dias após a emergência das plântulas foi realizada uma adubação de cobertura com 3g de Uréia (45% N) por bandeja, com a finalidade de predispor as plântulas ao ataque de *M. grisea*. Após a adubação as bandejas permaneceram na estufa por mais sete dias até voltarem para o laboratório para posterior inoculação aos 25 dias após o plantio.

**b) Multiplicação do inóculo** - A multiplicação do inóculo se deu simultaneamente ao desenvolvimento das diferenciadoras. Cada um dos isolados foi repicado sob condição asséptica, com auxílio de um bisturi para placas de Petri estéreis contendo meio BDA. No 12º dia foi dado o estresse nos isolados monospóricos, as placas foram abertas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar e o micélio superficial foi raspado com um bastão de aço estéril, sendo os isolados colocados novamente em câmara de crescimento com temperatura ajustada para 25°C, onde as placas foram cobertas por pano crepe e sob luz fluorescente contínua por 48 horas. Nestas condições, o meio de cultura desidratou rapidamente e o estresse possibilitou a esporulação abundante dos micélios.

**c) Inoculação do patógeno nas diferenciadoras** - Após a esporulação, cada placa contendo o isolado monospórico foi lavada com 20 ml de água destilada estéril e foi realizada raspagem com o auxílio de um pincel de cerdas macias para desprendimento dos micélios. Após a lavagem, a solução foi filtrada em gaze e os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. Para inoculação do patógeno, a concentração da solução de esporos foi ajustada para  $3 \times 10^5$  conídios /ml. Foram inoculados 20 ml da solução por bandeja com auxílio de um borrifador manual. A solução foi distribuída da maneira mais homogênea possível entre as oito diferenciadoras de cada bandeja. Imediatamente após a inoculação das diferenciadoras, as bandejas foram colocadas por 24 horas sob condições de câmara úmida com umidade relativa maior que 95%, proporcionada por umidificador em ambiente fechado e com ausência total de luz, dando condições ambientais favoráveis para infecção das plantas. Em seguida, as bandejas foram acomodadas em câmara de crescimento com temperatura de 25°C e 70% de umidade relativa do ar por sete dias com fotoperíodo de 12 horas até a avaliação.

**d) Avaliação das reações** - A identificação das raças de *M. grisea* se deu através de análise visual das classes de reações de cada uma das oito diferenciadoras da SID. A avaliação foi realizada sete dias após a inoculação, baseada na escala de notas de seis graus 0 a 9 (0, 1, 3, 5, 7 e 9) proposta por Leung et al. (1988) modificada, sendo adicionado a nota 4 de uma escala padronizada de 1 a 9 (STANDARD..., 1980), (0, 1, 3, "4", 5, 7 e 9) conforme também sugerido por Prabhu e Filippi (2006). A escala de sete graus utilizada permite diferenciar com clareza os tipos de infecção, sendo:

- 0 - Ausência total de lesões;
- 1 - Pequenas lesões cabeça de alfinete de cor marrom e que não se desenvolvem;
- 3 - Lesões pequenas, na sua maioria pouco alongadas com pouco ou nenhuma esporulação;
- 4 - Poucas lesões típicas e esporulativas, com centro cinza caracterizada por algumas lesões abertas;
- 5 - Muitas lesões típicas e altamente esporulativas que podem estar isoladas ou coalescentes;
- 7 - Lesões coalescentes e com mais de 50% da área foliar afetada;
- 9 - Muitas lesões que coalescem, causando murcha e morte das folhas.

A reação da planta foi considerada como resistente (R) quando recebeu nota de severidade menor ou igual a 3 e suscetível (S) quando a nota foi igual ou superior a 4. Durante a avaliação das reações, as bandejas que apresentaram um total de plantas com infecção menor que 30% foram descartadas e o isolado inoculado colocado novamente em outra bandeja com a SID.

Após a avaliação das reações nas diferenciadoras, a identificação das raças de *M. grisea* foi baseada na chave de identificação de acordo com a tabela de raças (Tabela 3) proposta Ling e Ou (1969). Considerando-se que existe um total de 256 combinações possíveis de raças e que há dificuldades para leitura e caracterização, foi desenvolvido no Microsoft Office 2003 um programa para identificação de raças de *M. grisea* visando facilitar a identificação das raças obtidas.

**Tabela 3.** Chave para identificação de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* em arroz.

Grupo e raça	Reação diferencial ABCDEFGH	Grupo e raça	Reação diferencial ABCDEFGH	Grupo e raça	Reação diferencial ABCDEFGH
IA-1	SSSSSSSS	IA-92	SRSRRSRR	IB-53	RSRRRSRS
IA-2	SSSSSSSR	IA-93	SRSRRRSS	IB-54	RSRRRSRR
IA-3	SSSSSSRS	IA-94	SRSRRRSR	IB-55	RSRRRSRR
IA-4	SSSSSSRR	IA-95	SRSRRRRS	IB-56	RSRRRSRR
IA-5	SSSSSRSS	IA-96	SRSRRRRR	IB-57	RSRRRSRS
IA-6	SSSSRSRR	IA-97	SRRSSSSS	IB-58	RSRRRSRR
IA-7	SSSSRRRS	IA-98	SRRSSSSR	IB-59	RSRRRSRS
IA-8	SSSSRRRR	IA-99	SRRSSSRS	IB-60	RSRRRSRR
IA-9	SSSSRSSS	IA-100	SRRSSSRR	IB-61	RSRRRSRS
IA-10	SSSSRRSS	IA-101	SRRSSRSS	IB-62	RSRRRSRR
IA-11	SSSSRSRS	IA-102	SRRSSRSR	IB-63	RSRRRSRR
IA-12	SSSSRSRR	IA-103	SRRSSRRS	IB-64	RSRRRRRR
IA-13	SSSSRRSS	IA-104	SRRSSRRR		
IA-14	SSSSRRSR	IA-105	SRRSSRSS		
IA-15	SSSSRRRS	IA-106	SRRSSRSR	IC-1	RRSSSSSS
IA-16	SSSSRRRR	IA-107	SRRSSRSR	IC-2	RRSSSSSR
IA-17	SSSRSSSS	IA-108	SRRSSRRR	IC-3	RRSSSSRS
IA-18	SSSRSSSR	IA-109	SRRSSRSS	IC-4	RRSSSSRR
IA-19	SSSRSSRS	IA-110	SRRSSRSR	IC-5	RRSSSSRS
IA-20	SSSRSSRR	IA-111	SRRSSRRS	IC-6	RRSSSSRR
IA-21	SSSRSSRS	IA-112	SRRSSRRR	IC-7	RRSSSSRS
IA-22	SSSRSSRR	IA-113	SRRSSSSS	IC-8	RRSSSSRR
IA-23	SSSRSSRS	IA-114	SRRSSSSR	IC-9	RRSSSSRS
IA-24	SSSRSSRR	IA-115	SRRSSRSR	IC-10	RRSSSSRR
IA-25	SSSRSSRS	IA-116	SRRSSRRR	IC-11	RRSSSSRS
IA-26	SSSRSSRR	IA-117	SRRSSRSS	IC-12	RRSSSSRR
IA-27	SSSRSSRS	IA-118	SRRSSRSR	IC-13	RRSSSSRS
IA-28	SSSRSSRR	IA-119	SRRSSRRS	IC-14	RRSSSSRR
IA-29	SSSRSSRS	IA-120	SRRSSRRR	IC-15	RRSSSSRS
IA-30	SSSRSSRR	IA-121	SRRSSRSS	IC-16	RRSSSSRR
IA-31	SSSRSSRS	IA-122	SRRSSRRR	IC-17	RRSSSSRS
IA-32	SSSRSSRR	IA-123	SRRSSRSS	IC-18	RRSSSSRR
IA-33	SSSRSSRS	IA-124	SRRSSRRR	IC-19	RRSSSSRS
IA-34	SSSRSSRR	IA-125	SRRSSRSS	IC-20	RRSSSSRR
IA-35	SSSRSSRS	IA-126	SRRSSRRR	IC-21	RRSSSSRS
IA-36	SSSRSSRR	IA-127	SRRSSRRS	IC-22	RRSSSSRR
IA-37	SSSRSSRS	IA-128	SRRSSRRR	IC-23	RRSSSSRS
IA-38	SSSRSSRR			IC-24	RRSSSSRR
IA-39	SSSRSSRS			IC-25	RRSSSSRR
IA-40	SSSRSSRR	IB-1	RSSSSSSS	IC-26	RRSSSSRS
IA-41	SSSRSSRS	IB-2	RSSSSSSR	IC-27	RRSSSSRR
IA-42	SSSRSSRR	IB-3	RSSSSRSR	IC-28	RRSSSSRS
IA-43	SSSRSSRS	IB-4	RSSSSSSR	IC-29	RRSSSSRR
IA-44	SSSRSSRR	IB-5	RSSSSRSR	IC-30	RRSSSSRR
IA-45	SSSRSSRS	IB-6	RSSSSRRR	IC-31	RRSSSSRS
IA-46	SSSRSSRR	IB-7	RSSSSRSR	IC-32	RRSSSSRR
IA-47	SSSRSSRS	IB-8	RSSSSRRR	ID-1	RRSSSSRS
IA-48	SSSRSSRR	IB-9	RSSSSRSR	ID-2	RRSSSSRR
IA-49	SSSRSSRS	IB-10	RSSSSRRR	ID-3	RRSSSSRS
IA-50	SSSRSSRR	IB-11	RSSSSRSR	ID-4	RRSSSSRR
IA-51	SSSRSSRS	IB-12	RSSSSRRR	ID-5	RRSSSSRS
IA-52	SSSRSSRR	IB-13	RSSSSRSR	ID-6	RRSSSSRR
IA-53	SSSRSSRS	IB-14	RSSSSRRR	ID-7	RRSSSSRS
IA-54	SSSRSSRR	IB-15	RSSSSRSR	ID-8	RRSSSSRR
IA-55	SSSRSSRS	IB-16	RSSSSRRR	ID-9	RRSSSSRS
IA-56	SSSRSSRR	IB-17	RSSSSRSR	ID-10	RRSSSSRR
IA-57	SSSRSSRS	IB-18	RSSSSRRR	ID-11	RRSSSSRS
IA-58	SSSRSSRR	IB-19	RSSSSRSR	ID-12	RRSSSSRR
IA-59	SSSRSSRS	IB-20	RSSSSRRR	ID-13	RRSSSSRS
IA-60	SSSRSSRR	IB-21	RSSSSRSR	ID-14	RRSSSSRR
IA-61	SSSRSSRS	IB-22	RSSSSRRR	ID-15	RRSSSSRS
IA-62	SSSRSSRR	IB-23	RSSSSRSR	ID-16	RRSSSSRR
IA-63	SSSRSSRS	IB-24	RSSSSRRR		
IA-64	SSSRSSRR	IB-25	RSSSSRSR		
IA-65	SSSRSSRS	IB-26	RSSSSRRR	IE-1	RRSSSSRS
IA-66	SSSRSSRR	IB-27	RSSSSRSR	IE-2	RRSSSSRR
IA-67	SSSRSSRS	IB-28	RSSSSRRR	IE-3	RRSSSSRS
IA-68	SSSRSSRR	IB-29	RSSSSRSR	IE-4	RRSSSSRR
IA-69	SSSRSSRS	IB-30	RSSSSRRR	IE-5	RRSSSSRS
IA-70	SSSRSSRR	IB-31	RSSSSRSR	IE-6	RRSSSSRR
IA-71	SSSRSSRS	IB-32	RSSSSRRR	IE-7	RRSSSSRS
IA-72	SSSRSSRR	IB-33	RSRSSSSS	IE-8	RRSSSSRR
IA-73	SSSRSSRS	IB-34	RSRSSSSR		
IA-74	SSSRSSRR	IB-35	RSRSSSSR		
IA-75	SSSRSSRS	IB-36	RSRSSSSR	IF-1	RRSSSSRS
IA-76	SSSRSSRR	IB-37	RSRSSSSR	IF-2	RRSSSSRR
IA-77	SSSRSSRS	IB-38	RSRSSSSR	IF-3	RRSSSSRS
IA-78	SSSRSSRR	IB-39	RSRSSSSR	IF-4	RRSSSSRR
IA-79	SSSRSSRS	IB-40	RSRSSSSR		
IA-80	SSSRSSRR	IB-41	RSRSSSSS		
IA-81	SSSRSSRS	IB-42	RSRSSSSR	IG-1	RRSSSSRS
IA-82	SSSRSSRR	IB-43	RSRSSSSR	IG-2	RRSSSSRR
IA-83	SSSRSSRS	IB-44	RSRSSSSR		
IA-84	SSSRSSRR	IB-45	RSRSSSSR		
IA-85	SSSRSSRS	IB-46	RSRSSSSR	IH-1	RRSSSSRS
IA-86	SSSRSSRR	IB-47	RSRSSSSR		
IA-87	SSSRSSRS	IB-48	RSRSSSSR		
IA-88	SSSRSSRR	IB-49	RSRSSSSS	II-1	RRSSSSRR
IA-89	SSSRSSRS	IB-50	RSRSSSSR		
IA-90	SSSRSSRR	IB-51	RSRSSSSR		
IA-91	SSSRSSRS	IB-52	RSRSSSSR		

A - Raminad Str-3; B - Zenith; C - NP-125; D - Usen; E - Dular; F - Kanto 51; G - Sha-tiao-tsau; H - Caloro.  
Fonte: Ling e Ou (1969).

## Resultados e Discussão

Foram constatadas 61 raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* nas regiões avaliadas. O estudo para determinação destas raças foi realizado em um total de 534 isolados monospóricos. Foram identificadas as seguintes raças: IA-1, IA-3, IA-9, IA-10, IA-13, IA-25, IA-33, IA-34, IA-35, IA-37, IA-41, IA-45, IA-57, IA-65, IA-73, IA-77, IA-81, IA-97, IA-101, IA-105, IA-109, IA-121, IB-1, IB-3, IB-5, IB-9, IB-17, IB-21, IB-26, IB-33, IB-34, IB-41, IB-49, IB-57, IB-58, IC-1, IC-2, IC-4, IC-9, IC-13, IC-17, ID-1, ID-2, ID-3, ID-4, ID-5, ID-6, ID-7, ID-9, ID-10, ID-13, ID-14, ID-15, IE-1, IE-2, IE-3, IF-1, IF-3, IF-4, IG-E e II-1. O grande número de raças encontrado na região vem confirmar a diversidade patogênica e a alta variabilidade do patógeno causador da doença.

Segundo Correa-Victoria e Zeigler (1993) o fungo é composto de patótipos ou raças fisiológicas, com características de virulência distintas. Os resultados obtidos concordam com Garrido (2001) que após analisar nove populações de *M. grisea*, verificaram alta variabilidade genética em isolados coletados no Estado do Tocantins. Os autores comentaram que estas populações possuem número de alelos médio em 13 locos STR que variam de 3,4 a 9,2 alelos por loco. Eles comentaram que em outras regiões do Brasil, como no Sul, esta variabilidade é muito menor como relatado por Brondani (2000). A alta variabilidade e diversidade do patógeno, aliado ao ambiente favorável ao desenvolvimento da doença nas condições do Estado do Tocantins, fazem crer que provavelmente seja uma das razões para a quebra da resistência das variedades em um curto período de tempo, geralmente com menos de três anos, fato este também corroborado por Santos et al. (2005).

Pode-se verificar que as raças identificadas estão distribuídas em oito dos nove grupos de raças possíveis para identificação através das diferenciadoras internacionais (Tabela 4). Foram constatados os grupos IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG e II, não sendo constatado o grupo IH em nenhum dos isolados avaliados. Trabalhos realizados em diversas regiões do país relatam a ocorrência de todos os nove grupos de raças de *M. grisea* no Brasil, tanto em cultivares de terras altas quanto em sistemas irrigados (RIBEIRO, 1980; URASHIMA; ISOGAWA, 1990; MALAVOLTA; SOUZA, 1992; CASSETARI NETO, 1996; FILIPPI; PRABHU, 1996; MIURA et al., 1998; CORNÉLIO, 2001; PRABHU; FILIPPI, 2001, 2006; PRABHU et al., 2002; MACIEL et al., 2004). Porém, não há registros da ocorrência de todos os grupos de raças em uma única região.

**Tabela 4.** Raças fisiológicas de *M. grisea* identificadas na Região Central do Brasil em ordem de prevalência, nas safras 2006/2007 e 2007/2008.

Prevalência	Raças	%	Prevalência	Raças	%	Prevalência	Raças	%
1	IA-1	20,60	21	IB-17	0,75	43	IA-81	0,19
2	IC-1	11,80	22	IF-4	0,75	44	IA-101	0,19
3	ID-1	10,86	23	IA-77	0,56	45	IA-121	0,19
4	IA-65	6,18	24	IB-57	0,56	46	IB-3	0,19
5	ID-9	5,43	25	ID-14	0,56	47	IB-5	0,19
6	IB-1	4,49	26	IA-3	0,37	48	IB-21	0,19
7	IA-33	4,31	27	IB-9	0,37	49	IB-26	0,19
8	IA-41	3,75	28	IB-49	0,37	50	IB-34	0,19
9	IA-9	3,18	29	IC-13	0,37	51	IB-58	0,19
10	IB-41	3,00	30	IC-17	0,37	52	IC-2	0,19
	<b>Total</b>	<b>73,60</b>	31	ID-4	0,37	53	IC-4	0,19
11	IB-33	2,62	32	ID-5	0,37	54	ID-2	0,19
12	IA-109	1,87	33	ID-15	0,37	55	ID-3	0,19
13	IA-97	1,69	34	IE-2	0,37	56	ID-6	0,19
14	IE-1	1,69	35	II-1	0,37	57	ID-7	0,19
15	IF-1	1,50	36	IA-10	0,19	58	ID-10	0,19
16	IA-73	1,31	37	IA-25	0,19	59	IE-3	0,19
17	ID-13	1,31	38	IA-34	0,19	60	IF-3	0,19
18	IC-9	1,12	39	IA-35	0,19	61	IG-1	0,19
	<b>Total</b>	<b>13,11</b>	40	IA-37	0,19		<b>Total</b>	<b>13,29</b>
19	IA-13	0,75	41	IA-45	0,19			
20	IA-105	0,75	42	IA-57	0,19		<b>Total Geral</b>	<b>100%</b>

Dentre os 534 monospóricos avaliados prevaleceram os grupos IA, IB, ID e IC que apresentaram respectivamente os maiores números de raças identificadas 22, 13, 12 e 06, o que corresponde a 36,1%, 21,3%, 19,7% e 9,8% das 61 raças encontradas. Foram encontradas apenas três raças pertencentes aos grupos IE e IF e uma raça pertencente aos grupos IG e II que correspondem, respectivamente, a 4,9% e 1,6% do total de raças encontradas.

As raças em ordem de prevalência identificadas nos Estados de Goiás, Tocantins e Pará estão dispostas na Tabela 5. Verifica-se que as dez mais prevalentes são compostas pelas raças IA-1, IC-1, ID-1, IA-65, ID-9, IB-1, IA-33, IA-41, IA-9 e IB-41 que apresentam respectivamente 20,6%, 11,8%, 10,9%, 6,2%, 5,4%, 4,5%, 4,3%, 3,7%, 3,2% e 3,0% do total de raças identificadas somando 73,6%. Os 26,4% restantes estão distribuídos em 51 raças com menor ocorrência nas regiões avaliadas. Dentre estas, oito delas ainda apresentam um número razoável de ocorrência (13,11%) onde as raças IB-33 representam 2,62%, IA-109 (1,87%), IA-97 e IE-1 (1,69%), IF-1 (1,5%), IA-73 e ID-13 1,31% e a IC-9 apresentando 1,12%. As demais raças apresentam ocorrência menor que 1%, totalizando as 43 raças 13,29%.

**Tabela 5.** Grupos da série internacional de diferenciadoras (SID), raças de *M. grisea* e número de raças identificadas por grupo e percentagem do total de raças dentro de cada grupo. Safras 2006/2007 e 2007/2008.

Grupos da SID								
IA	IB	IC	ID	IE	IF	IG	IH	II
IA-1	IB-1	IC-1	ID-1	IE-1	IF-1	IG-1	-	II-1
IA-3	IB-3	IC-2	ID-2	IE-2	IF-3	-	-	-
IA-9	IB-5	IC-4	ID-3	IE-3	IF-4	-	-	-
IA-10	IB-9	IC-9	ID-4	-	-	-	-	-
IA-13	IB-17	IC-13	ID-5	-	-	-	-	-
IA-25	IB-21	IC-17	ID-6	-	-	-	-	-
IA-33	IB-26	-	ID-7	-	-	-	-	-
IA-34	IB-33	-	ID-9	-	-	-	-	-
IA-35	IB-34	-	ID-10	-	-	-	-	-
IA-37	IB-41	-	ID-13	-	-	-	-	-
IA-41	IB-49	-	ID-14	-	-	-	-	-
IA-45	IB-57	-	ID-15	-	-	-	-	-
IA-57	IB-58	-	-	-	-	-	-	-
IA-65	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-73	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-77	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-81	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-97	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-101	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-105	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-109	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-121	-	-	-	-	-	-	-	-
22 (128)*	13 (64)*	6 (32)*	12 (16)*	3 (8)*	3 (4)*	1 (2)*	0 (1)*	1 (1)*
36,1%	21,3%	9,8%	19,7%	4,9%	4,9%	1,6%	0,0%	1,6%

\*Os valores entre parênteses são os possíveis números de raças por grupo.

