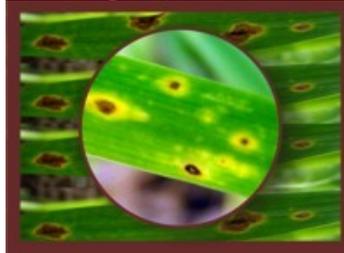


Caracterização de raças de *Pyrenophora tritici-repentis*, agente etiológico da mancha amarela do trigo, no sul do Brasil

Flavio Martins Santana¹, Claudia Cristina Clebsch², Timothy Lee Friesen³

Imagem: Paulo Pereira



Passo Fundo, RS
2008

Resumo

A mancha amarela, causada por *Pyrenophora tritici-repentis*, é uma das mais importantes doenças que afetam o trigo no Brasil. Sob condições favoráveis, a produtividade pode ser reduzida drasticamente. Em recentes anos, essa doença tem causado severas perdas devido a falta de cultivares resistentes disponíveis. Existem ao menos oito raças do patógeno que produzem diferentes combinações de toxinas seletivas do hospedeiro (HSTs) as quais estão envolvidas no processo de patogenicidade. No Brasil não há relatos de ocorrência de diferentes raças do patógeno. O objetivo deste trabalho foi identificar a prevalência de diferentes raças de *P. tritici-repentis* presentes nas populações desse patógeno no Brasil. Isolados do patógeno foram coletados em trigo na região sul do Brasil durante os anos de 2007 e 2008. A identificação das raças foi realizada por meio de inoculação em cultivares de trigo diferenciadoras. De acordo com os resultados obtidos, parte da população avaliada foi identificada como raças 1 e 2, em igual proporção, o que indica que estas devem ser as raças predominantes no Brasil.

Abstract

Tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* is one of the most important diseases of wheat in Brazil. Under favorable environmental conditions, wheat yield can be reduced drastically. In the recent years in Brazil, tan spot caused severe yield loss due to the lack of resistance in the available Brazilian cultivars. There are at least eight races of the pathogen which produce different combinations of host selective toxins (HSTs) that are involved in pathogenesis. In Brazil there has been no report of the occurrence of different races of the pathogen. The objective of this study

¹ Pesquisador em Fitopatologia da Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, km 294, 99001-970 Passo Fundo, RS. E-mail: fsantana@cnpt.embrapa.br.

² Analista da Embrapa Trigo.

³ Pesquisador em Fitopatologia. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS).

was to identify the prevalence of the different *P. tritici-repentis* races present in the Brazilian population. Pathogen isolates were collected from wheat growing regions of the south of Brazil during 2007 and 2008. The identification of the races is carrying out by inoculation onto a set of widely accepted differential wheat lines. Based on this methodology, the data showed that the population evaluated consisted of approximately equal amounts of race 1 and 2 indicating that these races are the most prevalent throughout Brazil.

Introdução

A mancha amarela, causada por *Pyrenophora tritici-repentis*, (anamorfo: *Drechslera tritici-repentis*) é uma das mais importantes doenças do trigo. O patógeno é um fungo necrotrófico, que é capaz de sobreviver entre uma safra e outra nos restos culturais deixados sobre o solo, em função do sistema de plantio direto. Neste período, estruturas provenientes de reprodução sexual, pseudotécios, são formados. Com a maturação destes, ocorre a liberação de ascosporos, os quais são capazes de infectar novas plantas logo no início de sua emergência. Em seguida, se não for controlada, e se as condições climáticas forem favoráveis (ocorrência de chuva e vento), a doença progride e infecções secundárias se multiplicam entre as