De acordo com os dados obtidos, pode-se verificar o alto grau de variabilidade de *M. grisea* nas regiões avaliadas, bem como diferenças na prevalência das raças. Enquanto em dois anos de coletas (safras 2006/2007 e 2007/2008) foram encontradas 61 raças, Cornelio et al. (2003) relatam em seu trabalho que em outras regiões como no Estado de São Paulo até 1979, Amaral et al. (1979) identificaram 16 raças de *M. grisea*, das quais foram predominantes a IE-8 e II-1. Em outro estudo realizado também em São Paulo, no período de 1981 a 1990, foram identificadas 20 raças do fungo, entre elas apenas duas raças, a IA-65 e II-1, haviam sido relatadas anteriormente (MALAVOLTA; SOUZA, 1992). Essas novas raças, somadas, totalizam 32 raças no estado, no período de 1966 a 1990. No Rio Grande do Sul, Ribeiro e Terres (1987) encontraram grande variabilidade, com prevalência das raças dos grupos IG e IA. Comparando esses resultados com os obtidos no período de 1969 a 1978 por Ribeiro (1980), verificou-se uma diminuição na frequência das raças do grupo IB e um aumento do grupo IA. Esses pesquisadores identificaram no período de 1979 a

1985, 24 novas raças que, somadas às 36 já determinadas anteriormente por Ribeiro (1980), totalizaram 60 raças no período de 1969 a 1985. Em outros estados brasileiros, como Mato Grosso, Cassetari Neto (1996), identificou a presença das raças do grupo IB (IB-41, IB-61, IB-62). Em Santa Catarina, Miura et al. (1998) verificaram a prevalência de raças do grupo G e a ocorrência de raças do grupo D, C, E e I. Diversos trabalhos foram desenvolvidos no Estado de Goiás. Durante o período de 1986 a 1988 a frequência das raças nas cultivares melhoradas de arroz de terras altas foi determinada por Prabhu e Filippi (1989), constatando-se a presença de 27 raças fisiológicas. As raças do grupo IB, principalmente IB-1, IB-9, IB-13 e IB-41, foram as predominantes. Em outro trabalho, Prabhu et al. (1990) verificaram em 12 isolados de *M. grisea* a presença de cinco raças, sendo IB-9 a mais prevalente e as demais IB-1, IB-41, IC-10 e IA-9 ocorreram com menos frequência. Filippi et al. (1999), estudando a compatibilidade diferencial de isolados de *M. grisea* em algumas cultivares de arroz irrigado, identificaram sete raças entre os 24 isolados testados, sendo predominante a raça IB-9, que foi detectada em oito das onze cultivares. Em estudos mais recentes Filippi e Prabhu (2001), identificaram, em arroz de terras altas, 16 raças de *M. grisea* sendo que, as predominantes foram a IB-9 e IB-41. Os autores verificaram, ainda, que os isolados da raça IB-9 exibiram padrão similar de virulência. Prabhu e Filippi (2001), avaliaram a diversidade de raças de 85 isolados de *M. grisea* coletados durante um período de cinco anos em 14 cultivares de arroz de terras altas e identificaram 11 patótipos, e desses, os predominantes foram IB-9, IB-1 e IB-41. Cornelio et al. (2003), em Minas Gerais, coletaram amostras de folhas de arroz com sintomas da brusone em 15 municípios representativos do estado. Foram obtidos 138 isolados, destes, foram identificadas 14 raças (IA-1, IA-9, IA-10, IA-13, IA-65, IA-73, IB-1, IB-9, IB-15, IB-41, IB-64, IC-9, IC-14, IC-16). A raça predominante foi a IA-9 em 41,18% dos isolados, seguida pela IA-1 em 18,37% e IB-9 em 16,92%.

A diversidade da população de *M. grisea* também é muito variável em outros países. Segundo Prabhu e Filippi (2006), em seis estados do Sul dos Estados Unidos, somente 20 raças internacionais de *M. grisea* foram identificadas desde 1950. Xia et al. (2000) em Arkansas, de um total de 470 isolados coletados em 1992, em 18 campos comerciais de arroz, em nove municípios, foram selecionados 60 para identificação de raças, sendo identificadas apenas três raças (IB-49, IC-17 e IG-1). No estudo, foram prevalentes as raças IB-49 e IC-17. Mekwatanakarn et al. (2000) trabalhando com um total de 527 isolados produzidos de materiais coletados em cinco locais, nos anos de 1993 e 1994, em lavouras da Tailândia identificaram 175 patótipos, sendo que destes apenas 21 representaram 53% da população do patógeno e 160 foram considerados raros. Segundo os mesmos autores, a raridade de muitos patótipos indica que muitos outros podem não ter sido identificados. Os autores estimam que no local possam existir aproximadamente 473 patótipos. Noda et al. (1998) ao analisar 129 isolados monospóricos de *M. grisea* no Vietnã identificou 12 grupos de raças patogênicas com base na série diferencial japonesa, apresentando duas prevalentes, sendo constatadas em dez províncias da região. Dados mais antigos, datados de 1980 relatam registros de 18 raças no Japão, 27 raças em Taiwan, 31 na Índia e 250 na Filipinas (Ou, 1980). Chen et al. (2001) avaliaram 792 isolados monospóricos de *M. grisea* coletados em 13 regiões produtoras de arroz na região central e sul da China, sendo identificados 48 patótipos para as seis linhas quase isogênicas e 82 patótipos para a série japonesa.

No presente trabalho, foram verificadas em Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão, Dueré, Luís Alves e Paragominas 38, 42, 11, 11 e 4 raças fisiológicas, respectivamente. Das raças encontradas, a maior quantidade foi verificada nos municípios de Lagoa da Confusão e em Formoso do Araguaia (Tabela 6). Estas regiões apresentam maior área plantada, além de se cultivar arroz irrigado há mais de 25 anos, como é o caso do Projeto Formoso que se localiza no município de Formoso do Araguaia - TO. Outro fato que pode explicar o maior número de raças nas duas regiões é o maior número de cultivares plantadas nos dois locais. Estes municípios apresentaram todas as dez raças prevalentes e também tiveram maior frequência de ocorrência das raças. Esses resultados poderão explicar a rápida quebra da resistência de cultivares de arroz nessas regiões. Entre os motivos para se encontrar a grande diversidade de raças, também pode ser atribuído ao fato de que os produtores trazem diversas variedades cujas sementes foram obtidas em outras regiões com prevalência de diferentes raças, aonde, provavelmente, o patógeno vem nas sementes. Verifica-se também nestes dois locais, maior ocorrência de raças raras (pouco frequentes na região).

**Tabela 6.** Ocorrência de raças fisiológicas de *M. grisea* em municípios do Estado do Tocantins (Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré), Goiás (Luís Alves) e Pará (Paragominas), nas safras 2006/2007 e 2007/2008.

Raça	Formoso	Lagoa da Confusão	Dueré	LuísAlves	Paragominas
IA-1	39	41	-	1	29
IC-1	13	36	11	1	2
ID-1	20	29	4	5	-
IA-65	24	7	-	-	2
ID-9	5	20	3	1	-
IB-1	3	14	4	3	-
IA-33	12	9	1	1	-
IA-41	9	9	-	1	1
IA-9	12	5	-	-	-
IB-41	10	2	-	4	-
IB-33	10	4	-	-	-
IA-109	6	4	-	-	-
IA-97	7	2	-	-	-
IE-1	5	3	1	-	-
IF-1	-	7	1	-	-
IA-73	4	3	-	-	-
ID-13	1	4	-	2	-
IC-9	2	4	-	-	-
IA-13	2	2	-	-	-
IA-105	1	3	-	-	-
IB-17	3	-	-	1	-
IF-4	-	4	-	-	-
IA-77	3	-	-	-	-
IB-57	1	2	-	-	-
ID-14	1	1	1	-	-
IA-3	2	-	-	-	-
IB-9	2	-	-	-	-
IB-49	1	-	-	1	-
IC-13	-	2	-	-	-
IC-17	-	2	-	-	-
ID-4	-	-	2	-	-
ID-5	1	1	-	-	-
ID-15	-	2	-	-	-
IE-2	-	-	2	-	-
II-1	-	2	-	-	-
IA-10	1	-	-	-	-
IA-25	-	1	-	-	-
IA-34	1	-	-	-	-
IA-35	-	1	-	-	-
IA-37	-	1	-	-	-
IA-45	1	-	-	-	-
IA-57	1	-	-	-	-
IA-81	-	1	-	-	-
IA-101	-	1	-	-	-
IA-121	1	-	-	-	-
IB-3	-	1	-	-	-
IB-5	1	-	-	-	-
IB-21	-	1	-	-	-
IB-26	-	1	-	-	-
IB-34	-	1	-	-	-
IB-58	1	-	-	-	-
IC-2	-	-	1	-	-
IC-4	-	1	-	-	-
ID-2	-	1	-	-	-
ID-3	1	-	-	-	-
ID-6	-	1	-	-	-
ID-7	1	-	-	-	-
ID-10	1	-	-	-	-
IE-3	1	-	-	-	-
IF-3	-	1	-	-	-
IG-1	-	1	-	-	-
<b>Total</b>	<b>210</b>	<b>238</b>	<b>31</b>	<b>21</b>	<b>34</b>

Ao analisar a prevalência das raças em cada um dos locais, pode se verificar uma mudança quanto à composição das dez raças prevalentes compostas pelos patótipos IA-1, IC-1, ID-1, IA-65, ID-9, IB-1, IA-33, IA-41, IA-9 e IB-41. Em Formoso do Araguaia foram prevalentes as raças IA-1, IA-65, ID-1, IC-1, IA-33, IA-9, IB-41, IB-33, IA-41 e IA-97, no município de Lagoa da Confusão as raças mantiveram basicamente a mesma composição, ficando





As diferenças quanto ao número de raças em cada uma das cultivares, pode estar diretamente relacionada com a resistência e suscetibilidade de cada material. Outro fator que pode ter influenciado no número de raças encontrado é a diferença na quantidade de isolados entre os genótipos. Segundo Mekwatanakarn et al. (2000), através de uma maior amostragem, torna-se possível a verificação de raças mais raras em um determinado local. Para as raças IA-1 encontradas nas variedades comerciais, somente em Paragominas - PA, houve grande prevalência desta raça, ao contrário do ocorrido no ensaio de armadilha de brusone. Neste local, a raça IA-1 representou 85% dos isolados analisados que foram originários da cultivar BRS Primavera. Cornelio et al. (2003), verificaram que no Estado de Minas Gerais também na cultivar BRS Primavera houve grande incidência desta raça, representando 41,7% dos isolados encontrados, sendo observada, também, a presença da raça IA-65 na referida cultivar.

## Conclusões

Existe alta variabilidade de raças fisiológicas de *M. grisea* em arroz cultivado nos Estados de Goiás, Tocantins e Pará. Ocorreu diferença na frequência de aparecimento das raças nas regiões estudadas.

Ocorreu maior número de raças identificadas no ensaio armadilha de brusone do que nas cultivares comerciais.

## 8.2) Variabilidade genética de isolados monospóricos de *Magnaphorte grisea* (Barr.) coletados em regiões tropicais brasileiras<sup>2</sup>

### Introdução

A brusone do arroz, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* Sacc [teleomorfo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr], é a principal doença desta cultura, ocorrendo em quase todas as regiões produtoras de arroz do mundo (OU, 1985). Sob condições ótimas, o patógeno pode causar epidemias severas e, conseqüentemente, perdas econômicas significativas. A melhor forma de controle da doença é através do uso de cultivares resistentes, pela introdução de genes de resistência em linhagens avançadas dos programas de melhoramento genético.

A dinâmica de mudanças na composição das raças do patógeno em populações naturais tem frequentemente resultado na redução do tempo de utilização das cultivares melhoradas para resistência à brusone do arroz (GARRIDO, 2001). O melhoramento genético das cultivares de arroz tem por objetivo obter resistência durável através do uso de fontes de resistência diversas (AHN, 1994). Para isto, é importante o conhecimento da composição da estrutura de populações do patógeno, pois, sem tal informação, é limitada a compreensão da diversidade genética do patógeno e dificultado o monitoramento de novas raças de *M. grisea*. No estado do Tocantins, na região Norte do Brasil, a quebra de resistência à brusone tem ocorrido em dois a três anos após o lançamento de uma nova cultivar (SILVA, 2008; RANGEL, 2009). A diversidade racial de isolados de *M. grisea* nesta região é tão elevada que, mesmo variedades consideradas como fonte de resistência durável ao patógeno, como Oryzica Llanos 5, são suscetíveis a número considerável de isolados quando inoculadas com isolados da região (RAMOS, 2009). Por outro lado, no Estado do Pará, onde o clima e a vegetação são tipicamente Amazônicos, não há relatos de perdas significativas de produtividade devidas ao ataque de brusone.

Pouco se conhece sobre a estrutura de populações de *M. grisea* nas áreas de cultivo de arroz no Brasil. Tal estrutura reflete a história evolucionária do patógeno em regiões produtoras. A estrutura e a dinâmica de populações são determinadas por forças evolutivas como mutação, seleção, fluxo gênico, deriva genética e recombinação genética (MCDONALD, 1997; ZEIGLER, 1998).

Marcadores microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) são encontrados abundantemente no genoma de uma ampla diversidade de espécies de eucariotos e procariotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). São altamente informativos e proporcionam um meio acurado de detectar a variação genética em organismos onde o DNA possa ser extraído (POWELL et al., 1996). Estes marcadores têm sido empregados com sucesso para "fingerprinting" de DNA em estudos de genética de populações, na genotipagem de

<sup>2</sup> Parte da Dissertação apresentada pelo estudante LEANDRO NOGUEIRA RAMOS ao Departamento de Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

indivíduos para discriminação de genótipos (CREGAN et al., 1994; RUSSEL et al., 1997; BRONDANI et al., 2000), caracterização e conservação de recursos genéticos (HOSHINO et al., 2002) e construção de mapas genéticos (CHEN et al., 1997; BRONDANI et al., 2002; ZHENG et al., 2008). Além de outras aplicações como uso na genética humana em estudos forenses (HUMMEL; SCHULTES, 2000) e testes de paternidade.

O objetivo do presente trabalho foi o estudo da diversidade genética e estrutura de populações de isolados de *M. grisea* coletados em lavouras comerciais das principais regiões produtoras do Centro-Norte do Brasil.

## Materiais e Métodos

### Isolados de *M. grisea*

Os estudos de variabilidade e estrutura genética de populações de isolados de *M. grisea* foram conduzidos no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN, Brasília, DF), entre os meses de setembro e dezembro do ano de 2008. Os isolados foram coletados em cinco municípios de três estados (Goiás, Tocantins e Pará).

Inicialmente foram avaliados 140 isolados monospóricos de *M. grisea* quanto à capacidade de cultivo in vitro e qualidade de DNA para análise molecular (Tabela 8). A coleta, cultivo e armazenamento dos isolados foi realizada conforme metodologia descrita por Ramos (2009).

**Tabela 8.** Identificação e origem dos isolados monospóricos de *Piricularia grisea* coletados nos Estados do Tocantins (municípios de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré), Goiás (Luís Alves) e Pará (Paragominas). UnB, Brasília, 2009.

TO Formoso	TO Lagoa da Confusão	TO Dueré	GO LuísAlves	PA Paragominas
1	*4	55	39	*700
*2	5	154	*99	705
*3	6	214	107	710
22	7	365	127	715
24	8	*430	148	720
*34	9	*434	152	725
38	11	437	164	*730
57	12	439	168	*735
60	*14	446	173	*740
92	15	458	*186	745
161	19	*466	188	750
218	*20	*467	*190	760
319	23	468	586	770
380	46	477	587	775
389	72	480	628	
391	*73	485	629	
397	93	494	630	
401	209	516	*631	
409	251	*527	632	
411	302	532	633	
412	*359	*536	*634	
413	374	541	635	
416	376	546	636	
417	393	553	642	
418	403	574	*644	
431	422			
436	445			
530	453			
564	456			
584	459			
588	462			
611	487			
616	511			
617	540			
618	545			
800	560			
*810	566			
	575			
	*805			
Total	37	25	25	14

### Produção de micélio para extração de DNA

Os 140 isolados de *M. grisea* foram cultivados em meio de cultura BDA (200 g de batata, 18 g de dextrose, 18 g de Ágar e um litro de água destilada), autoclavado a 180 °C por 20 min. Posteriormente, foram incubados em câmara de germinação tipo B.O.D durante 15 dias em temperatura de 25 °C, sem presença de luz e umidade relativa entre 50% e 70%.

Em seguida, o micélio foi transferido para 50 ml de meio de cultura líquido (5 g de extrato de levedura, 2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g de D-glucose, 3 g de KNO<sub>3</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub> e água destilada q.s.q 1 L) (CHEN et al., 2006), contido em Erlenmeyers de 250 ml, incubados durante sete dias, em temperatura ambiente e agitação de 150 rpm. Após esse período, efetuou-se a filtragem do meio de cultura em papel filtro, lavagem do micélio com TE gelado e armazenamento do micélio no gelo em tubos Falcon de 15 ml identificados de acordo com a amostra. O micélio foi então armazenado a -20 °C até a sua utilização.

O micélio fúngico foi macerado em cadinhos de porcelana contendo nitrogênio líquido até formar um pó de granulometria extremamente fina. O DNA foi extraído através de um método rápido de extração com CTAB, conforme descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). A concentração do DNA foi estimada em eletroforese de gel de agarose 1% utilizando-se DNA  $\lambda$  (Invitrogen) como padrão para quantificação. O DNA foi diluído em tampão TE para uma concentração final de 2 ng/ $\mu$ L.

### Genotipagem de isolados de *M. grisea* com marcadores microssatélites

Para análise da estrutura genética das populações de *M. grisea*, coletadas nos Estados de Tocantins, Goiás e Pará, foi inicialmente testado um total de 34 marcadores microssatélites descritos na literatura (GARRIDO, 2001; KAYE et al., 2003) (Tabela 9). A análise do produto de PCR de cada um dos marcadores em 140 isolados monospóricos foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio. Estes dados foram utilizados para selecionar os marcadores mais informativos, bem como para avaliar os isolados com DNA em quantidade e qualidade suficientes para a análise. Foram selecionados apenas os isolados que possuíam 80% de alelos identificados com o conjunto de marcadores testados. De maneira análoga, foram considerados para análise apenas os marcadores que possuíam 80% ou mais de genótipos no conjunto de isolados testados. A bateria de isolados e marcadores microssatélites em conformidade com estes parâmetros foi empregada no estudo de diversidade genética e estrutura populacional de *M. grisea*.

Os ensaios seguintes foram realizados empregando-se painéis multiplex (variando entre 2 ou 3 locos por painel) de marcadores na genotipagem de isolados do patógeno. As reações de amplificação foram conduzidas utilizando os seguintes reagentes: DNA 10 ng, Tampão 1 X, DNTP 0,1 mM iniciador (direto + reverso) 0,5 $\mu$ M, Taq polimerase 1 U e água para um volume final de 22  $\mu$ L.

As reações de polimerase em cadeia foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, EUA). O programa de amplificação de produtos de PCR foi o seguinte: 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30", 56°C por 30", 72°C por 1 min, e uma extensão final de 72°C por 5 min. Cada painel incluiu locos com a mesma temperatura de anelamento (ex. 56° C). Os produtos de PCR foram diluídos em uma proporção 1:5, e 1 $\mu$ L do produto diluído foi adicionado a 9 $\mu$ L de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), 0,35 $\mu$ L do padrão de fragmentos de DNA de tamanho conhecido (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001), e 1,05 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O padrão Milli-Q.

A eletroforese capilar para a separação dos fragmentos amplificados em cada loco microssatélite foi realizada em sequenciador automático ABI Prism 3700 (Applied Biosystems). A definição do tamanho dos produtos de PCR em cada loco foi realizada com o emprego dos programas GeneScan Analysis 3.7 e Genotyper 3.7 (Applied Biosystems).

### Análises estatísticas

Os dados de polimorfismo de DNA em regiões hipervariáveis do genoma de isolados de *M. grisea* coletados nos Estados de Tocantins, Goiás e Pará, foram submetidos a análises estatísticas para verificação da variabilidade genética e inferência da estrutura genética.

**Análise de diversidade genética e eficiência de marcadores microssatélites na discriminação de isolados de *M. grisea*** - O nível de polimorfismo entre os isolados monospóricos de *M. grisea* nos locos de marcadores microssatélites selecionados para o estudo foi estimado pelo cálculo do número de diferentes alelos em cada loco, variação alélica observada, diversidade gênica (GD), valores de PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) e Probabilidade de Identidade (PI).

**Estrutura genética de população de *M. grisea*** - A estrutura genética da população de isolados de *M. grisea* foi inicialmente analisada sem a hipótese de um modelo *a priori* de estrutura, utilizando-se o programa Structure versão 2.2 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003). Para isto, as análises foram realizadas utilizando-se um período de *burn-in* de 100,000 iterações, seguido de uma extensão de corrida de 100,000 iterações (Markov Chain Monte Carlo). Dez corridas independentes para cada *K* (o número de grupos ou subpopulações inferidas na estimativa do Structure) foram realizadas, com valores de *K* variando de 1 a 10 subpopulações. O critério de escolha do modelo que detectava o valor mais provável de *K* foi  $\Delta K$ , uma quantificação *ad hoc* relacionada à mudança de segunda ordem do logaritmo de probabilidade dos dados em relação ao número de subpopulações inferidas pelo Structure (EVANNO et al., 2005). Um isolado foi incluído num grupo específico inferido pelo programa se pelo menos 70% do seu valor genômico, como medido por seu coeficiente de inclusão *Q* (*membership coefficient*), variando de 0 a 1, foi estimado como pertencente àquele grupo. Valores médios de  $F_{ST}$  para os grupos inferidos foram calculados com o programa Structure. Estimativas de frequência alélica foram calculadas no programa Power Marker posterior à análise de estrutura genética e definição de  $\Delta K$ , e empregadas para estimar a distância genética entre as subpopulações eventualmente detectadas, utilizando-se o coeficiente de Chord (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967), descrito a partir da fórmula abaixo:

$$D_c = \frac{2}{(r+r)} \int_j \sqrt{\frac{c_{ij}}{c_{ii} + c_{jj}}} \sqrt{\frac{x_{ij}}{x_{ii} + x_{jj}}}$$

**Distância genética par-a-par entre isolados de *M. grisea*** - Após a genotipagem dos isolados de *M. grisea* com marcadores microssatélites, foram estimadas as distâncias genéticas par-a-par entre cada um dos isolados. Os valores de distância genética foram baseados na razão entre a soma das proporções de alelos comuns entre dois isolados para todos os locos (BOWCOCK et al., 1994; GOLDSTEIN; CLARK, 1995), e foram obtidas através do coeficiente *Shared Allele* baseado em frequências alélicas, através do programa Power Marker versão 3.25 (LIU; MUSE, 2005). A matriz diagonal de distâncias genéticas foi submetida à análise de agrupamento pelo método de UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973) e um dendrograma de distâncias genéticas foi construído com o programa NTSYSpc versão 2.10z (ADAMS et al., 2002). Para estabelecer a relação entre eventual estrutura detectada pelo program Structure e as distâncias genéticas entre pares de isolados, o dendrograma foi justaposto a um gráfico de barras desenhado no programa Distruct (ROSENBERG, 2004), alinhando os isolados de *M. grisea* de acordo as distâncias genéticas estimadas par-a-par e coeficiente de inclusão *Q* de cada isolado em subpopulações identificadas pela análise de estrutura genética.

## Resultados e Discussão

### **Análise de diversidade genética e eficiência de marcadores microssatélites na discriminação de isolados de *M. grisea***

A genotipagem dos 12 painéis multiplex composto por 34 marcadores microssatélites indicou ausência de amplificação dos alelos referentes aos locos MGM-1, MGM-21, PG-3 e PG-21. Considerou-se para análise somente os locos marcadores com >80% de genótipos na amostra de isolados monospóricos, bem como os isolados com genótipos em >80% dos locos microssatélites testados, ou seja, foram rejeitados tanto os isolados monospóricos, quanto os locos que apresentaram >20% de dados faltantes. Consideraram-se para análise, portanto, os genótipos de 114 isolados monospóricos de *M. grisea* em 14 locos microssatélites, sendo 11 deles originalmente desenvolvidos por Kaye et al. (2003), e três originalmente desenvolvidos por Garrido (2001) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Identificação dos marcadores microssatélites utilizados no estudo de diversidade e estrutura de população de isolados de *Magnaphorte grisea*. UnB/CENARGEN. Brasília, 2009.

Painel	Loco	Fluorocromo	Cor	Tamanho esperado	Cromossomo	MOTIF
1	ms 81 - 82	6-FAM	azul	190	4	ACT/TGA 12
	PG 35	NED	amarelo	205		CT 17/AT 2
2	*ms 99 - 100	6-FAM	azul	208	5	ACC/TGG 20
	MGM 1	TET	verde			
3	*ms 47 - 48	6-FAM	azul	197	4	TA/AT 15
	PG-21	NED	amarelo	207		CT 21
	*ms 109 - 110	TET	verde	176	1	TC/AC 12
4	*ms 93 e 94	6-FAM	azul	211	2	ATC/TAC 12,5
	PG-15	NED	amarelo	189		GA 46
	*ms 125 - 126	TET	verde	213	7	CAA/GTT 32
5	ms 83 - 84	6-FAM	azul	181	2	TCA/AGT 13
	PG-42	NED	amarelo	196		GA 25
	PG-4	TET	verde	230		GA 43
6	*ms 87 - 88	6-FAM	azul	203	1	TGC/ACG 12
	PG-27	NED	amarelo	198	?	GA 12
	MGM-21	TET	verde			
7	*ms 107 - 108	6-FAM	azul	500	2	GA/CT 10
	PG-20	NED	amarelo	199		GA 48
	PG-3	TET	verde	128		GA 21
8	*ms 41 - 42	6-FAM	azul	117	-	CT/GA 16
	PG-14	NED	amarelo	198		GA 24
	*ms 115- 116	TET	verde	203	3	GA/CT 33
9	*ms 61 - 62	6-FAM	azul	217	3	GA/CT 9
	*PG-16	NED	amarelo	180	?	GA 26
	PG-5	TET	verde	164		CT 26
10	*ms 63 - 64	6-FAM	azul	163	1	CT/GA 15
	PG-19	NED	amarelo	202		CT 26
	*PG-6	TET	verde	154	?	GA 24
11	ms 67 - 68	6-FAM	azul	200	7	CA/GT 17
	PG-26	NED	amarelo	211		GA 9
	PG-9	TET	verde	171		GA 42/A 8 G
12	ms 77 - 78	6-FAM	azul	200	3	CA/GT 17
	PG-30	NED	amarelo	196		GA 22
	PG-12	TET	verde	110		CT 17

\*Locos selecionados após filtragem de dados de genotipagem.

Fonte: Locos selecionados (MS) de Kaye et al. (2003) e (PG e MGM) de Garrido (2001).

A caracterização dos locos de marcadores microssatélites foi feita através das análises de frequência dos alelos, do número de alelos observados em cada loco, da Diversidade Gênica (DG) observada, do Conteúdo Polimórfico Informativo (PIC) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Características dos alelos amplificados em cada loco, índices de diversidade genética (DG), conteúdo polimórfico informativo (PIC). UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

Marcador	Alelo	Frequência	Nº de alelos	Varição alélica observada	DG	PIC
ms 99-100	160	0,009	7	160-196	0,66	0,61
	163	0,028				
	184	0,49				
	187	0,25				
	190	0,09				
	193	0,173				
	196	0,38				
ms 47-48	162	0,531	5	162-190	0,59	0,52
	164	0,343				
	184	0,021				
	186	0,083				
	190	0,021				
ms 109-110	174	0,66	2	174-176	0,45	0,35
	176	0,339				
ms 93-94	173	0,018	10	173-224	0,45	0,43
	179	0,018				
	200	0,018				
	203	0,009				
	206	0,018				
	209	0,727				
	212	0,036				
	215	0,136				
	218	0,009				
	224	0,009				

Marcador	Alelo	Frequência	Nº de alelos	Varição alélica observada	DG	PIC
ms 125-126	150	0,154	10	150-219	0,73	0,69
	171	0,01				
	174	0,34				
	177	0,051				
	186	0,35				
	189	0,031				
	192	0,031				
	198	0,01				
	210	0,01				
	219	0,01				
ms 87-88	173	0,143	5	173-221	0,62	0,57
	179	0,277				
	182	0,527				
	185	0,018				
	221	0,036				
PG-27	198	0,03	16	198-224	0,90	0,89
	200	0,14				
	202	0,13				
	204	0,04				
	206	0,08				
	208	0,18				
	210	0,01				
	214	0,06				
	216	0,03				
	218	0,06				
	220	0,07				
	222	0,04				
	224	0,07				
	226	0,02				
232	0,02					
234	0,02					
ms 107-108	323	0,009	3	323-327	0,31	0,26
	325	0,815				
	327	0,176				
ms 41-42	127	0,027	6	127-325	0,46	0,43
	145	0,12				
	17	0,722				
	153	0,046				
	159	0,018				
325	0,064					
ms 61-62	116	0,009	2	212-214	0,38	0,31
	130	0,99				
PG-16	133	0,009	4	133-143	0,18	0,17
	135	0,903				
	137	0,019				
	143	0,067				
PG-6	137	0,032	13	137-173	0,88	0,87
	145	0,011				
	149	0,076				
	151	0,076				
	153	0,119				
	155	0,065				
	157	0,043				
	161	0,043				
	163	0,022				
	165	0,152				
	167	0,217				
	169	0,13				
	173	0,011				
ms 63-64	145	0,039	4	145-161	0,32	0,29
	147	0,814				
	159	0,137				
	161	0,009				
ms 115-116	116	0,009	4	116-130	0,02	0,02
	130	0,99				

Os dados de genotipagem possibilitaram a identificação de 89 alelos únicos. A média do número de alelos por loco foi 6,35, variando em dois alelos para os marcadores (ms 109-110, ms 115-116, ms 61-62) a 16 alelos para o marcador (PG-27). Grande parte dos marcadores microssatélites testados apresentou alto conteúdo informativo, com valores elevados de DG, PIC. Por outro lado, os marcadores ms 107-108, ms 115-116, ms 63-64 e PG-16 pouco contribuíram para a detecção de polimorfismo entre os isolados monospóricos em estudo. Esse fato se deve não somente ao baixo número de alelos que os marcadores apresentaram na população (Tabela 10), mas à existência de apenas um ou poucos alelos com alta frequência, praticamente fixados na população (Figura 2). Os marcadores

microsatélites mais informativos, em geral, apresentaram vários alelos na população, mas com distribuição de frequência relativamente uniforme entre os alelos. É o caso do loco PG-27 (Fig. 2), com 16 alelos, cujas frequências variam de 0,01% a 0,18%, com conteúdo polimórfico informativo (PIC) igual a 0,90, DG igual a 0,89.



Fig. 2. Frequências alélicas entre 14 locos microsatélites.

A Diversidade Genética (DG) multiloco, baseada na bateria de 14 locos microsatélites é 0,89. A eliminação da análise dos locos com baixo conteúdo informativo (ms 107-108, ms 115-116, ms 63-64 e PG-16) diminuiu a DG em valores mínimos. Observa-se, portanto, que estes quatro locos pouco contribuem para a eficiência de estimativas de diversidade genética. Observa-se economia de tempo e recursos quando apenas os dez locos microsatélites mais informativos são utilizados na genotipagem, em detrimento



dos 14 inicialmente selecionados. Vale ressaltar, no entanto, que no estudo de estrutura genética de populações estes marcadores podem ser importantes. Isto porque os marcadores mais úteis para detecção de subpopulações e para localizar um indivíduo em uma subpopulação ou outra são os marcadores que variam grandemente entre subpopulações, mas muito pouco dentro delas (ROSENBERG, 2004).

### Estrutura genética de população de isolados de *M. grisea*

O programa Structure foi utilizado para inferir a estrutura populacional que poderia estar presente nos isolados de *M. grisea* coletados nos Estados de Tocantins, Goiás e Pará. Nenhum nível hierárquico foi testado *a priori* para supor possível número de estratos da população do patógeno. Optou-se por verificar a existência de estruturação da população através de estimativas de  $\Delta K$ . As estimativas de  $\Delta K$  em diferentes estudos indicam que este parâmetro apresenta um valor preditivo eficiente do nível hierárquico de estruturação mais alto presente numa amostra populacional, apesar de problemas, como sua incapacidade de detectar a ausência de estruturação (quando  $K = 1$ ) estejam presentes. Neste estudo, o valor mais alto de  $\Delta K$  para os 114 isolados de *M. grisea* testados foi de  $K = 3$ , com valores para outros  $K$ 's estando próximos de zero (Fig. 3). Isto indica que a meta-população de isolados de *M. grisea* coletados nos três estados (GO, TO, PA) apresenta uma estruturação em três grandes grupos.

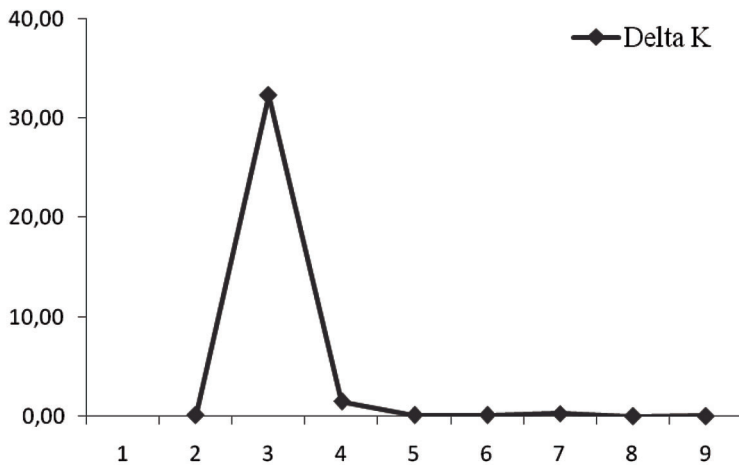


Fig. 3. Valores de  $\Delta K$ , com seu valor modal detectando um  $K$  de três grupos ( $K = 3$ ). UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

As estimativas do coeficiente de inclusão  $Q$  de cada isolado em cada uma das três subpopulações detectadas permitem inferir a relação entre a estruturação observada e a distribuição dos isolados de acordo com a sua distribuição geográfica. Todos os isolados foram claramente inseridos em uma das três subpopulações quando foi definido um  $K = 3$  (Fig. 4). Os valores estimados de  $Q$  (ancestría média estimada ou coeficiente de inclusão) para cada isolado são apresentados no triângulo. Cada isolado foi marcado com uma cor de acordo com o local da coleta (vermelho - Goiás; azul - Tocantins; amarelo - Pará) e agrupados em relação a cada lado do triângulo pelas medidas estimadas dos vetores de ancestría. Observa-se uma distribuição clara dos isolados nas três subpopulações.

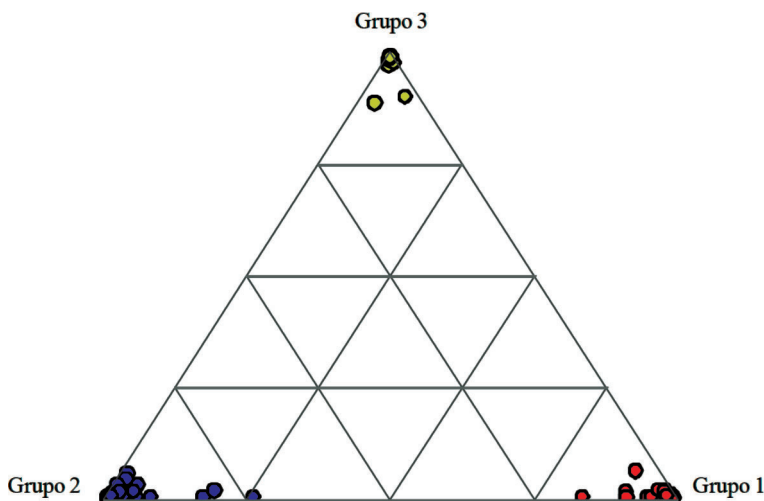


Fig. 4. Gráfico de estruturação de isolados dentro de cada grupo. UnB/EmbrapaCENARGEN, Brasília, 2009.

Os valores médios do grau de diferenciação genética das subpopulações por efeito de deriva genética ( $F_{ST}$ ) foram de 0,18 no Grupo 1; 0,50 no Grupo 2 e 0,31 no Grupo 3. O valor de  $F_{ST}$  para cada população representa a deriva genética inferida a partir de um ancestral comum de todas as populações. Todos os valores foram significativamente maiores que zero ( $\alpha = 0,039$ ). Há, claramente, uma subdivisão da população de isolados de *M. grisea* em três subpopulações.

### Distância genética par-a-par entre isolados de *M. grisea*

Uma matriz diagonal de distâncias genéticas par-a-par entre os 114 isolados monospóricos de *M. grisea* foi submetida à análise de agrupamento pelo método de UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973). O dendrograma de distância genética (Figura 5) indica a existência de três grupos de isolados: 38 isolados constituíram o Grupo 1 (33,3%), 60 isolados constituíram o Grupo 2 (52,7%) e 16 isolados constituíram o Grupo 3 (14%).

A origem geográfica (município) de cada isolado monospórico foi analisada em relação aos agrupamentos observados no dendrograma de distância genética. Os isolados originários de Goiás (município de Luís Alves) são observados em sua maioria (>60%) no Grupo 1 da análise de distância genética (Tabela 11; Fig. 5). Os isolados originários de Tocantins (municípios vizinhos de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré) são observados em sua maioria (>85%) no Grupo 2, enquanto os isolados originários do Pará (município de Paragominas) são observados (100%) no Grupo 3 (Tabela 11; Fig. 5).

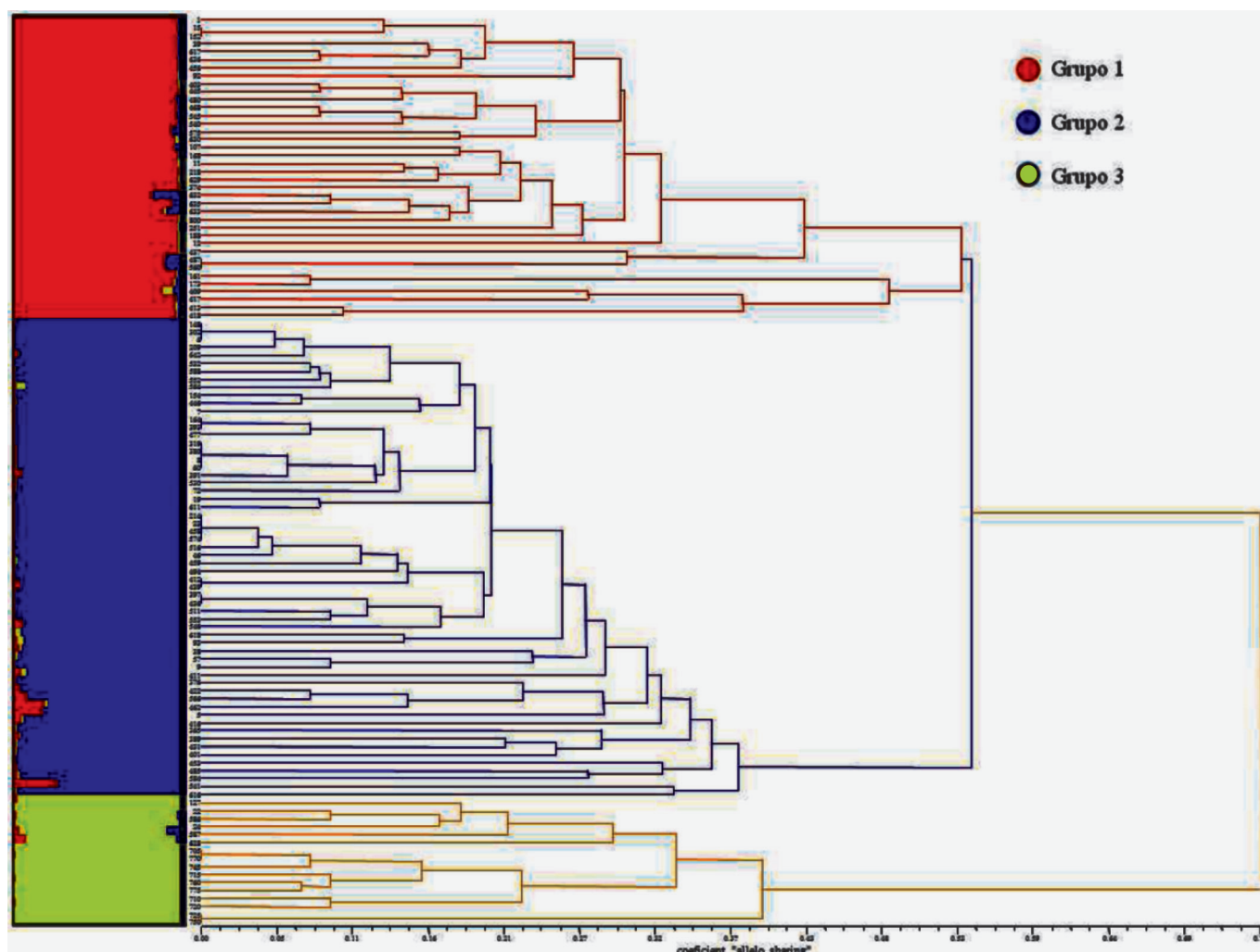


Fig. 5. Gráfico de barras desenhado a partir do programa Distruct e dendrograma de distâncias genéticas entre 114 isolados de *M. grisea*. UnB/UnB CENARGEN, Brasília, 2009.

**Tabela 11.** Percentual de isolados de diferentes regiões geográficas observados nas subpopulações detectadas. UnB, Brasília, 2009.

Origem	Subpopulações Detectadas			Nº de isolados
	1	2	3	
LuísAlves - GO	0,63	0,15	0,21	19
Formoso do Araguaia - TO	0,30	0,64	0,06	33
Lagoa da Confusão - TO	0,39	0,61	0	33
Dueré - TO	0,16	0,84	0	19
Paragominas - PA	0	0	1	10

A maioria dos isolados coletados no município de Luís Alves, no Estado de Goiás, foi enquadrada no Grupo 1 (63%). O Grupo 2 incluiu a maioria dos isolados coletados nos municípios do Estado do Tocantins (Formoso - 64%, Lagoa - 61% e Dueré - 84%). Já o Grupo 3 incluiu apenas os isolados coletados em Paragominas, Estado do Pará (100%). O isolamento geográfico entre as diferentes subpopulações parece contribuir para a estruturação observada. A população de isolados dos municípios do Estado do Tocantins cobre um raio de aproximadamente 120 quilômetros (km) e está representada no Grupo 2. Ao sul, o município de Luís Alves está distante dos municípios do Tocantins a aproximadamente 350 km, mas grande parte dos isolados deste município pertence ao Grupo 2. Já os isolados de *M. grisea* do município de Paragominas, a 1400 km de Luís Alves e 1.000 km dos municípios de Tocantins, formam um grupo à parte (Grupo 3), geneticamente distante dos Grupos 1 e 2. As estimativas de distância genética entre as três populações pelo coeficiente de Chord (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) indicam que a maior distância ocorre entre o Grupo 1 e o Grupo 3 (0,66). A menor distância genética (0,40) ocorreu entre os Grupos 1 e 2. A distância genética entre os Grupos 2 e 3 foi 0,62.

A análise conjunta das distâncias genéticas par-a-par e dos valores estimados de Q (coeficiente de inclusão) para cada isolado (Fig. 5) evidencia a congruência entre a análise de estrutura populacional e de diversidade genética. Foi observado que os isolados alocados em uma subpopulação de acordo com o coeficiente de inclusão (cores vermelha, azul e amarela) pertencem a grupos distintos, definidos por distância genética (Grupos 1, 2 e 3).

A análise de frequências alélicas dentro de cada subpopulação indica que alguns locos marcadores apresentaram alta eficiência na diferenciação das populações. O loco microssatélite ms 109-110 apresenta alelo (174pb) com alta frequência (90%) no Grupo 2 (azul). O loco PG-16 apresenta um alelo fixado (135 pb) no Grupo 1. Os locos ms 125-126, ms 87-88 e ms 115-116 apresentaram-se monomórficos dentro do Grupo 3 (amarelo), o mais distante geneticamente dos demais (Fig. 6). Conforme mencionado, os marcadores mais úteis para detecção de subpopulações e para localizar um indivíduo em uma subpopulação ou outra são os marcadores que variam grandemente entre subpopulações, mas muito pouco dentro delas (ROSENBERG, 2004).

Aparentemente, em diferentes regiões produtoras de arroz, observa-se exemplos de alta e baixa diversidade genética do patógeno, assim como níveis variáveis de estruturação populacional. Conhecer tais padrões é importante para a definição de estratégias de melhoramento genético para resistência à brusone pelos programas de melhoramento. A diversidade genética de isolados de *M. grisea*, oriundos da região Central do Brasil, especialmente do Estado do Tocantins, tem sido considerada alta em comparação com amostras de outras regiões do país, como a região Sul (BRONDANI et al., 2000; GARRIDO, 2001). O presente estudo corrobora estas estimativas e apresenta evidências de subestruturação da população de isolados. Estudos de estrutura genética de populações empregando marcadores microssatélites do genoma do patógeno são, até onde se tem informação, muito incipientes (BRONDANI et al., 2000; GARRIDO, 2001). Por outro lado, estudos de estrutura de população do patógeno baseados em polimorfismo de fragmentos de restrição detectados com sonda MGR 586 têm sido usados para revelar padrões de sub-estruturação de populações do patógeno em diferentes países. A correlação entre subpopulação e "linhagens" definidas nos estudos com a sonda MGR 586 não é conhecida.

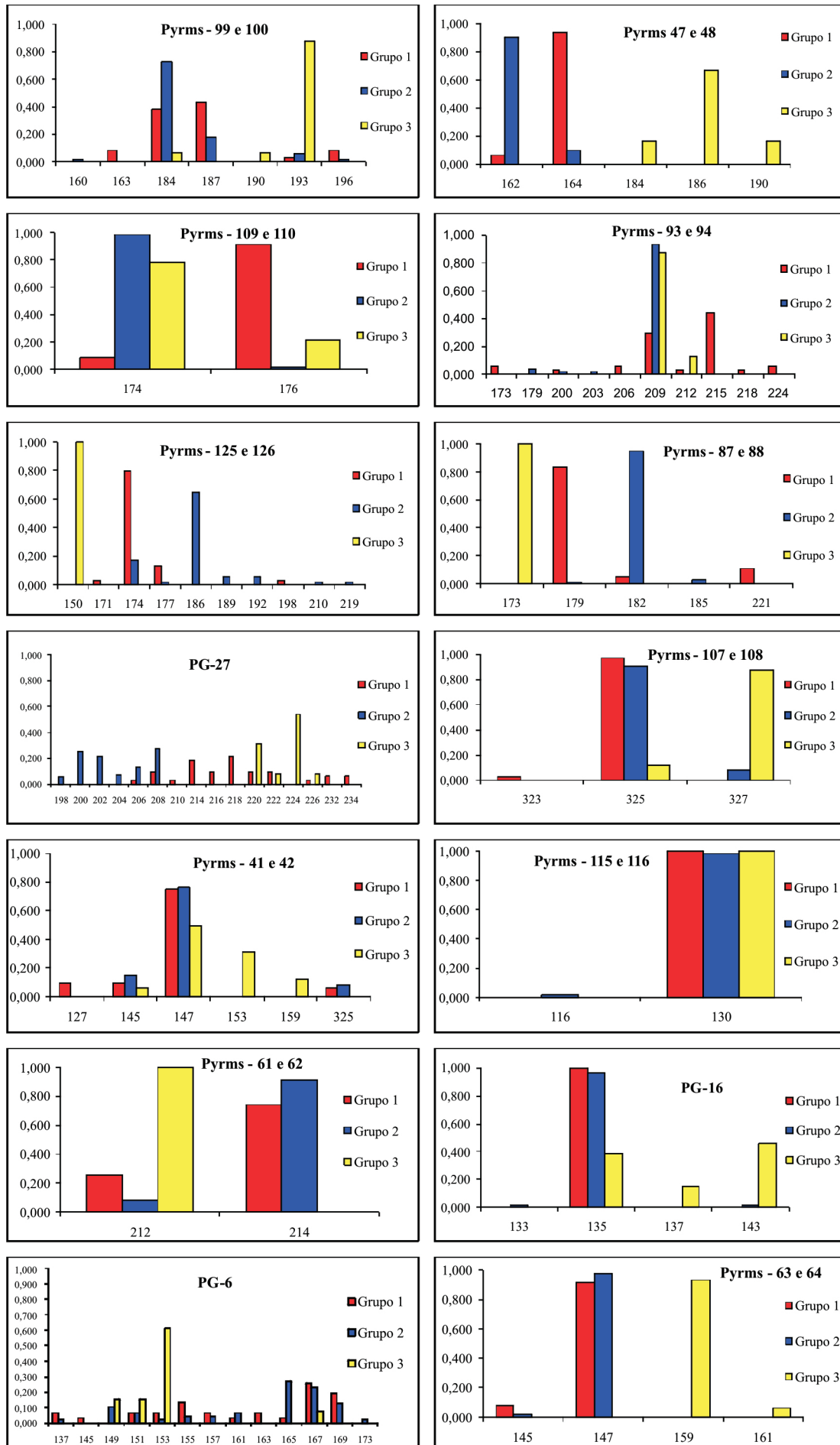


Fig. 6. Histograma de barras de frequência alélica entre três grupos e 14 marcadores microsatélites utilizados para avaliar a variabilidade genética de isolados monospóricos de *M. grisea*, UnB. Brasília, 2009.

Análises de estrutura de populações do *M. grisea* utilizando a sonda MGR 586 detectaram grupos distintos do patógeno ou linhagens *sensu* Levy et al. (1993), supostamente com propagação clonal, em diferentes regiões ou áreas de arroz. Estes grupos descritos e geneticamente relacionados são aparentemente provenientes de um ancestral comum (HAMER et al., 1989; LEVY et al., 1991, 1993; CHEN et al., 1995; ZEIGLER et al., 1995; FILIPPI et al., 1996; SHEN et al., 1996; XIA et al., 2000).

Entre os exemplos de diversidade genética e estruturação moderadas incluem-se a descrição de populações de *M. grisea* provenientes de dois locais de teste na China, separados por apenas 40 km, que foram consideradas geneticamente distintas com base em polimorfismo de fragmento de restrição (CHEN et al., 1995). A genotipagem de 79 isolados coletados de lavouras comerciais por mais de 30 anos no sul dos EUA utilizando a sonda MGR586 possibilitou agrupar os isolados em oito linhagens distintas (LEVY et al., 1991). Cada linhagem foi associada a um ou dois patótipos do patógeno, e a maioria delas foi específica. Em campos experimentais de Santa Rosa, na Colômbia, a análise de mais de 100 isolados, coletados de 15 cultivares, com a sonda MGR 586, possibilitou a detecção de seis linhagens distintas do patógeno. Os índices de similaridade dentro de cada linhagem variaram de 92 a 98% e, entre linhagens, de 37 a 85% (LEVY et al., 1993). A análise de 62 isolados coletados de lavouras de arroz na Coreia resultou em 16 linhagens, apresentando 80% de similaridade média (HAN et al., 1993).

Entre os exemplos de baixa diversidade genética e baixo nível de estruturação incluem-se os relatos de isolados pouco polimórficos coletados no Sul do Brasil (BRONDANI et al., 2000). No Estado de Arkansas, EUA, polimorfismo de DNA detectado pela sonda MGR-586 possibilitou a identificação de apenas quatro linhagens distintas do patógeno, com base na análise de 470 isolados monospóricos. Os estudos em Arkansas demonstraram variação restrita e limitada a cada local (XIA et al., 1993). No Japão, diferentes linhagens foram identificadas em isolados coletados na década de 70, mas somente duas linhagens nos isolados coletados durante 1993 a 1997. As linhagens da década de 70 desapareceram, possivelmente devido à introdução de cultivares resistentes que apresentaram resistência para todos os membros das linhagens (DON et al., 1999).

Entre os exemplos de alta diversidade genética e acentuado nível de estruturação incluem-se estudos realizados por Garrido (2001), onde identificou baixa diversidade genética entre isolados de *M. grisea* coletados na região Sul do país, em contraste com a população de isolados da região Norte do Brasil. Na China, 54 linhagens de MGR586 foram identificadas em uma coleção de 473 isolados, provenientes de 144 locais, em um período de 16 anos (SHEN et al., 1996). Em contraste com o limitado número de linhagens nos EUA, Colômbia e Filipinas, a análise molecular utilizando MGR-586 de 64 isolados brasileiros coletados das cultivares de arroz irrigado e de terras altas nos campos experimentais da Embrapa Arroz e Feijão mostrou que os isolados pertencem a 18 linhagens e 15 patótipos (FILIPPI et al., 1996). No presente estudo, utilizando marcadores microssatélites, os isolados de brusone oriundos de municípios vizinhos do Estado do Tocantins (Formoso, Dueré, Lagoa da Confusão) apresentam grande diversidade genética, mas em sua grande maioria (85%) foram incluídos em uma mesma subpopulação, contrastando com isolados de outras regiões (Luís Alves, GO; Paragominas, PA), que, respectivamente, em sua maioria, agruparam em subpopulações distintas.

A constatação de estruturação em populações de isolados de *M. grisea* do Centro-Norte do Brasil tem implicações imediatas para os programas de melhoramento genético visando resistência ao patógeno. A alta diversidade genética do patógeno implica na necessidade de adoção de metodologias que desfavoreçam o desenvolvimento de epidemias do patógeno. O emprego de resistência vertical em programas clássicos de retrocruzamento tem levado à quebra de resistência nas novas cultivares logo após o lançamento (RANGEL, 2009). A alta diversidade do patógeno favorece o desenvolvimento de raças capazes de infectar as novas variedades lançadas. O desenvolvimento e adoção de multilinhas formadas por linhagens quase-isogênicas que se diferenciam por genes de resistência de diferentes fontes (piramidização indireta) parece ser uma alternativa interessante para ser explorada por programas de melhoramento em áreas com alta diversidade do patógeno. Vale mencionar que a estruturação da

população do patógeno sinaliza para o desenvolvimento de variedades específicas para cada área referente a uma subpopulação. Assim, a região de Formoso do Araguaia, Dueré e Lagoa da Confusão, no Estado do Tocantins, deve ser monitorada para a diversidade racial do patógeno com vistas a desenvolver cultivares ou multilinhas específicos, resistentes às raças predominantes na região. De modo similar, os programas de melhoramento devem monitorar as raças predominantes em outras subpopulações, como em Luís Alves (GO) e Paragominas (PA), com vistas a desenvolvimento de cultivares específicos para estas regiões. Por fim, é importante aprofundar o estudo de isolados coletados na Região Amazônica, visto que aparentemente constituem um grupo diferente dos isolados encontrados em Tocantins e Goiás. Os isolados do Estado do Pará (Paragominas) são facilmente discriminados dos isolados das outras regiões com base no polimorfismo de DNA observado em locos microssatélites. No entanto, não há nada que indique que esta diferenciação esteja correlacionada com a aparente ausência de epidemias de brusone com alto impacto em produtividade na região amostrada.

## Conclusões

- Os marcadores microssatélites mostraram-se altamente eficientes para detectar estruturação em populações de isolados monospóricos de *M. grisea*.
- Alguns marcadores selecionados apresentam um conteúdo informativo elevado, facilitando a genotipagem em escala e propiciando alta eficiência na análise de polimorfismo de DNA.
- A população de isolados de *M. grisea* apresentou subestruturação em três subpopulações. Os isolados de Goiás (Luís Alves) em sua maioria são observados no Grupo 1; os isolados de Tocantins (Formoso, Dueré e Lagoa da Confusão) em sua maioria são observados no Grupo 2 e os isolados do Pará (Paragominas) são observados no Grupo 3.
- Os isolados do Pará são os mais distantes geneticamente em relação aos isolados de Goiás e Tocantins.
- A alta diversidade genética observada na população de isolados, assim como a evidência de estruturação sugerem a necessidade de monitoramento específico e emprego de estratégias adequadas (ex., multilinhas, piramidização) pelos programas de melhoramento genético para as subpopulações detectadas.

## 3) Mapeamento genético de locos de resistência a *Magnaporthe grisea* em linhagens puras recombinantes de arroz (*Oryza sativa* L.)<sup>3</sup>

### Introdução

O fungo *Magnaporthe grisea* é o agente causal da brusone, a doença de maior importância da cultura do arroz. A identificação e utilização de genes de resistência à brusone tem se mostrado a maneira mais efetiva e econômica de controlar a doença. A busca de resistência durável ao patógeno depende do conhecimento detalhado do processo de interação patógeno-hospedeiro. A localização de genes de resistência no genoma de arroz e o desenvolvimento de estratégias de emprego de genes de resistência completa e/ou parcial no melhoramento genético é parte importante do desenvolvimento de variedades melhoradas. A identificação e localização no genoma de genes de resistência à brusone na interação entre isolados de *M. grisea* coletados no Brasil e variedades de arroz é ainda inédita. Nenhum gene de resistência a isolados específicos do patógeno coletados no Brasil foi mapeado no genoma de arroz até o momento. O objetivo deste trabalho foi identificar regiões do genoma de arroz associadas ao controle de resistência à brusone utilizando isolados do patógeno coletados na região Central do Brasil e variedades tradicionais de arroz do Banco de Germoplasma da Embrapa. Para isto, uma população de linhagens puras recombinantes (RILs - *Recombinant Inbred Lines*) derivadas do cruzamento entre as variedades Chorinho (variedade tradicional - resistente) e Amaro (variedade comercial - suscetível) foi utilizada para mapear locos de resistência ao isolado P33 (raça fisiológica ID-10), coletado em Formoso do Araguaia, TO. A fenotipagem de resistência à doença na população segregante foi realizada em condições

<sup>3</sup> Parte da Dissertação apresentada pela estudante BRUNA JAQUELINE OHSE ROSA DE ARAÚJO ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia, da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

controladas de casa de vegetação. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios monospóricos ( $3 \times 10^5$  conídios/ml) e avaliadas com base em uma escala de notas (1 a 9) de fenótipo da interação patógeno-hospedeiro. A genotipagem da população segregante foi feita com 124 marcadores microssatélites (SSR) distribuídos no genoma de arroz, utilizando um sequenciador automático ABI-3700. Foi construído um mapa genético dos 12 cromossomos de arroz, com 1240 cM e distância de recombinação média entre marcadores de 10,0 cM. A fenotipagem da população RILs e testes de ligação com os 124 locos microssatélites genotipados possibilitou a identificação de três locos no cromossomo 7 (RM7441, RM505 e RM234) e dois locos no cromossomo 8 (RM7285 e RM3153) significativamente associados ao controle de resistência ao isolado *M. grisea* P-33. O loco mapeado no cromossomo 7 foi provisoriamente denominado *Pi-Ch1* e o mapeado no cromossomo 8, *Pi-Ch2*. Os alelos de resistência ao patógeno nas duas regiões genômicas foram doados pela variedade tradicional de arroz Chorinho. Marcadores microssatélites ligados a genes de resistência à brusone em outros cruzamentos e mapeados no presente estudo corroboram os resultados dos testes de ligação. Testes genéticos poderão identificar se os locos *Pi-Ch1* e *Pi-Ch2* são alélicos ou não a outros genes já relatados. O mapeamento de locos de resistência à brusone utilizando isolados coletados no Brasil Central, onde a quebra de resistência em variedades melhoradas ocorre em curto período após o lançamento, é um importante passo na compreensão dos mecanismos de resistência ao patógeno e para o desenvolvimento de estratégias de seleção para resistência durável à doença.

## Materiais e Métodos

### População de mapeamento

Para a construção do mapa genético foram utilizadas 161 RILs na geração  $F_7$ , derivadas do cruzamento entre as variedades Chorinho (CA800103) e Amaro (CNA13218). Chorinho, sub-espécie *japonica* tropical, é uma variedade tradicional cultivada em condição de várzea úmida no sul do estado de Minas Gerais. Amaro, da sub-espécie *japonica* temperada, é uma variedade comercial, extensivamente cultivada na Austrália. As linhagens puras recombinantes (RILs – *recombinant inbred lines*) foram geradas por SSD (*single seed descent*) a partir de plantas  $F_2$  derivadas por autofecundação de uma única planta  $F_1$ , na Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, GO).

### Obtenção, cultivo e armazenagem dos isolados de *M. grisea*

Os isolados de *M. grisea* utilizados no estudo foram coletados nos anos agrícolas 2006/2007 e 2007/2008 em lavouras no Estado do Tocantins, nos municípios de Lagoa da Confusão, Dueré, Formoso do Araguaia e no Estado de Goiás, no município de São Miguel do Araguaia (LuísAlves do Araguaia) (DIAS NETO, 2008; SILVA, 2008). Foram coletadas folhas e panículas infectadas de plantas em lavouras comerciais de arroz. De cada planta infectada foi retirada uma amostra biológica que deu origem a apenas um isolado monospórico do patógeno. A amostragem no campo foi aleatória, em área de pelo menos um hectare dentro da lavoura, e com um raio mínimo de 10 m entre plantas selecionadas. A obtenção dos isolados monospóricos é descrita em detalhes por Dias Neto (2008).

Os isolados foram repicados para placas contendo 20 ml de meio BDA (250 g de batata, 18g de dextrose, 16 g de ágar, completando o volume para um litro de água destilada) e foram mantidos em câmara incubadora tipo BOD a 25°C sob luz contínua para crescimento do micélio.

### Plantio das linhagens parentais

Os genitores do cruzamento (Chorinho e Amaro) foram plantados em bandejas de plástico de 40 x 30 x 8 cm, utilizando-se quinze sementes por linha. O objetivo desta etapa do estudo era identificar interações fenotípicas contrastantes entre as linhagens parentais utilizando diferentes isolados do patógeno. Para o plantio foram utilizados 4 kg do substrato comercial PLANTMAX previamente autoclavado por 30 minutos a 120°C. O plantio foi realizado em casa de vegetação climatizada com temperatura variando de 20 a 30°C. No 18º dia após o plantio foi realizada adubação de cobertura com 3 g de uréia (45% N) por bandeja.

### Esporulação e inoculação

Cinco isolados monospóricos de *P. oryzae* (P33, P73, P211, P464, P589) foram utilizados na inoculação das linhagens parentais Chorinho e Amaro. Onze dias após o plantio, os isolados foram repicados em quatro placas de petri com meio BDA. Quatorze dias após a repicagem, os micélios dos isolados foram submetidos a um processo de estresse para induzir a produção de conídios. Este processo consistiu na raspagem do micélio superficial com alça de metal estéril, realizada em câmara de fluxo laminar. Em seguida, as placas abertas foram colocadas em bancada sob luz fluorescente contínua, cobertas com um tecido do tipo crepe (branco e semi-transparente) por 72 horas.

Após a esporulação, a suspensão de conídios foi preparada através de lavagem de cada placa com 15 ml de água destilada, auxiliada por um pincel macio, seguida da filtragem da suspensão em gaze estéril. A suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de  $3,0 \times 10^5$  conídios/ml. As plantas foram inoculadas no 21º dia após a emergência das plantas, com 30 ml do inóculo por bandeja, utilizando-se um pulverizador manual. As bandejas foram colocadas em câmara úmida escura por 24 horas, com temperatura média de 25°C e umidade relativa acima de 95%.

### Avaliação de fenótipo da interação patógeno-hospedeiro

A avaliação de sintomas nas folhas foi realizada treze dias após a inoculação das plantas, por meio de análise visual do fenótipo da interação patógeno-hospedeiro, utilizando-se escala de 1 a 9 (LEUNG et al., 1988). Esta escala foi modificada, sendo adicionada a nota 4, conforme sugerido por Prabhu e Filippi (2006). As notas 1 e 3 são dadas para reações de incompatibilidade (resistência) e as notas 4, 5, 7 e 9 para reações crescentes de compatibilidade (susceptibilidade) entre patógeno e hospedeiro (Fig. 7). A avaliação foi feita por parcela, levando em consideração a quantidade e o tipo de lesão nas folhas.

### Avaliação da interação do isolado *M. grisea* P33 e linhagens puras recombinantes do cruzamento Chorinho x Amaro

A população RIL  $F_7$ , composta de 161 linhagens, foi inoculada com o isolado monospórico *M. grisea* P33 do patógeno, o qual gerou contraste de interação fenotípica entre os parentais. A variedade Chorinho apresenta um fenótipo altamente resistente ao isolado (nota 1), com reação típica de hipersensibilidade (Fig. 8-a). A variedade Amaro apresenta um fenótipo de suscetibilidade (nota 4), com desenvolvimento lento de sintomas das doença (Fig. 8-b).

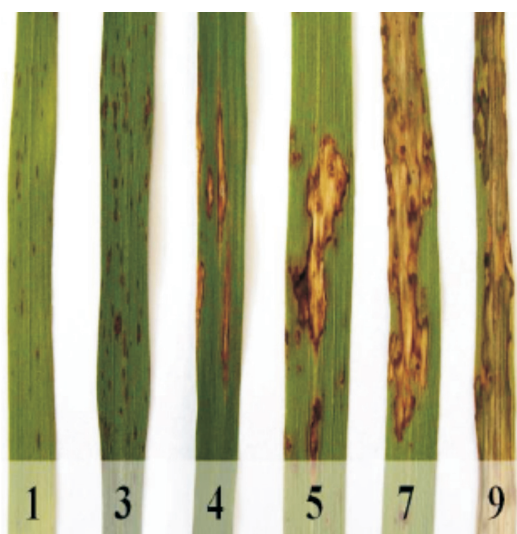


Fig. 7. Escala de notas usada na análise do fenótipo da interação entre isolados de *Magnaporthe grisea* e plantas de arroz.

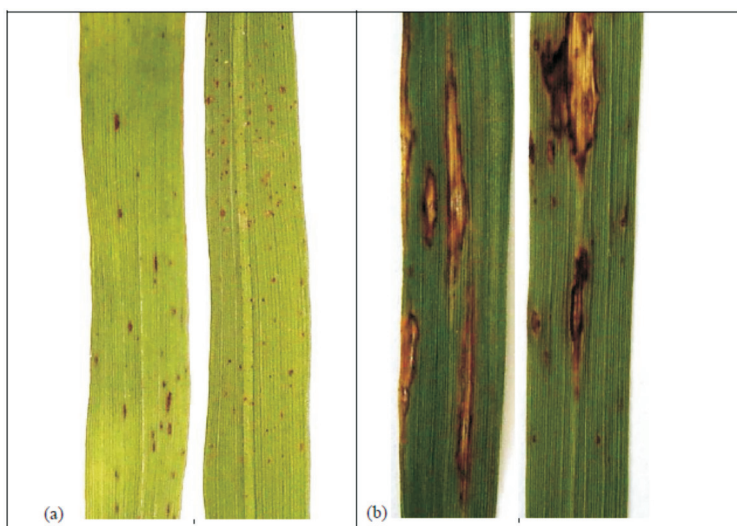


Fig. 8. Fenótipo da interação patógeno-hospedeiro entre o isolado monospórico *M. grisea* P33 e os parentais da população de linhagens puras recombinantes (a) Chorinho (resistente) e (b) Amaro (suscetível).



As 161 linhagens foram semeadas em bandejas de plástico de 40 x 30 x 8 cm, com oito linhas por bandeja e dez plantas por linha (Fig. 9). Utilizou-se um desenho experimental de Blocos Casualizados com três repetições. Cada bloco do experimento foi composto de 22 bandejas contendo parcelas das 161 linhagens puras recombinantes e das linhagens parentais. Em cada bloco adicionaram-se, ainda, duas bandejas onde os parentais foram plantados de forma alternada para facilitar a avaliação dos sintomas.

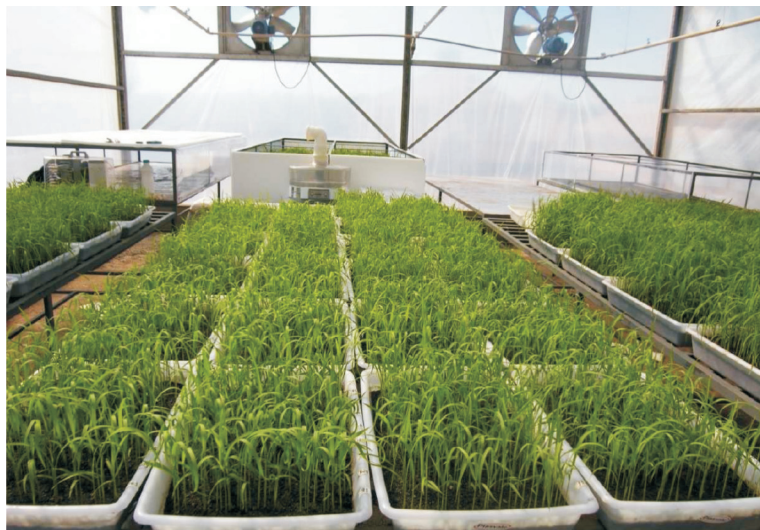


Fig. 9. Avaliação da interação do isolado *M. grisea* P33 com linhagens puras recombinantes derivadas do cruzamento Chorinho x Amaro. Disposição do experimento em blocos na casa de vegetação.

Em cada bandeja foram utilizados 4 kg do substrato comercial PLANTMAX previamente autoclavado por 30 minutos a 120°C. As bandejas permaneceram em casa de vegetação climatizada, com temperatura variando de 20 a 30°C desde o plantio até a avaliação. No 18º dia após o plantio foi realizada adubação de cobertura com 3 g de uréia (45% N) por bandeja.

Onze dias após o plantio, o isolado de *M. grisea* foi repicado para 50 placas de petri contendo meio BDA e quatorze dias após a repicagem, o isolado foi submetido ao processo de estresse para induzir a esporulação. Três dias após o estresse, 900 mL da suspensão a  $3 \times 10^5$  conídios/mL foi preparada e a inoculação dos genitores e da população de linhagens puras recombinantes foi realizada.

### Extração de DNA, reações de amplificação e seleção de locos polimórficos

Para os ensaios de genotipagem e construção de mapa genético, o DNA genômico de plântulas das 161 RILs  $F_7$  foi extraído. As plântulas foram germinadas em câmara de crescimento e as amostras biológicas coletadas entre cinco e sete dias após a emergência. Foi utilizado o protocolo padrão com base em CTAB, conforme Ferreira e Grattapaglia (1998). A concentração do DNA foi estimada em eletroforese de gel de agarose 1% utilizando-se DNA  $\lambda$  (Invitrogen) como padrão para quantificação. Após a quantificação, o DNA foi diluído em tampão TE para uma concentração final de 2ng/ $\mu$ L, adequado aos ensaios de PCR.

Uma bateria de 430 pares de iniciadores microssatélites marcados com fluorescência foi avaliada para a definição de locos polimórficos entre as linhagens parentais Chorinho e Amaro. Estes marcadores foram desenvolvidos por diferentes grupos ao longo dos últimos anos, e podem ser acessados no site (Gramene Database) <http://www.gramene.org/>. O ensaio foi realizado empregando painéis multiplex (variando entre dois a seis locos por painel) para genotipagem dos parentais e seleção dos marcadores polimórficos. Cada painel incluía locos com a mesma temperatura de anelamento. As reações foram conduzidas utilizando o Kit Multiplex PCR (Qiagen), contendo: 2,5 $\mu$ L de *PCR Master Mix*; 0,5 $\mu$ L de *Q-solution*; e uma solução com os iniciadores direto e reverso de forma a ter uma concentração na reação de 0,2 $\mu$ M; 0,4 $\mu$ L de  $H_2O$  *RNAse-free* e 2ng de DNA.

As reações de polimerase em cadeia foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, EUA). O programa de amplificação de produtos de PCR foi o seguinte: uma primeira etapa a 94°C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, 90 segundos à temperatura de

anelamento do conjunto de iniciadores do painel (variando entre 50°C e 67°C), 1 minuto a 72°C, e um passo de extensão final de 30 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram diluídos em uma proporção 1:5, e 0,6µL do produto diluído foi adicionado a 8µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), 0,35µL do padrão de fragmentos de DNA de tamanho conhecido (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001), e 1,05µL de H<sub>2</sub>O padrão Milli-Q.

A eletroforese capilar para a separação dos fragmentos amplificados em cada loco microssatélite foi realizada em sequenciador automático ABI Prism 3700 (Applied Biosystems). A definição do tamanho dos fragmentos foi realizada com o emprego dos programas GeneScan Analysis 3.7 e Genotyper 3.7 (Applied Biosystems).

### Construção do mapa genético

Os locos polimórficos entre as linhagens Chorinho e Amaro foram inicialmente avaliados para segregação Mendeliana, com o objetivo de detectar desvios da proporção esperada de 1:1 em uma população  $F_7$  de linhagens puras recombinantes. Os testes de distorção de segregação foram realizados utilizando-se o programa GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2004). A correção de erro do tipo I, ou seja, aceitar uma diferença estatística quando na realidade ela não é verdadeira, foi realizada com o emprego do teste de FDR, ou razão de falsas descobertas (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). O nível de significância para os testes de distorção de segregação foi de 1%.

Um mapa de ligação foi construído utilizando-se o programa MAPMAKER/MacIntosh versão 2.0 (LANDER et al., 1987). Somente linhagens com um mínimo de 80% de locos genotipados (menos de 20% dos dados faltantes) foram incluídas na construção do mapa de ligação. Com o comando *group*, empregaram-se valores de LOD mínimo de 4,0 e fração de recombinação ( $\theta$ ) máxima de 0,35 como parâmetros iniciais no estabelecimento dos grupos de ligação, com exceção para o grupo de ligação 5, menos denso em marcadores, em que foi utilizada fração de recombinação máxima ( $\theta$ ) de 0,45. Dentro de cada grupo de ligação estimou-se a ordem mais provável dos marcadores (comandos *three point*, *first order*, *compare* e/ou *ripple*). A ordem dos marcadores microssatélites no mapa físico do genoma de arroz foi utilizada para checar, em cada grupo de ligação, as ordens finais dos locos nos cromossomos, através do banco de dados Gramene (<http://www.gramene.org/>). Cada grupo de ligação montado neste estudo foi nomeado de acordo com os cromossomos de arroz, tendo como referência o banco de dados do mapa físico da espécie.

### Mapeamento de locos de resistência à brusone

As notas atribuídas ao fenótipo da interação entre o isolado *M. grisea* P33 e uma subamostra de 107 RILs do cruzamento Chorinho x Amaro foram analisadas para associação com os marcadores microssatélites. A subamostra analisada foi definida com base na consistência dos dados de fenotipagem obtidos para cada uma das linhagens analisadas. Os testes de ligação genótipo/fenótipo foram baseados em tabelas de contingência 2x2, estimando-se valores de significância de testes qui-quadrado (corrigidos para continuidade pela fórmula de Yates) e testes exatos de Fisher.

O teste de qui-quadrado com a correção de continuidade de Yates é adequado quando uma ou mais classes em uma tabela de contingência 2x2 possui um número pequeno de amostras. Nesta situação, o experimento fere a premissa de que a probabilidade das frequências observadas dos dados discretos tem uma distribuição qui-quadrado, que é contínua. O qui-quadrado (Yates) ajusta a continuidade da distribuição com a seguinte equação:

$$\chi_{\text{Yates}}^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(|O_i - E_i| - 0.5)^2}{E_i}$$

Onde; N = número de eventos;  $O_i$  = frequência observada de eventos;  $E_i$  = frequência esperada de eventos.

O teste exato de Fisher, específico para análise de dados categóricos quando o tamanho das amostras em diferentes classes é pequeno, também foi utilizado na análise de associação entre marcadores microssatélites e o fenótipo da interação patógeno-hospedeiro. O teste é exato e não-paramétrico. A equação é a seguinte:

$$p = \binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c} / \binom{n}{a+c} = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!}$$

Onde a, b, c e d representam os valores distribuídos em cada um dos quadrantes da tabela de contingência 2x2.

Estimaram-se ainda os valores de  $R^2$  pelo método de regressão linear simples, empregando o programa GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2004). Por fim, empregou-se uma análise de mapeamento de Intervalo (LANDER; BOTSTEIN, 1989) e Mapeamento de Intervalo Composto (JANSEN, 1993; ZENG, 1993), através do programa WinQTLCartographer (WANG et al., 2007). O valor de LOD mínimo para determinar significância estatística (CHURCHILL; DOERGE, 1994; DOERGE; CHURCHILL, 1996) foi estimado através de testes de permutação (1000 permutações; nível de significância de 0,05). Para o Mapeamento de Intervalo Composto utilizaram-se parâmetros referentes ao Modelo 6, ou seja, *forward regression method*, oito marcadores controle, janela de 10 cM.

## Resultados e Discussão

A brusone do arroz, causada por *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, é a mais importante doença da cultura, afetando a produção de arroz em todas as áreas onde a espécie é cultivada. O uso de genes de resistência ao patógeno é a maneira mais eficiente, econômica e ambientalmente adequada para minimizar os danos causados pelo fungo (OU, 1985).

O patógeno, no entanto, apresenta uma alta variabilidade em patogenicidade (OU, 1980, 1984; VALENT; CHUMLEY, 1991) e diversidade genética (GARRIDO, 2001). Na região Central do Brasil, a variabilidade genética observada em amostras colhidas em um hectare de lavoura infectada pelo patógeno é maior do que em amostras colhidas em áreas extensas de regiões de clima temperado, como o Sul do Brasil (BRONDANI et al., 2000). Esta variabilidade do patógeno por certo afeta a durabilidade da resistência das variedades lançadas pelos programas de melhoramento genético de arroz. Tem sido observado que a quebra de resistência das variedades melhoradas no Brasil Central em geral ocorre apenas dois anos após o lançamento das mesmas.

Portanto, é grande a necessidade de desenvolvimento de estratégias que facilitem a piramidização direta ou indireta (ex. multilinhas, sintéticos) de genes de resistência nas novas variedades advindas dos programas de melhoramento. Espera-se, desta forma, o desenvolvimento de variedades com resistência estável e durável ao fungo causador da brusone. Para isto, o conhecimento da genética da interação *Magnaporthe-Oryza* é fundamental. Dados de localização e efeito de genes de resistência ao patógeno no genoma de arroz são importantes para este fim.

As raças de *M. grisea* têm padrões de distribuição geográfica, ou seja, cultivares resistentes de uma determinada região podem ser altamente susceptíveis em outra região. Raças patogênicas variam de localidade para localidade (OU; AYAD, 1968; OU et al., 1970; OU, 1979). Daí a importância de conhecer os padrões de reação entre *M. grisea* e *O. sativa* encontrados no Brasil.

Até o momento, não há, na literatura, descrição de estudo de mapeamento de genes de resistência à brusone com isolados de *M. grisea* obtidos de lavouras de arroz em território nacional e envolvendo a análise da interação do fungo com variedades tradicionais ou linhagens usadas pelos programas nacionais de melhoramento genético de arroz. Este estudo é uma primeira tentativa de iniciar esta abordagem. O uso de genes de resistência a diferentes raças de *M. grisea* pelos programas de melhoramento depende deste tipo de conhecimento para o desenvolvimento de estratégias eficazes de obtenção de variedades resistentes.

Cinco isolados de brusone de diferentes raças fisiológicas foram inicialmente avaliados para reação diferenciada entre variedades de arroz utilizadas no desenvolvimento de populações segregantes. O isolado de brusone do Brasil Central (P33), raça fisiológica ID-10, foi selecionado para análise de interação com uma população de linhagens puras recombinantes (RIL) de arroz. O cruzamento realizado para desenvolver a população RIL envolveu uma variedade tradicional Chorinho (resistente) e a variedade comercial de arroz Amaro (suscetível).

Inicialmente, foram analisados 430 marcadores microssatélites para identificar locos polimórficos entre as linhagens parentais Chorinho e Amaro. Um total de 124 marcadores apresentando alta qualidade e comportamento Mendeliano, sem distorção de segregação significativa, foi selecionado para análise de ligação (Fig. 10).

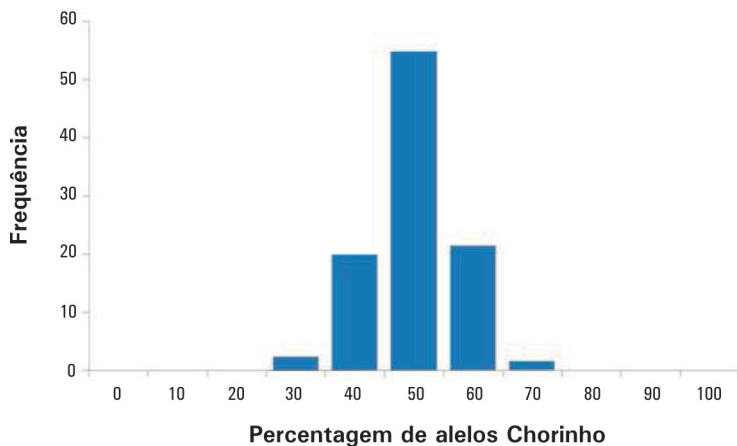


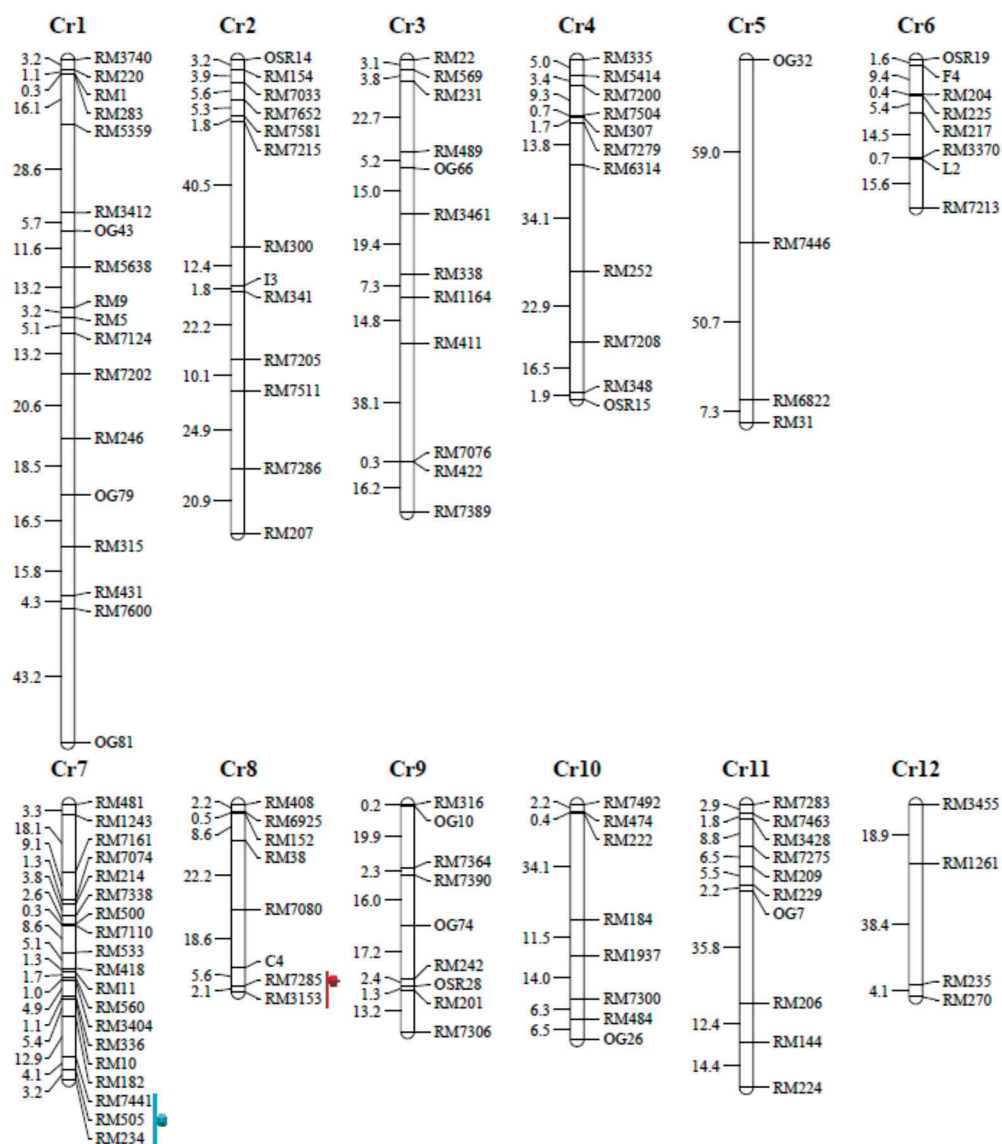
Fig. 10. Distribuição de frequência do percentual de alelos de Chorinho nas 161 linhagens puras recombinantes (RILs) do cruzamento Chorinho x Amaro.

A distribuição destes locos por todos os 12 cromossomos da espécie foi inicialmente confirmada através da localização *in silico* da sequência dos iniciadores destes marcadores no genoma de arroz, utilizando o banco de dados disponibilizado pelo portal Gramene (<http://www.gramene.org/>).

Um mapa genético com 124 marcadores microssatélites e cobrindo 1240 cM do genoma de arroz foi construído para o cruzamento Chorinho x Amaro (Fig. 11), com base na segregação alélica observada em 161 linhagens puras recombinantes de arroz. A ligação genética entre marcadores foi determinada pelo comando agrupar do programa Mapmaker MacIntosh versão 2.0, com um valor de LOD maior do que 4,0 e fração de recombinação máxima de 0,35, com exceção para o grupo de ligação 5, em que foi utilizada fração de recombinação máxima ( $\theta$ ) de 0,45. Apesar da distância ajustada entre os locos no grupo de ligação 5 ser maior que a dos demais grupos, os locos OG32, RM7446, RM6822 e RM31 de fato pertencem ao cromossomo 5, conforme verificado no mapa físico da espécie (<http://www.gramene.org/>). Os cromossomos mais densos em marcadores microssatélites foram os cromossomos 1 e 7, com distância média entre marcadores de 12,2 cM e 4,6 cM, respectivamente. Os cromossomos com menor densidade de marcadores foram os cromossomos 5 e 12, com distância média entre marcadores de 29,2 cM e 15,3 cM, respectivamente. A distância média entre locos nos 12 cromossomos foi de 10,0 cM.

As notas atribuídas ao fenótipo da interação entre o isolado *M. grisea* P33 e uma subamostra de 107 RILs do cruzamento Chorinho x Amaro foram analisadas para associação com os 124 marcadores microssatélites. A análise foi baseada em tabelas de contingência 2x2 estimando-se valores de significância de testes qui-quadrado (corrigidos para continuidade pela fórmula de Yates) e testes exatos de Fisher. O teste exato de Fisher é um teste mais rigoroso que o qui-quadrado (Yates) quando uma ou mais classes em uma tabela de contingência 2x2 possui um número pequeno de amostras, o que ocorreu em algumas combinações genótipo (alelo Chorinho e alelo Amaro) versus fenótipo (resistente e suscetível). Essas tabelas de contingência são típicas de estudos de resistência a patógenos em plantas (TABIEN et al., 2000).

Quando os dois testes foram significativos, isto é, o valor de qui-quadrado (Yates) foi maior ou próximo de 6,64 ( $p < 0,01$ ) e um teste exato de Fisher foi  $< 0,001$ , considerou-se ligação significativa entre o loco marcador e um gene maior de resistência ao isolado monospórico *M. grisea* P33. Os valores de  $R^2$  da análise de regressão linear simples também foram considerados na análise e detecção de marcadores ligados a locos de resistência. Desta forma, entre os marcadores testados, três locos no cromossomo 7 (RM7441, RM505 e RM234) e dois locos no cromossomo 8 (RM7285 e RM3153) apresentaram-se significativamente associados ao controle de resistência à brusone (Tabela 12).



**Fig. 11.** Mapa genético composto de 124 marcadores microssatélites, baseado em 161 linhagens puras recombinantes do cruzamento Chorinho x Amaro. A denominação e orientação dos cromossomos segue o mapa físico de arroz (<http://www.gramene.org/>). As barras indicam os marcadores que apresentam ligação significativa com locos de resistência a *M. grisea* isolado P33, e o círculo indica o marcador mais significativamente associado ao controle de resistência ao patógeno.

Uma análise dos genótipos no loco RM505 do cromossomo 7, o mais significativamente associado à resistência ao isolado P33, indicou que 43 das 60 linhagens resistentes ao patógeno (~64%) apresentavam homozigose para alelos provenientes da linhagem parental Chorinho, e 37 das 52 linhagens suscetíveis ao patógeno (~72%) apresentavam homozigose para alelos provenientes de Amaro. Frequências similares foram observadas nos locos RM7441 e RM234 indicando que o alelo de resistência é proveniente da linhagem parental Chorinho.

Análise similar no loco RM7285 indicou que 40 das 58 linhagens resistentes ao patógeno (~69%) apresentavam homozigose para alelos provenientes da linhagem parental Chorinho, e 27 das 42 linhagens suscetíveis ao patógeno (~64%) apresentavam homozigose para alelos provenientes de Amaro. Dados similares foram observados no loco RM3153. Estes dados indicam que, também nesta região do cromossomo 8, o alelo de resistência ao isolado P33 é proveniente da linhagem parental Chorinho.

Como até o momento não há nenhum estudo de mapeamento de locos de resistência à brusone com variedades brasileiras de arroz, como a variedade tradicional Chorinho, o loco de resistência mapeado no cromossomo 7 foi denominado provisoriamente de *Pi-Ch1*, e o loco mapeado no cromossomo 8 foi denominado *Pi-Ch2*. A linhagem parental Chorinho possui, portanto, pelo menos dois locos de resistência ao isolado P33 de brusone.

A normalidade dos dados de distribuição das notas de resistência/suscetibilidade das linhagens RILs foi checada usando os testes de curtose, simetria e Lilliefors através do programa Genes (CRUZ, 1998). Mesmo após várias tentativas de transformação (raiz-quadrada, arc sen, etc), os valores dos testes de normalidade permaneceram significativos, ou seja, rejeitou-se a hipótese nula de distribuição normal das notas de resistência/suscetibilidade atribuídas à linhagens puras recombinantes (RILs). Não obstante, foi dado prosseguimento à análise de intervalo de mapa, usando os procedimentos do Programa QTL-Cartographer (Fig. 12 e 13).

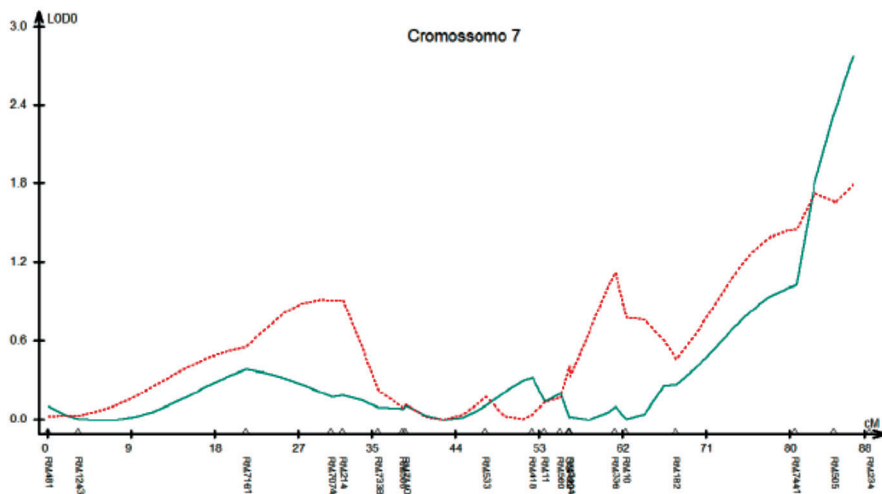


Fig. 12. Mapeamento de intervalo (linha vermelha pontilhada) e mapeamento de intervalo composto (linha azul) na região do loco *Pi-Ch1* no cromossomo 7 de arroz. Os valores de LOD não são significativos (LOD mínimo = 44,7).

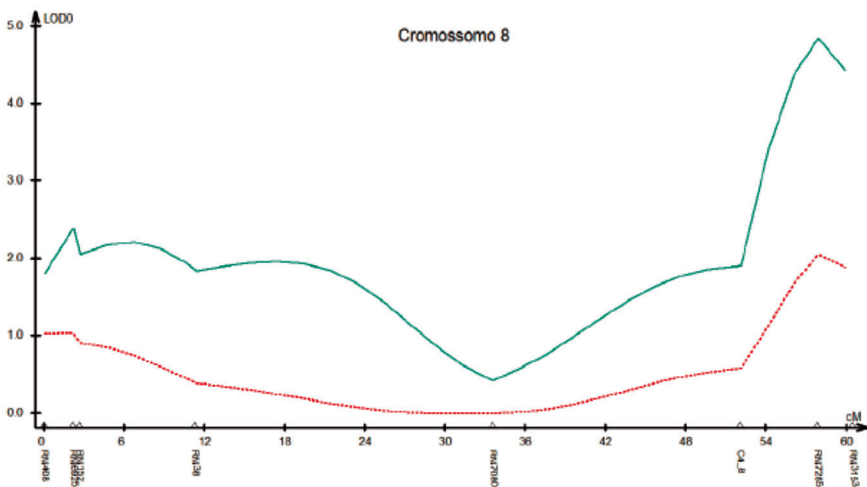


Fig. 13. Mapeamento de intervalo (linha vermelha pontilhada) e mapeamento de intervalo composto (linha azul) na região do loco *Pi-Ch2* no cromossomo 8 de arroz. Os valores de LOD não são significativos (LOD mínimo = 44,7).

Apesar de ter sido observada uma elevação nos valores de significância de associação genótipo/fenótipo nas regiões dos marcadores associados aos locos *Pi-Ch1* e *Pi-Ch2*, respectivamente localizados nos cromossomos 7 e 8, esta estratégia de mapeamento não identificou nenhuma região genômica significativamente associada à resistência à brusone neste cruzamento. Deve ser mencionado que a análise de intervalo de mapa é sensível a dados qualitativos (especialmente se não normalizados), onde qualquer erro de interpretação da interação patógeno hospedeiro, refletindo na nota atribuída a uma linhagem, tem impacto na detecção e localização do loco de resistência (WRIGHT et al., 1998). O uso desta refinada estratégia de mapeamento seria adequado com a utilização de fenótipo quantitativo da interação patógeno-hospedeiro (ex., curva de progresso da doença, ou área de dano causado pela doença), o que permitiria um mapeamento mais preciso dos locos envolvidos em resistência. Deve ser mencionado que esta mesma população de RILs do cruzamento Chorinho x Amaroó estará sendo submetida a tais análises para corroborar o mapeamento dos locos *Pi-Ch1* e *Pi-Ch2*.

Pelo menos 85 genes maiores conferindo resistência à brusone foram mapeados até o momento no genoma do arroz (BALLINI et al., 2008). Além dos nove genes já clonados (Tabela 12), destacam-se ainda os genes *Pi1* (cromossomo 11 (MEW et al., 1994), *Pi39* (cromossomo 12 (LIU et al., 2007) e *Pi40* (cromossomo 6

(JEUNG et al., 2007), também em vias de serem isolados. Os genes de resistência estão distribuídos em todos os cromossomos de arroz, porém tendem a se agrupar em alguns em particular (SUDUPAK et al., 1993; WEI et al., 1999). As regiões genômicas com maior densidade de genes de resistência à brusone foram identificadas nos cromossomos 6, 11 e 12 (YU et al., 1996; LIU et al., 2002; BALLINI et al., 2008). Em cada agrupamento, em geral, são encontrados de cinco a oito locos de resistência.

**Tabela 12.** Locos microssatélites associados a resistência ao isolado *M. grisea* P33, com base em valores estimados de  $\chi^2$  (com correção de Yates), de testes exatos de Fisher e regressão linear simples.

Loco	Cromossomo	Posição (cM)	valor $\chi^2$ (valor p)	Fisher P-exato	R <sup>2</sup> (%)
RM7441	7	80,5	6,732 (0,0095)	0,0070	4,15*
RM505	7	84,6	12,350 (0,0004)	0,0003	6,45**
RM234	7	87,8	10,971 (0,0009)	0,0007	5,49*
RM7285	8	57,7	9,580 (0,002)	0,0012	6,62*
RM3153	8	59,9	6,192 (0,0128)	0,0083	7,99**

\*significativo a 5%; \*\*significativo a 1%

Poucos são os genes de resistência mapeados até agora no cromossomo 7. Um estudo envolvendo linhagens puras recombinantes derivadas do cruzamento entre as variedades Minghui 63 e Zhenshan 97 identificou vários QTLs associados ao controle de resistência a diferentes isolados do patógeno na China (CHEN et al., 2003). Um dos QTLs identificados, denominado *rbr7b*, está significativamente associado ao intervalo entre os marcadores RM234-R1789 no cromossomo 7. É interessante notar que esta parece ser a mesma região fortemente ligada ao loco *Pi-Ch1*, identificada no presente trabalho, na região do marcador RM234. É possível, portanto, que o loco *Pi-Ch1* seja alélico a *rbr7b*. Mas como se trata de uma família gênica, também é possível que a região identificada represente um agrupamento de genes de resistência à brusone ainda pouco explorado pelos programas de melhoramento genético. Até que testes de alelismo específicos sejam realizados, os estudos do loco *Pi-Ch1* devem continuar com o uso da nomenclatura adotada para facilitar a referência ao loco em questão.

No cromossomo 8, da mesma forma, há referência a alguns locos de resistência mapeados em diferentes trabalhos (BERRUYER et al., 2003; CHEN et al., 2003; LIU et al., 2005), mas, invariavelmente, não há coincidência com os marcadores microssatélites utilizados no presente estudo. No entanto, um estudo com populações F<sub>2</sub>/F<sub>3</sub> do cruzamento entre as cultivares Danghang-Shali, com baixo nível de resistência parcial, e Hokkai 188, uma variedade com resistência durável à brusone, cultivada na China (NGUYEN et al., 2006), identificou uma região no cromossomo 8 que explica 13,4% da variação fenotípica para resistência à brusone. Na região do QTL encontra-se o marcador RM3153, que no presente estudo está significativamente associado ao loco de resistência *Pi-Ch2*. Conforme discutido anteriormente, testes de alelismo podem esclarecer se os locos de resistência à brusone mapeados naquele estudo e no presente trabalho são os mesmos.

## Conclusões

1. A avaliação da interação entre isolados de *Magnaporthe grisea* coletados na região do Brasil Central e genitores de população de linhagens puras recombinantes de arroz (*RILs* – *Recombinant Inbred Lines*), possibilitou a seleção do isolado P33, raça fisiológica ID-10, apresentando reação de incompatibilidade (resistência) com a variedade *japonica* tropical Chorinho, e de compatibilidade (susceptibilidade) com a variedade *japonica* temperada Amaro.
2. A análise de polimorfismo de DNA em 124 locos microssatélites distribuídos pelo genoma de arroz permitiu a construção de um mapa genético com 1240 cM e distância de recombinação média entre marcadores de 10,0 cM.
3. A fenotipagem de uma subamostra das RILs contendo 107 linhagens e testes de ligação com os 124 locos microssatélites genotipados possibilitou a identificação de três locos no cromossomo 7 (RM7441, RM505 e RM234) e dois locos no cromossomo 8 (RM7285 e RM3153) significativamente associados ao controle de resistência ao isolado *M. grisea* P-33. O loco mapeado no cromossomo 7 foi provisoriamente denominado *Pi-Ch1* e o mapeado no cromossomo 8, *Pi-Ch2*.
4. Os alelos de resistência ao patógeno nas duas regiões genômicas foram doados pela variedade tradicional de arroz Chorinho.
5. Poucos relatos identificam genes de resistência à brusone nos cromossomos 7 e 8 de arroz.
6. Testes genéticos poderão identificar se os locos *Pi-Ch1* e *Pi-Ch2* são alélicos ou não aos outros genes recentemente relatados.

#### 4) Obtenção, avaliação da resistência à brusone em condições controladas e das características agrônômicas no campo

##### Introdução

O desenvolvimento de cultivares de arroz de porte mais baixo, responsivas à fertilização e adequados à mecanização agrícola, eliminou o risco de falta de alimentos e a perspectiva de epidemias de fome nos países asiáticos na década de 1950. O melhoramento genético de arroz, ao adotar variedades com um novo ideótipo, promoveu um cenário de aumento de produtividade e de produção de grãos em várias partes do mundo, caracterizando a chamada Revolução Verde nos anos que se seguiram. A Revolução Verde baseou-se na mudança de arquitetura da planta de arroz, condicionada pelo gene *sd-1* (cromossomo 1), bem como do modo de produção da cultura. Os benefícios desta mudança são incontestáveis. O incremento de produção que se seguiu à Revolução Verde foi significativo, dissipando as perspectivas de epidemia de fome aventadas anteriormente.

Deve ser observado, no entanto, que este esforço contribuiu também para a perda de diversidade genética das cultivares modernas de arroz. A adoção de cultivares de arroz desenvolvidas na Revolução Verde ocorreu em nível mundial, substituindo rapidamente as variedades tradicionais de arroz plantadas em diferentes países por novas cultivares, plantadas agora em larga escala, reduzindo drasticamente a base genética dos programas de melhoramento, assim como a diversidade genética do arroz cultivado. Esta diminuição da diversidade predispõe hoje a cultura do arroz a uma maior vulnerabilidade genética, a ataques de patógenos e pragas, como o promovido pelo agente causal da brusone do arroz.

Nos últimos 30 anos, a adoção das cultivares modernas de arroz irrigado proporcionou um aumento anual na produção de 2,4% e elevou a produtividade em 71% (KHUSH; VIRK, 2002). Embora neste mesmo período tenha aumentado o uso de variedades tradicionais no melhoramento (HOSSAIN et al., 2003), a maioria das cultivares modernas mais plantadas possui a mesma base genética, o que tem contribuído para a instabilidade da resistência a várias doenças e aumentado o risco da ocorrência de epidemias. Rangel et al. (1996) verificaram que somente dez ancestrais contribuem com 68% do conjunto gênico das cultivares de arroz irrigado do Brasil. Resultado semelhante foi obtido, posteriormente por Breseghello et al. (1999). Uma das alternativas para o manejo sustentável das cultivares modernas de arroz seria a exploração da heterogeneidade genética em locos gênicos específicos, como locos de resistência a doenças, enquanto o restante do genoma é mantido homogêneo, utilizando multilinhas e mistura de cultivares contendo diferentes genes de resistência.

Multilinha é uma mistura de linhagens genotipicamente idênticas (linhagens quase isogênicas), mas que diferem uma da outra somente quanto ao gene de resistência a uma determinada raça de um patógeno que elas carregam (BROWNING; FREY, 1981). O uso de multilinhas em arroz tem sido proposto no Japão para evitar a quebra da resistência à brusone (KOIZUMI, 2001).

Mistura de cultivares refere-se ao plantio na mesma área de duas ou mais cultivares comerciais compatíveis agrônomicamente, sem a realização de nenhum esforço de melhoramento para torná-las fenotipicamente uniformes (MUNDT, 2002). A mistura de cultivares pode ser implementada tanto em pequenas áreas em nível de agricultura familiar, como em grandes áreas na agricultura empresarial. Trabalho de pesquisa realizado na China por Zhu et al. (2000), envolvendo pesquisadores, agricultores e extensionistas, demonstrou que o uso de mistura de cultivares pode reduzir drasticamente a ocorrência de doenças em grandes áreas de cultivo. O experimento foi conduzido em propriedades de agricultores abrangendo uma área de 812 hectares, no ano de 1998 e de 3.342 hectares, em 1999. Os tratamentos consistiram do plantio em monocultura de uma variedade glutinosa suscetível à brusone, de um híbrido resistente ao patógeno e de uma mistura da variedade com o híbrido, na proporção de quatro sulcos do híbrido para um sulco da variedade. Na mistura, a variedade suscetível produziu 89% a mais com uma redução de 94% na incidência de brusone do que na monocultura. Não foi feita nenhuma aplicação de fungicida durante a condução do ensaio.

Os resultados obtidos neste tipo de experimento demonstram que a diversificação intraespecífica da cultura pode ser um caminho ecologicamente correto para o controle da brusone e deve ser altamente efetivo em



grandes áreas de plantio contribuindo para a sustentabilidade das lavouras de arroz. No Estado do Tocantins, as cultivares Panamá 1048 e Metica 1 apresentaram uma menor incidência de brusone quando o plantio das áreas comerciais foi realizado com sementes do próprio agricultor. Isto provavelmente ocorreu devido à heterogeneidade das cultivares ocasionada pela mistura de sementes em decorrência dos vários anos de cultivo utilizando a mesma semente sem nenhuma renovação.

Vários são os mecanismos que podem estar contribuindo para a redução da intensidade de doenças na mistura de cultivares (ZHU et al., 2000; MUNDT, 2002), incluindo:

- a) Efeito de diluição – a doença é reduzida na mistura de cultivares devido ao aumento da distância entre as plantas da cultivar suscetível na mistura. A presença da cultivar resistente diminui a probabilidade do inóculo produzido na cultivar suscetível atingir outras plantas suscetíveis, reduzindo a taxa de aumento da epidemia.
- b) Efeito de barreira – a cultivar resistente forma uma barreira física que restringe o movimento do inóculo para a cultivar suscetível. Quando a mistura é formada por cultivares suscetíveis a diferentes raças do patógeno, plantas da cultivar A servem de barreira para a raça que ataca a cultivar B, e vice-versa.
- c) Resistência induzida – isto ocorre quando raças não virulentas para uma cultivar estimulam os mecanismos de defesa das plantas e, como consequência, a planta é protegida da infecção por uma raça virulenta que invade a mesma planta e não causa infecção.
- d) Competição entre raças do patógeno - espera-se que a diversidade de genótipos do patógeno seja mais alta na mistura de cultivares do que na monocultura, aumentando as chances de interação e competição entre raças do patógeno, limitando a dominância de certas raças virulentas e reduzindo a taxa de aumento da doença nas misturas.

Um importante pré-requisito para o uso de misturas é a diversidade de funções das cultivares a serem incluídas, tais como, resistência às raças do patógeno prevalentes na área à qual ela se destina, potencial de produtividade e outras características agrônômicas (CASTILLA et al., 2003) que, no caso do arroz irrigado, incluiriam ciclo, altura, arquitetura de planta, qualidade industrial e culinária dos grãos. Embora a redução da incidência de doenças na mistura proporcione um aumento na produtividade de grãos, o ideal seria que os seus componentes apresentassem o mesmo potencial produtivo para que houvesse uma maximização da produtividade de grãos na lavoura.

A integridade das misturas de linhagens quase-isogênicas e de cultivares deve ser monitorada ao longo dos anos, visto que o uso de sementes colhidas de um cultivo para outro pode levar a mudanças na composição da mistura devido ao aumento da capacidade competitiva de um dos componentes, ocasionada, por exemplo, pela ocorrência de doenças, ou simplesmente por efeito de deriva genética. Portanto, a composição das proporções originais das multilinhas e das cultivares compostas após um determinado período de cultivo deve ser monitorada. Além disso, a detecção de novas raças do patógeno na região torna necessária a substituição de um ou mais componentes da mistura por outros que apresentem resistência a estas raças.

## **Materiais e Métodos**

### **Obtenção das linhagens resistentes à brusone**

As linhagens resistentes foram obtidas através de um programa de retrocruzamento desenvolvido na Embrapa Arroz e Feijão, utilizando como genitores recorrentes as cultivares BRS Formoso e Diamante e a linhagem CNA 8502, e como genitores recorrentes as fontes de resistência à brusone, Oryzica 1, Oryzica Llanos 4, Oryzica Llanos 5, CNAi 9022, CNAi 9025 e 5287.

No desenvolvimento das linhagens RC<sub>3</sub>, as sementes dos retrocruzamentos foram plantadas em bandejas, em casa de vegetação, e inoculadas com folhas infectadas por brusone coletadas em lavouras comerciais de arroz irrigado de Goiás e Tocantins (Fig. 14). Trinta dias após a inoculação, as plantas resistentes foram selecionadas e transplantadas para o campo. Na floração, as plantas fenotipicamente semelhantes aos

respectivos genitores recorrentes foram retrocruzadas. A estrutura de família dentro de cada população de retrocruzamento foi observada e, desta forma, a progênie de cada planta resistente retrocruzada foi mantida individualizada em cada geração. Este procedimento, apesar de trabalhoso, permitiu que as famílias resistentes fossem identificadas mais facilmente ao longo do programa. Foram obtidas 26 linhagens resistentes (Tabela 13 e Fig. 15) sendo, 13 oriundas da cultivar BRS Formoso, duas da Diamante e 11 da CNA 8502. As Figuras 14 e 15 mostram alguns detalhes da obtenção das linhagens resistentes à brusone.

**Tabela 13.** Identificação, genealogia e cruzamento das linhagens resistentes à brusone obtidas.

Identificação	Genealogia	Cruzamento
CNA10889	CNAx 10819RC3-7-1-1-B	BRS Formoso/CNAi 9022////BRS Formoso
CNA10891	CNAx 10823RC3-11-2-1-B	BRS Formoso/CNAi 9022////BRS Formoso
CNA10893	CNAx 10845RC3-33-1-2-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4////BRS Formoso
CNA10894	CNAx 10871RC3-2-2-1-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4////BRS Formoso
CNA10895	CNAx 10871RC3-2-2-2-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4////BRS Formoso
CNA10896	CNAx 10874RC3-5-2-1-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4////BRS Formoso
CNA10897	CNAx 10888RC3-6-2-1-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5////BRS Formoso
CNA10898	CNAx 10892RC3-10-2-2	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5////BRS Formoso
CNA10899	CNAx 10892RC3-10-2-3-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5////BRS Formoso
CNA10901	CNAx 10895RC3-13-1-3-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5////BRS Formoso
CNA10902	CNAx 10904RC3-9-1-2-B	BRS Formoso/Oryzica 1////BRS Formoso
CNA10903	CNAx 10913RC3-6-2-1-B	BRS Formoso/5287////BRS Formoso
CNA10904	CNAx 10914RC3-7-1-2-B	BRS Formoso/5287////BRS Formoso
CNA10905	CNAx 11039RC3-2-2-1-B	Diamante/Oryzica Llanos 4////Diamante
CNA10906	CNAx 11078RC3-12-4-1-B	Diamante/5287////Diamante
CNA10910	CNAx 11086RC3-4-3-3-B	CNA 8502/CNAi 9022////CNA 8502
CNA10911	CNAx 11086RC3-4-5-1-B	CNA 8502/CNAi 9022////CNA 8502
CNA10913	CNAx 11098RC3-16-4-2-B	CNA 8502/CNAi 9022////CNA 8502
CNA10914	CNAx 11107RC3-6-3-1-B	CNA 8502/CNAi 9029////CNA 8502
CNA10916	CNAx 11107RC3-6-3-3-B	CNA 8502/CNAi 9029////CNA 8502
CNA10918	CNAx 11119RC3-1-2-2-B	CNA 8502/Oryzica Llanos 4////CNA 8502
CNA10921	CNAx 11120RC3-2-2-1-B	CNA 8502/Oryzica Llanos 4////CNA 8502
CNA10923	CNAx 11127RC3-2-2-2-B	CNA 8502/Oryzica Llanos 5////CNA 8502
CNA10924	CNAx 11133RC3-8-4-2-B	CNA 8502/Oryzica Llanos 5////CNA 8502
CNA10926	CNAx 11137RC3-3-2-1	CNA 8502/Oryzica 1////CNA 8502
CNA10927	CNAx 11159RC3-11-1-2-B	CNA 8502/5287////CNA 8502



**Fig. 14.** Linhagens resistentes e suscetíveis à brusone com inoculação em bandejas.



**Fig. 15.** Linhagem resistente à brusone.

#### **Avaliação de virulência de raças de *M. grisea* em condições de laboratório<sup>4</sup>**

Foram inoculadas 35 linhagens e cultivares de arroz (Tabela 14) sendo, 26 linhagens resistentes, quatro testemunhas (Diamante, CNA 8502, BRS Formoso e Metica 1) e cinco fontes de resistência à brusone (CNAi 9022, Oryzica Llanos 5, Oryzica Llanos 4, Oryzica 1 e 5287), com as dez raças mais prevalentes de *Magnaphorte grisea* em lavouras comerciais e áreas experimentais dos municípios de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré, no Estado do Tocantins, Luís Alves no Estado de Goiás e Paragominas no Pará. As raças utilizadas foram: IA-1, IC-1, ID-1, IA-65, ID-9, IB-1, IA-33, IA-41, IA-9 e IB-41 (DIAS NETO et al., 2008).

<sup>4</sup> Parte da Dissertação apresentada pela estudante LIAMAR MARIA DOS ANJOS SILVA ao Mestrado em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Tocantins, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal – Área de Concentração em Fitopatologia, 2008.

**Tabela 14.** Linhagens de arroz irrigado avaliadas quanto à resistência à brusone em condições controladas, em Gurupi-TO, na safra 2007/2008.

	Tratamentos	Cruzamento
1	Diamante	Testemunha
2	CNA 8502	Testemunha
3	BRS Formoso	Testemunha
4	Metica 1	Testemunha
5	CNA10889	BRS Formoso/CNAi 9022/BRS Formoso
6	CNA10891	BRS Formoso/CNAi 9022/BRS Formoso
7	CNA10893	BRS Formoso/CNAi 9022/BRS Formoso
8	CNA10894	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4/BRS Formoso
9	CNA10895	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4/BRS Formoso
10	CNA10896	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4/BRS Formoso
11	CNA10897	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5/BRS Formoso
12	CNA10898	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5/BRS Formoso
13	CNA10899	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5/BRS Formoso
14	CNA10901	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5/BRS Formoso
15	CNA10902	BRS Formoso/Oryzica 1/BRS Formoso
16	CNA10903	BRS Formoso/5287/BRS Formoso
17	CNA10904	BRS Formoso/5287/BRS Formoso
18	CNA10905	Diamante/Oryzica Llanos 4/Diamante
19	CNA10906	Diamante/5287/Diamante
20	CNA10910	CNA8502/CNAi 9022/CNA8502
21	CNA10911	CNA8502/CNAi 9022/CNA8502
22	CNA10913	CNA8502/CNAi 9022/CNA8502
23	CNA10914	CNA8502/CNAi 9029/CNA8502
24	CNA10916	CNA8502/CNAi 9029/CNA8502
25	CNA10918	CNA8502/Oryzica Llanos 4/CNA8502
26	CNA10921	CNA8502/Oryzica Llanos 4/CNA8502
27	CNA10923	CNA8502/Oryzica Llanos 5/CNA8502
28	CNA10924	CNA8502/Oryzica Llanos 5/CNA8502
29	CNA10926	CNA8502/Oryzica 1/CNA8502
30	CNA10927	CNA8502/5287/CNA8502
31	CNAi 9022	Fonte resistência à brusone
32	Oryzica Llanos 5	Fonte resistência à brusone
33	Oryzica Llanos 4	Fonte resistência à brusone
34	Oryzica 1	Fonte resistência à brusone
35	5287	Fonte resistência à brusone

**Plantio** - As linhagens foram semeadas em bandejas plásticas medindo 40x25x7 cm, com 3,5 litros de substrato comercial "Plantimax" autoclavado. Utilizaram-se 12 sementes de cada variedade por sulco e oito linhagens por bandeja, com quatro repetições. As plântulas cresceram em casa de vegetação climatizada com temperatura controlada para 26°C. Uma adubação de cobertura foi realizada aos 15 dias após a emergência, utilizando-se 3 g de uréia por bandeja, com a finalidade de predispor as plantas ao ataque de *M. grisea*.

**Obtenção dos isolados monospóricos** - Iniciou-se, no laboratório, o preparo dos isolados monospóricos, onde as dez raças mais prevalentes foram repicadas em câmara de fluxo laminar com auxílio de uma lupa sob condições assépticas e transferidas para o meio de cultura BDA. Cada placa contendo um isolado monospórico foi identificada, vedada e armazenada em incubadora tipo B.O.D. com temperatura ajustada para 25°C para crescimento do fungo, por um período de 12 dias.

**Esporulação e preparo do inóculo** - Após o crescimento, o micélio superficial do isolado foi raspado com alça de platina estéril sob condições assépticas, as placas foram destampadas, cobertas com pano crepe e colocadas sob luz fluorescente contínua por 48 horas para a esporulação do fungo. Após a esporulação, o inóculo foi preparado através de uma lavagem com água estéril e auxílio de um pincel macio, seguida da filtragem dos conídios em gaze. A suspensão conidial foi quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de  $3 \times 10^5$  conídios/ml. Para manutenção por longo prazo, essas raças foram repicadas e desidratadas em papel de filtro a 30°C por 24 horas, sob condições assépticas e congeladas em placas de petri a -4°C.

**Inoculação e avaliação** - As plantas foram inoculadas aos 25 dias após a emergência, com 20 ml do inóculo por bandeja, utilizando-se um pulverizador manual e mantidas em câmara úmida com ausência total de luz por 24 horas, com temperatura média de 25°C e umidade relativa acima de 95% proporcionada por umidificador, com objetivo de induzir e manter o molhamento ou orvalho nas folhas durante o processo de germinação e infecção do patógeno. As avaliações de severidade nas folhas foram feitas sete dias após a inoculação, por

meio da análise visual do fenótipo da interação patógeno-hospedeiro, com base nas reações dos genótipos, utilizando a escala de 0 a 9 proposta por Leung et al. (1988) e modificada, sendo adicionado a nota 4 conforme sugerido por Prabhu e Filippi, (2006). A reação nas plantas foi considerada resistente quando recebeu notas de severidade menor ou igual a 3 e suscetível quando a nota foi igual ou superior a 4. Para essas avaliações, as plantas não foram consideradas individualmente e sim como população, assim sendo, cada genótipo foi considerado suscetível ao apresentar mais de 50% das plantas com lesões em cada inoculação.

### Avaliação das características agrônômica das linhagens resistentes à brusone em condições de campo

As 26 linhagens resistentes mais quatro testemunhas (Tabela 15) foram avaliadas nos Ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) nos anos agrícolas 2006/07, 2007/08 e 2008/09. O delineamento experimental utilizado foi os blocos ao acaso, com quatro repetições e a parcela foi formada por oito linhas de 5,0 metros de comprimento. A área útil da parcela foi constituída pelas quatro linhas centrais de 4,0 metros de comprimento. Em 2006/07 o ensaio foi conduzido nos municípios de Goianira e Flores de Goiás, em Goiás e em Formoso do Araguaia (Campo Experimental da Embrapa Arroz e Feijão e Unitins Agro) e Lagoa da Confusão (Fazenda San Francisco), no Tocantins. Em 2007/08 e 2008/09 os ensaios de VCU foram conduzidos nos mesmos locais de 2006/07 menos em Flores de Goiás.

**Tabela 15.** Genealogia e cruzamento das linhagens/cultivares avaliadas nos ensaios de Valor de Cultivo e Uso, conduzidos nos anos agrícolas 2006/07, 2007/08 e 2008/09, em vários locais dos Estados de Goiás e Tocantins.

Trat.	Linhagem	Genealogia	Cruzamento
1	Diamante		TESTEMUNHA
2	CNA 8502		TESTEMUNHA
3	BRS Formoso		TESTEMUNHA
4	Metica 1		TESTEMUNHA
5	CNA10889	CNAx 10819RC3-7-1-1-B	BRS Formoso/CNAi 9022////BRS Formoso
6	CNA10891	CNAx 10823RC3-11-2-1-B	BRS Formoso/CNAi 9022////BRS Formoso
7	CNA10893	CNAx 10845RC3-33-1-2-B	BRS Formoso/CNAi 9022////BRS Formoso
8	CNA10894	CNAx 10871RC3-2-2-1-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4////BRS Formoso
9	CNA10895	CNAx 10871RC3-2-2-2-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4////BRS Formoso
10	CNA10896	CNAx 10874RC3-5-2-1-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 4////BRS Formoso
11	CNA10897	CNAx 10888RC3-6-2-1-B	BRS Formoso/Oryzica Llanos 5////FORMOSO
12	CNA10898	CNAx 10892RC3-10-2-2	FORMOSO/ORYZICA LIANOS 5////FORMOSO
13	CNA10899	CNAx 10892RC3-10-2-3-B	FORMOSO/ORYZICA LIANOS 5////FORMOSO
14	CNA10901	CNAx 10895RC3-13-1-3-B	FORMOSO/ORYZICA LIANOS 5////FORMOSO
15	CNA10902	CNAx 10904RC3-9-1-2-B	FORMOSO/ORYZICA 1////FORMOSO
16	CNA10903	CNAx 10913RC3-6-2-1-B	FORMOSO/5287////FORMOSO
17	CNA10904	CNAx 10914RC3-7-1-2-B	FORMOSO/5287////FORMOSO
18	CNA10905	CNAx 11039RC3-2-2-1-B	DIAMANTE/ORYZICA LIANOS 4////DIAMANTE
19	CNA10906	CNAx 11078RC3-12-4-1-B	DIAMANTE/5287////DIAMANTE
20	CNA10910	CNAx 11086RC3-4-3-3-B	CNA 8502/CNAi 9022////CNA 8502
21	CNA10911	CNAx 11086RC3-4-5-1-B	CNA 8502/CNAi 9022////CNA 8502
22	CNA10913	CNAx 11098RC3-16-4-2-B	CNA 8502/CNAi 9022////CNA 8502
23	CNA10914	CNAx 11107RC3-6-3-1-B	CNA 8502/CNAi 9029////CNA 8502
24	CNA10916	CNAx 11107RC3-6-3-3-B	CNA 8502/CNAi 9029////CNA 8502
25	CNA10918	CNAx 11119RC3-1-2-2-B	CNA 8502/ORYZICA LIANOS 4////CNA 8502
26	CNA10921	CNAx 11120RC3-2-2-1-B	CNA 8502/ORYZICA LIANOS 4////CNA 8502
27	CNA10923	CNAx 11127RC3-2-2-2-B	CNA 8502/ORYZICA LIANOS 5////CNA 8502
28	CNA10924	CNAx 11133RC3-8-4-2-B	CNA 8502/ORYZICA LIANOS 5////CNA 8502
29	CNA10926	CNAx 11137RC3-3-2-1	CNA 8502/ORYZICA 1////CNA 8502
30	CNA10927	CNAx 11159RC3-11-1-2-B	CNA 8502/5287////CNA 8502

Foram coletados dados das seguintes características: produtividade de grãos; floração média; altura de planta; acamamento; incidência de doenças principalmente brusone; rendimento de grãos inteiros e total; teor de amilose; temperatura de gelatinização; notas de comprimento e largura dos grãos e centro branco.

Foram realizadas as análises de variância individuais e conjuntas para a característica produtividade de grão em kg ha<sup>-1</sup> utilizando o programa Genes (CRUZ, 1997). Devido o ciclo muito longo, a linhagem CNA10896 foi eliminada das análises.

## Resultados e Discussão

### Avaliação das linhagens quanto à virulência de raças de *M. grisea* em condições controladas

A partir da inoculação das dez raças mais prevalentes, observou-se que existiram diferentes reações das raças nas linhagens/cultivares avaliadas (Tabela 16). Apenas as cultivares Oryzica Llanos 4 e Oryzica 1 foram

resistentes a todas as raças inoculadas. A *Oryzica Llanos 5* considerada como fonte de resistência durável à brusone na Colômbia, foi suscetível às raças IA-1, IC-1, IA-41 e IA-9, todas prevalentes em lavouras de arroz irrigado no Estado do Tocantins. A 5287, também considerada fonte de resistência à brusone, foi suscetível a oito das dez raças inoculadas (Tabela 16).

**Tabela 16.** Análise de virulência de raças de *M. grisea* em linhagens de arroz irrigado, família RC3, através de análise visual do fenótipo da interação patógeno-hospedeiro com base nas reações utilizando a escala de 0 a 9, em Gurupi, Tocantins, ano 2008.

Tratamento	Cruzamento	Raças fisiológicas de <i>M. grisea</i>									
		IA-1	IC-1	ID-1	IA-65	ID-9	IB-1	IA-33	IA-41	IA-9	IB-41
Diamante	Testemunha	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R
CNA 8502	Testemunha	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
Formoso	Testemunha	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
Metica 1	Testemunha	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
CNA10889	Formoso/CNAi 9022/Formoso	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R
CNA 10891	Formoso/CNAi 9022/Formoso	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R
CNA 10893	Formoso/CNAi 9022/Formoso	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R
CNA 10894	Formoso/Oryzica L-4/Formoso	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R
CNA 10895	Formoso/Oryzica L-4/Formoso	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R
CNA 10896	Formoso/Oryzica L-4/Formoso	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R
CNA 10897	Formoso/Oryzica L-5/Formoso	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R
CNA 10898	Formoso/Oryzica L-5/Formoso	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R
CNA 10899	Formoso/Oryzica L-5/Formoso	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
CNA 10901	Formoso/Oryzica L-5/Formoso	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
CNA 10902	Formoso/Oryzica 1/Formoso	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
CNA 10903	Formoso/5287/Formoso	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
CNA 10904	Formoso/5287/Formoso	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
CNA 10905	Diamante/Oryzica L-4/Diamante	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R
CNA 10906	Diamante/5287/Diamante	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R
CNA 10910	CNA8502/CNAi 9022/CNA8502	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
CNA 10911	CNA8502/CNAi 9022/CNA8502	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
CNA 10913	CNA8502/CNAi 9022/CNA8502	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S
CNA 10914	CNA8502/CNAi 9029/CNA8502	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
CNA 10916	CNA8502/CNAi 9029/CNA8502	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
CNA 10918	CNA8502/Oryzica L-4/CNA8502	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
CNA 10921	CNA8502/Oryzica L-4/CNA8502	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
CNA 10923	CNA8502/Oryzica L-5/CNA8502	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
CNA 10924	CNA8502/Oryzica L-5/CNA8502	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
CNA 10926	CNA8502/Oryzica 1/CNA8502	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R
CNA 10927	CNA8502/5287/CNA8502	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CNAi 9022	Fonte resistência à brusone	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R
Oryzica Llanos 5	Fonte resistência à brusone	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R
Oryzica Llanos 4	Fonte resistência à brusone	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Oryzica 1	Fonte resistência à brusone	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5287	Fonte resistência à brusone	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R

R = Genótipo de arroz que obteve nota de severidade de 0 a 3.

S = Genótipo de arroz que obteve nota de severidade de 4 a 9.

Fonte: Leung et al. (1988).

A BRS Formoso e Metica 1, apresentaram reação de resistência apenas às raças ID-9 e IB-41. Estas cultivares, amplamente plantadas em condições de arroz irrigado nos Estados de Goiás e Tocantins, foram substituídas das lavouras, devido à quebra da resistência à brusone. A Diamante, amplamente cultivada na região Nordeste do Brasil, mostrou-se suscetível a cinco raças, IA-1, ID-9, IB-1, IA-41 e IA-9. A CNA 8502 é uma linhagem elite desenvolvida pelo programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão e apresenta alta produtividade de grãos e elevada resistência a mancha dos grãos, mostrou-se resistente às raças IA-1, ID-1, IA-65, IA-33 e IA-41.

Das linhagens avaliadas, a CNA10901, CNA10902 e CNA10903 oriundas da cultivar BRS Formoso, apresentaram suscetibilidade apenas à raça IC-1, comportando-se como as mais resistentes à brusone na folha. Das outras linhagens oriundas da BRS Formoso, a CNA10889, CNA10891 e CNA10896 apresentaram resistência a raça IC-1. Isto permitirá com apenas dois componentes formar uma multilinha que proporcionará resistência as 10 raças prevalentes de *M. grisea*.



A maioria das linhagens oriundas da CNA 8502 no ano agrícola 2008/09 no Campo Experimental da Fazenda Palmital, Goianira, GO, apresentou-se suscetível à brusone na panícula, com notas de 5 a 9, inviabilizando o seu uso na formação de multilinhas (Tabela 17).

As duas linhagens oriundas da cultivar Diamante (CNA10905 e CNA10906) apresentaram comportamento semelhantes quanto às características agrônômicas e padrão de resistência às raças prevalentes de brusone (Tabela 17).

### **Constituição das multilinhas utilizando linhagens $RC_3F_5$**

Baseando-se nos resultados da caracterização agrônômica no campo e a reação às raças prevalentes de brusone obtidas em condições controladas, ênfase será dada na formação de multilinhas com linhagens oriundas da cultivar BRS Formoso. Utilizando as linhagens CNA10901, CNA10902 e CNA10903 com a CNA10891, poderiam-se formar três multilinhas com dois componentes cada, que proporcionariam resistência às dez raças de brusone prevalentes nas lavouras de arroz irrigado de Goiás e Tocantins. São elas: CNA10901 + CNA10891; CNA10902 + CNA10891; CNA10901 + CNA10891 (Tabela 17). Além destas pode-se também formar uma multilinha com as linhagens CNA10905 + CNA10906 oriundas da cultivar Diamante (Tabela 18).

## **5) Introgessão assistida de genes de resistência à brusone para obtenção de linhagens quase-isogênicas de arroz**

### **Introdução**

O objetivo dessa fase do projeto foi a obtenção de linhagens quase-isogênicas de arroz resistentes a isolados de brusone detectados no Brasil Central, especificamente na região de Formoso do Araguaia, Estado do Tocantins. Para cada cultivar de arroz selecionada foram obtidas diversas linhagens quase-isogênicas, com genes introgredidos de diferentes fontes de resistência. As fontes de resistência à brusone foram selecionadas com base em relatos na literatura e comprovada interação de resistência com isolados de brusone em programas de melhoramento genético de diferentes países.

### **Materiais e Métodos**

Entre as 27 famílias de linhagens quase-isogênicas ( $RC_3F_5$ ), foram selecionadas as dez linhagens mais promissoras com base na análise de características agrônômicas em ensaios de campo. As sementes  $RC_3F_5$  das dez linhagens mais promissoras foram plantadas em maio de 2008 no Campo Experimental de Formoso do Araguaia, Estado do Tocantins, e selecionados 100 plantas de cada uma, que foram posteriormente germinadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e genotipadas com uma bateria de 17 marcadores microssatélites distribuídos nos cromossomos de arroz, totalizando 17.000 genótipos analisados. Os marcadores microssatélites utilizados na genotipagem foram: RM116, RM171, RM222, RM235, RM481, RM6810, RM22, RM201, RM307, RM408, RM422, RM1164, RM190, OG10, RM300, RM7200 e RM447.

### **Resultados e Discussão**

Em cada uma das dez famílias foram selecionadas de três a dez plantas com maior grau de conversão para o genoma das cultivares recorrentes de arroz, com base na comparação do genótipo multiloco observado em cada planta e o genótipo observado em cada parental recorrente (Tabela 19). Dessa forma, as plantas  $RC_3$  resistentes à brusone e geneticamente mais similares às respectivas linhagens parentais recorrentes foram selecionadas. Sementes  $RC_3F_1$  e  $RC_4$  foram então obtidas dessas famílias para o desenvolvimento de linhagens quase-isogênicas e confecção de multilinhas de resistência à brusone do arroz.





**Tabela 19.** Seleção de plantas de famílias RC<sub>3</sub> de arroz para composição de multilinhas de resistência à brusone, com base na análise de 17 locos de marcadores microssatélites.

ETQ	CNA	Linhagem	Cruzamento	Plantas selecionadas (ordem de conversão)	Conversão média de locos polimórficos (top 25%)
TO08002	CNA10891	CNAx 10823RC3-11-2-1-B	FORMOSO/CNAi 9022////FORMOSO	20; 86; 87; 89	92,60%
TO08004	CNA10894	CNAx 10871RC3-2-2-1-B	FORMOSO/ORYZICA LIANOS 4////FORMOSO	72; 80; 16; 78	93,10%
TO08009	CNA10899	CNAx 10892RC3-10-2-3-B	FORMOSO/ORYZICA LIANOS 5////FORMOSO	24; 78; 80; 87	73,60%
TO08010	CNA10901	CNAx 10895RC3-13-1-3-B	FORMOSO/ORYZICA LIANOS 5////FORMOSO	8; 43; 28	48,80%
TO08011	CNA10902	CNAx 10904RC3-9-1-2-B	FORMOSO/ORYZICA 1////FORMOSO	56; 67; 14; 17; 27; 30; 31; 54	82,40%
TO08012	CNA10903	CNAx 10913RC3-6-2-1-B	FORMOSO/5287////FORMOSO	32; 52; 53; 63; 64; 65; 67; 70; 71	98,30%
TO08014	CNA10905	CNAx 11039RC3-2-2-1-B	DIAMANTE/ORYZICA LIANOS 4////DIAMANTE	17; 19; 24; 43; 20	88,30%
TO08015	CNA10906	CNAx 11078RC3-12-4-1-B	DIAMANTE/5287////DIAMANTE	28; 39; 41; 43; 61	94,20%
TO08016	CNA10910	CNAx 11086RC3-4-3-3-B	CNA 8502/CNAi 9022////CNA 8502	52; 88; 7; 87	76,60%
TO08024	CNA10924	CNAx 11133RC3-8-4-2-B	CNA 8502/ORYZICA LIANOS 5////CNA 8502	33; 28; 69; 11	77,40%

## Considerações Gerais

Nos últimos 25 anos, novas áreas de produção de arroz irrigado foram instaladas nos Estados de Goiás e Tocantins. A produção de arroz nessas áreas tem sido muito afetada por *Magnaporthe grisea*, o agente causal da brusone. Apesar de o lançamento de novas cultivares de arroz resistentes à brusone para essa região, a quebra de resistência à doença tem sido observada, geralmente, um ou dois anos após o lançamento varietal. O desenvolvimento de estratégias para contornar esse problema é muito importante para a produção de arroz nessa região. Entre as causas de quebra de resistência inclui-se a capacidade do fungo rapidamente desenvolver novos patótipos e estabelecer uma população altamente diversa em raças fisiológicas no campo. O conhecimento da diversidade genética e da prevalência das raças fisiológicas de *M. grisea* nas áreas de produção é, portanto, um passo importante no desenvolvimento de estratégias de melhoramento para a criação de novas cultivares com resistência durável à brusone, incluindo multilinhas de linhagens quase-isogênicas e emprego de genes de resistência de amplo espectro. Com essa finalidade foi desenvolvido o projeto em pauta, que atingiu plenamente os objetivos preconizados, cumprindo todas as metas estabelecidas. Foram realizadas coletas de plantas infectadas por brusone em lavouras comerciais de Goiás, Tocantins e Pará e em armadilhas de brusone, sendo obtidos 534 isolados monospóricos e feita a identificação das raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* desses isolados. Estudou-se a variabilidade genética dos isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea* (Barr.) e fez-se o mapeamento genético de locos de resistência. As 26 linhagens obtidas foram avaliadas para resistência à brusone em condições controladas e características agrônomicas no campo. Baseando-se nos resultados da caracterização agrônômica no campo e a reação às raças prevalentes de brusone obtidas em condições controladas, foram formadas quatro multilinhas, três com linhagens oriundas da cultivar BRS Formoso; CNA10901 + CNA10891; CNA10902 + CNA10891; CNA10901 + CNA10891 e uma com linhagens oriundas da cultivar Diamante, CNA10905 + CNA10906 que deverão ser avaliadas para comprovar a sua eficácia no controle da brusone.

Os dados obtidos pelo projeto revelaram uma abundante diversidade de patótipos na região. Considerando 250 isolados de *M. grisea* coletados nas armadilhas de brusone, 45 raças internacionais do patógeno puderam ser identificadas, classificadas em sete grupos fisiológicos (IA-IG), com uma riqueza de patótipos estimada em 18%. Considerando os dados coletados em 479 isolados de *M. grisea*, foram identificadas 61 raças internacionais pertencentes a todos os grupos de raças fisiológicas, com exceção de uma (IH). Os dez patótipos mais frequentes, concentrando 72% dos isolados testados, foram IA-1, IC-1, ID-1, IA-65, ID-9, IA-33, IB-1, IA-41, IA-9 e IB-33. As novas áreas de arroz irrigado nos Estados de Goiás e Tocantins têm a maior diversidade de patótipos de *M. grisea* detectada até agora no país. Esse é o primeiro relato da ocorrência da maioria dos grupos raciais do patógeno em uma única área no Brasil e durante a mesma estação de plantio. Os resultados indicaram que essas áreas de arroz irrigado são centros de diversidade de patótipos de *M. grisea*. Isso parece explicar a precoce quebra de resistência à brusone nessa região.

## Referências

- ADAMS, D.; KIM, J.; JENSEN, R.; MARCUS, L.; SLICE, D. E.; WALKER, J. **NTSYSpc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.10z. [S.l.]: Applied Biostatistics, 2002. Não paginado.
- AHN, S. W. International collaboration on breeding for resistance to rice blast. In: ZEIGLER, R. S.; LEONG, S. A.; TENG, P. S. (Ed.). **Rice blast disease**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 137-153.
- AMARAL, R. E. M.; SOUZA, D. M. de; MALVOLTA, V. M. A.; ISSA, E. Raças fisiológicas de *Pyricularia oryzae* cav. no Estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 45, n. 11/12, p. 205-208, nov./dez. 1979.
- ATKINS, J. G.; ROBERT, A. L.; ADAIR, C. R.; GOTO, K.; KOZAKA, T.; ANAGITA, R.; YAMADA, M.; MATSUMOTO, S. An international set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 3, p. 297-301, 1967.
- BALLINI, E.; MOREL, J.-B.; DROC, G. T.; PRICE, A.; COURTOIS, B.; NOTTEGHEM, J.-L.; THARREAU, D. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 21, n. 7, p. 859-68, July 2008.
- BEDENDO, I. P. Doenças do arroz. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 85-99.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- BERRUYER, R.; ADREIT, H.; MILAZZO, J.; GAILLARD, S.; BERGER, A.; DIOH, W.; LEBRUN, M. H.; THARREAU, D. Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 107, n. 6, p. 1139-1147, Oct. 2003.
- BOWCOCK, M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, London, v. 368, n. 6470, p. 455-457, Mar. 1994.
- BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P. H. N.; MORAIS, O. P. de. Ganho de produtividade pelo melhoramento genético do arroz irrigado no nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 3, p. 399-407, mar. 1999.
- BRONDANI, C. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites, construção de mapa genético de *Oryza glumelata* x *O. sativa* e análise de QTLs para caracteres de importância agronômica**. 2000. 226 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, Natick, v. 31, n. 4, p. 793-795, Oct. 2001.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; GARRIDO, L. R.; FERREIRA, M. E. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 753-762, 2000.
- BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, n. 6/7, p. 1192-1203, May 2002.

BROWNING, J. A.; FREY, K. J. The multiline concept in theory and practice. In: JENKYN, J. F.; PLUMB, R. T. (Ed.). **Strategies for the control of cereal disease**. Oxford: Blackwell, 1981. p. 37-46.

CASSETARI NETO, D. **Brusone (*Pyricularia grisea* Sacc.) em arroz de sequeiro no estado de Mato Grosso: I: Identificação de raças fisiológicas. II: Influência do nitrogênio, fósforo e potássio na infecção do patógeno**. 1996. 70 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CASTILLA, N. P.; VERA CRUZ, C. M.; MEW, T. W. Using rice cultivar mixtures: a sustainable approach for managing diseases and increasing yield. **International Rice Research Notes**, Los Baños, v. 28, n. 2, p. 5-11, 2003.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. F. Phylogenetic analysis models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 19, n. 3, p. 233-257, 1967.

CHEN, H. L.; CHEN, B. T.; ZHANG, D. P.; XIE, Y. F.; ZHANG, Q. Pathotypes of *Pyricularia grisea* in rice fields of central and southern China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 8, p. 843-850, Aug. 2001.

CHEN, D. H.; ZEIGLER, R.; LEUNG, H.; NELSON, R. J. Population structure of *Magnaporthe grisea* at two screening sites in the Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 9, p. 1011-1020, Sept. 1995.

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; MCCOUCH, S. R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, n. 4, p. 553-567, Sept. 1997.

CHEN, H.; WANG, S. P.; XING, Y. Z.; XU, C. G.; HAYES, P. M.; ZHANG, Q. F. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 5, p. 2544-2549, Mar. 2003.

CHEN, Q. H.; WANG, Y. C.; ZHENG, X. B. Genetic analysis and molecular mapping of the avirulence gene PRE1, a gene for host-species specificity in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 8, p. 873-881, Aug. 2006.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, Austin, v. 138, n. 3, p. 963-971, Nov. 1994.

CONAB. **Arroz – Brasil: série história de área plantada**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/ArrozSerieHist.xls>>. Acesso em: 13 out. 2009.

CORNÉLIO, V. M. de O. **Identificação de raças de *Pyricularia grisea* Saac., no arroz de terras altas em Minas Gerais, incidência e severidade da brusone e tipos de resistência**. 2001. 55 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CORNÉLIO, V. M. O.; SOARES, A. A.; BUENO FILHO, J. S. S.; SOARES, P. C. Identificação de raças fisiológicas de *Pyricularia grisea* em arroz no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1016-1022, 2003.

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, Oct. 1993.

CREGAN, P. B.; BHAGWAT, A. A.; AKKAYA, M. S.; RONGWEN, J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 49-61, 1994.

CRUZ, C. D. GENES: software for experimental statistics in genetics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, p. 135-138, Mar. 1998.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 442 p.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2.1. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: 13 jan. 2005.

DIAS NETO, J. J. **Magnaporthe grisea**: biologia e identificação de patótipos isolados de plantas de arroz na região tropical do Brasil. 2008. 97 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.

DIAS NETO, J. J.; SANTOS, G. R.; SILVA, L. M. A.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E.; CUNHA, A. C. F.; CANJÃO, E. R.; CASTRO NETO, M. D. Identificação de raças fisiológicas de *Pyricularia grisea* em arroz no Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 186, ago. 2008. Suplemento. ref. EPI-053. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.

DOERGE, R. W.; CHURCHILL, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, Austin, v. 142, n. 1, p.285-294, Jan. 1996.

DON, L. D.; KUSABA, M.; URASHIMA, A. S.; TOSA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; MAYAMA, S. Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 65, n. 1, p. 15-24, 1999.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, July 2005.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, Austin, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, Aug. 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates races, IB-1 and IB-9. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 4, p. 599-604, dez. 1996.

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

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S.; LEVY, M. Differential compatibility of *Pyricularia grisea* isolates with some Brazilian irrigated rice cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, n. 3, p. 447-450, set. 1999.

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S.; LEVY, E. M. Espectro de virulência de isolados e linhagens de *Magnaporthe grisea* em arroz. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, p. 398, ago.1996. Suplemento, ref. 383. Edição dos Resumos do XXIX Congresso de Fitopatologia, Campo Grande, MS, ago. 1996.

GARRIDO, L. R. **Identificação, desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipersensíveis do genoma de *Magnaporthe grisea* na análise da estrutura de populações do patógeno infectando populações de arroz (*Oryza sativa*)**. 2001. 188 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

GOLDSTEIN, D. B.; CLARK, A. G. Microsatellite variation in north-american populations of *Drosophila melanogaster*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 19, p. 3882-3886, Oct. 1995.

HAMER, J. E.; FARRALL, L.; ORBACH, M. J.; VALENT, B.; CHUMLEY, F. G. Host species specific conservation of a family of repeated 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, n. 24, p. 9981-9985, Dec. 1989.

- HAN, S. S.; RA, D. S.; NELSON, R. Comparison of RFLP based phylogenetic trees and pathotypes of *Magnaporthe oryzae* in Korea. **Journal of Agricultural Science**, Tokyo, v. 35, n. 1, p. 315-323, 1993.
- HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Marcador microssatélite na conservação do germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 5, n. 29, p. 146-150, 2002.
- HOSSAIN, M.; GOLIN, D.; CABANILLA, V.; CABRERA, E.; JOHNSON, N.; KHUSH, G. S.; MCLAREN, G. Crop genetic improvement in developing countries: overview and summary. In: EVERSON, R. E.; GOLLIN, D. (Ed.). **Crop variety improvement and its effect on productivity: the impact of international agricultural research**. Wallingford: CAB International, 2003. p. 7-38.
- HUMMEL, S.; SCHULTES, T. From skeletons to fingerprints - STR typing of ancient DNA. **Ancient Biomolecules**, Amsterdam, v. 3, p. 103-116, 2000.
- IGARASHI, S.; UTIYAMA, C. M.; IGARASHI, L. C.; KAZUMA, A. H.; LOPES, R. S. *Pyricularia* em trigo, ocorrência de *Pyricularia* sp. no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 11, n. 2, p. 351-352, jun. 1986. Suplemento, ref. 150. Edição dos Resumos do XIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília, DF, jul. 1986.
- JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 135, n. 1, p. 205-211, Sept. 1993.
- JEUNG, J. U.; KIM, B. R.; CHO, Y. C.; HAN, S. S.; MOON, H. P.; LEE, Y. T.; JENA, K. K. A novel gene, Pi40(t), linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 115, n. 8, p. 1163-1177, Nov. 2007.
- KAYE, C.; MILAZZO, J.; ROZENFELD, S.; LEBRUN, M. H.; THARREAU, D. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 40, n. 3, p. 207-214, Dec. 2003.
- KHUSH, G. S.; VIRK, P. S. Rice improvement: past, present and future. In: KANG, M. S. (Ed.). **Crop Improvement: challenges in the twenty-century**. New York: Food Products, 2002. p. 17-42.
- KOIZUMI, S. Rice blast control with multilines in Japan. In: IMPACT SYMPOSIUM ON EXPLOITING BIODIVERSITY FOR SUSTAINABLE PEST MANAGEMENT, 2000, Kunming, China. **Proceedings...** Los Baños: International Rice Research Institute, 2001. p. 143-157.
- LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using rflp linkage maps. **Genetics**, Austin, v. 121, n. 1, p. 185-199, Jan. 1989.
- LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v. 1, n. 2, p. 174-181, 1987.
- LEUNG, H.; BORROMEO, E. S.; BERNARDO, M. A.; NOTTEGHEM, J. L. Genetic-analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 1227-1233, Sep. 1988.
- LEUNG, H.; NELSON, R. J.; LEACH, J. E. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. **Advances in Plant Pathology**, London, v. 10, p. 157-205, 1993.
- LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F. S.; ZEIGLER, R. S.; XU, S.; HAMER, J. E. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1427-1433, Dec. 1993.
- LEVY, M.; ROMÃO, J.; MARCHETTI, M. A.; HAMMER, J. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 1, p. 95-

102, Jan. 1991.

LING, K. C.; OU, S. H. Standardization of international race numbers of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 3, p. 339-342, Mar. 1969.

LIU, G.; LU, G.; ZENG, L.; WANG, G. L. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 267, n. 4, p. 472-480, June 2002.

LIU, K.; MUSE, S. U. PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2118-2129, 2005.

LIU, X. Q.; WANG, L.; CHEN, S.; LIN, F.; PAN, Q. H. Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 274, n. 4, p. 394-401, Nov. 2005.

LIU, X. Q.; YANG, Q. Z.; LIN, F.; HUA, L. X.; WANG, C. T.; WANG, L.; PAN, Q. H. Identification and fine mapping of *Pi39(t)*, a major gene conferring the broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 278, n. 4, p. 403-410, Oct. 2007.

MACIEL, J. L. N.; RODRIGUES, P. C. S.; GOMES, P. A.; MORAES, M. G. Análise da variabilidade genética de duas cultivares de Raminad Str. 3 utilizadas como diferenciadoras de raças de *Pyricularia grisea*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 6, p. 631-637, nov./dez. 2004.

MALAVOLTA, V. M. A.; SOUZA, T. M. W. Variabilidade de *Pyricularia oryzae* no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 18, n. 3/4, p. 287-290, jul./dez. 1992.

MCDONALD, B. A. The populations genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 448-453, Apr. 1997.

MEKWATANAKARN, P.; KOSITRATANA, W.; LEVY, M.; ZEIGLER, R. S. 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, Jan. 2000.

MEW, T. V.; PARCO, A.; HITTALMANI, S.; INUKAI, T.; NELSON, R. J.; ZEIGLER, R. S.; HUANG, N. Fine-mapping of major genes for blast resistance in rice. **Rice Genetics Newsletter**, Mishima, v. 11, p. 126-128, Dec. 1994.

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**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 78, jan./mar. 1998. Suplemento, ref. 135. Edição dos Resumos do XXI Congresso Paulista de Fitopatologia, Botucatu, fev. 1998.

MUNDT, C. C. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 381-410, 2002.

NGUYEN, T. T. T.; KOIZUMI, S.; LA, T. N.; ZENBAYASHI, K. S.; ASHIZAWA, T.; YASUDA, N.; IMAZAKI, I.; MIYASAKA, A. *Pi35(t)*, a new gene conferring partial resistance to leaf blast in the rice cultivar Hokkai 188. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 113, n. 4, p. 697-704, Aug. 2006.

NODA, T.; VAN DU, P.; LAI VAN, E.; HOANG D. D. **Pathogenicity of *Pyricularia grisea* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains in Vietnam**. 1998. Disponível em: < <http://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/highlights/1998/pdf/1998-09.pdf> >. Acesso em: 15 set. 2008.

NUNES, C. D. M.; CARVALHO, F. I. F.; PIEROBOM, C. R.; OLIVEIRA, A. C. Genética da resistência de cultivares de arroz à raça IA-1 de *Pyricularia grisea*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 1, p. 64-69, jan./fev. 2007.

- OU, S. H. Breeding rice for resistance to blast, a critical view. In: RICE BLAST WORKSHOP, Los Baños, Philippines. **Proceedings...** Los Baños: International Rice Research Institute, 1979. p. 81-137.
- OU, S. H. Exploring tropical rice diseases - a reminiscence. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 1-10, 1984.
- 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. **Rice diseases**. 2. ed. Farnham Royal: CAB, 1985. 380 p.
- OU, S. H.; AYAD, M. R. Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesions and monoconidial cultures. **Phytopathology**, St. Paul, v. 58, n. 2, p. 179-182, 1968.
- OU, S. H.; NUQUE, F. L.; EBRON, T. T.; AWODERU, V. Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* derived from monoconidial cultures. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 54, n. 12, p. 1045-1049, Dec. 1970.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorfism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 1, n. 7, p. 211-222, Jul. 1996.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. As raças fisiológicas de *Pyricularia oryzae* virulentas nas cultivares melhoradas de arroz de sequeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 14, n. 2, p. 140, jul. 1989. Suplemento, ref. 168. Edição dos Resumos do XXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, jul. 1989.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Graus de resistência à brusone e produtividade de cultivares melhoradas de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 12, p. 1453-1459, dez. 2001.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. **Brusone em arroz**: controle genético, progresso e perspectivas. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2006. 388 p.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; ARAUJO, L. G.; FARIA, J. C. Genetic and phenotypic characterization of isolates of *Pyricularia grisea* from the rice cultivars Epagri 108 and 109 in the State of Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 6, p. 566-573, nov./dez. 2002.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; CASTRO, N. Variabilidade patogênica entre isolados de *Pyricularia oryzae* provenientes de arroz, trigo e capins. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ, 4., 1990, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1990. p. 39. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 26).
- PRABHU, A. S.; FARIA, J. C.; ZIMMERMANN, F. J. P. Comparative yield loss estimates due to blast in some upland rice cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 14, n. 3, p. 227-232, 1989.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, n. 2, p. 945-959, June 2000.
- RAMOS, L. N. **Estrutura populacional e parâmetros epidemiológicos de isolados de *Magnaporthe grisea* (Barr)**. 2009. 132 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- RANGEL, P. H. N. Desenvolvimento de cultivares de arroz irrigado para o Estado de Tocantins. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 48, n. 424, p. 11-13, nov./dez. 1995.
- RANGEL, P. H. N. **Mapeamento genético e piramidização de genes de resistência no desenvolvimento de multilinhas e cultivares compostas de arroz irrigado com resistência estável à brusone (*Magnaporthe grisea*)**: relatório técnico final de atividades. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 83 p. Projeto de Pesquisa. Convênio CNPq 472444/2006-9. Projeto concluído.
- RANGEL, P. H. N.; GUIMARÃES, E. P.; NEVES, P. C. F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 5, p. 349-357, maio 1996.

- RIBEIRO, A. S. Prevalência de raças de *Pyricularia oryzae* Cav. no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 15, n. 2, p. 175-182, abr. 1980.
- RIBEIRO, A. S.; TERRES, A. L. S. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae* e sua relação com cultivares resistentes à brusone. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 12, n. 4, p. 316-321, dez. 1987.
- ROSENBERG, N. A. Distruct: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 137-138, Mar. 2004.
- RUSSEL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 442-450, Aug. 1997.
- SANTOS, A. B. dos; BIAVA, M. (Ed.). **Sistema de produção: cultivo do arroz irrigado no Estado do Tocantins**. Nov. 2004. (Embrapa Arroz e Feijão. Sistema de Produção, n. 3). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/index.htm>>. Acesso em: 08 dez. 2006.
- SANTOS, G. R.; RANGEL, P. H. N.; SANTIAGO, C. M.; LEÃO, F. F.; MARRA, B.; ALMEIDA JUNIOR, D. Reação a doenças e caracteres agrônômicos de genótipos de arroz de várzeas no Estado do Tocantins. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 26, n. 1, p. 51-57, 2005.
- SANTOS, G. R.; KORNDORFER, G. H.; REIS FILHO, J. C. D.; PELÚZIO, J. M. Adubação com silício: Influência sobre as principais doenças e sobre produtividade do arroz irrigado por inundação. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 50, n. 287, p. 1-8, 2003.
- SHEN, Y.; ZHU, P.; YUAN, X.; ZHAO, X.; MANRY, J.; ROJAS, C.; SHAHJAHAN, A.; LEVY, M. The genetic diversity and geographic distribution of *Magnaporthe grisea* in China. **Scientia Agricultura Sinica**, Peking, v. 29, n. 4, p. 39-46, 1996.
- SILVA, L. M. dos A. **Identificação de patótipos de *Magnaporthe grisea* coletados durante o desenvolvimento de multilinhas e variedades compostas de arroz irrigado no Estado do Tocantins**. 2008. 95 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.
- SILVA, O. F. da. **Dados conjunturais do arroz (área, produção e rendimento): Tocantins – 1986 a 2008**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2009.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.
- STANDARD evaluation system for rice. 2. ed. Los Baños: International Rice Research Institute, 1980. 44 p.
- SUDUPAK, M. A.; BENNETZEN, J. L.; HULBERT, S. H. Unequal exchange and meiotic instability of disease-resistance genes in the *RP1* region of maize. **Genetics**, Austin, v. 133, n. 1, p. 119-125, Jan. 1993.
- TABIEN, R. E.; LI, Z.; PATERSON, A. H.; MARCHETTI, M. A.; STANSEL, J. W.; PINSON, S. R. M. Mapping of four major rice blast resistance genes from 'Lemont' and 'Teqing' and evaluation of their combinatorial effect for field resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, n. 8, p. 1215-1225, Dec. 2000.
- URASHIMA, A. S.; ISOGAWA, Y. Identification of races of *Pyricularia oryzae* causing blast disease in cultivar IAC 4440 in Paraíba Valley - SP. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 16, n. 3/4, p. 243-247, jul./dez. 1990.
- VALENT, B.; CHUMLEY, F. G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 443-467, 1991.



- WANG, S.; BASTEN, C. J.; ZENG, Z. B. **Windows QTL cartographer V2.5**. Raleigh: North Carolina State University, 2007. Disponível em: <<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>>. Acesso em: 10 out. 2009.
- WEI, F.; GOBELMAN-WERNER, K.; MORROLL, S. M.; KURTH, J.; MAO, L.; WING, R.; LEISTER, D.; SCHULZE-LEFERT, P.; WISE, R. P. The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240 kb DNA interval on chromosome 5 S (1 HS) of barley. **Genetics**, Austin, v. 153, n. 4, p. 1929-1948, Dec. 1999.
- WRIGHT, R. J.; THAXTON, P. M.; EL-ZIK, K. M.; PATERSON, A. H. D-subgenome bias of Xcm resistance genes in tetraploid *Gossypium* (cotton) suggests that polyploid formation has created novel avenues for evolution. **Genetics**, Austin, v. 149, n. 4, p. 1987-1996, Aug. 1998.
- XIA, J. Q.; CORRELL, J. C.; LEE, F. N.; ROSS, W. J.; RHOADS, D. D. Regional population diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas and the influence of host selections. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 8, p. 877-884, Aug. 2000.
- XIA, J. Q.; CORRELL, J. C.; LEE, F. N.; MARCHETTI, M. A.; RHOADS, D. D. DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Pyricularia grisea* (*Magnaporthe grisea*) population in two rice fields in Arkansas. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 10, p. 1029-1035, Oct. 1993.
- YU, Z. H.; MACKILL, D. J.; BONMAN, J. M.; MCCOUCH, S. R.; GUIDERDONI, E.; NOTTEGHEM, J. L.; TANKSLEY, S. D. Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 93, n. 5/6, p. 859-863, Oct. 1996.
- ZEIGLER, R. S. Recombination in *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 249-276, 1998.
- ZEIGLER, R. S.; CUOC, L. X.; SCOTT, R. P.; BERNARDO, M. A.; CHEN, D. H.; VALENT, B.; NELSON, R. J. The relationship between lineage and virulence in *Magnaporthe grisea* in the Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 4, p. 443-451, Apr. 1995.
- ZENG, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 23, p. 10972-10976, Dec. 1993.
- ZHENG, Y.; ZHANG, G.; LIN, F. C.; WANG, Z. H.; JIN, G. L.; YANG, L.; WANG, Y.; CHEN, X.; XU, Z. H.; ZHAO, X. Q.; WANG, H. K.; LU, J. P.; LU, G. D.; WU, W. R. Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, n. 10, p. 1340-1347, Oct. 2008.
- ZHU, Y.; CHEN, H.; FAN, J.; WANG, Y.; LI, Y.; CHEN, J.; YNAG, S.; HUS, L.; LEUNG, H.; MEW, T. W.; TENG, P. S.; WANG, Z.; MUNDT, C. C. Genetic diversity and disease control in rice. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 718-722, Aug. 2000.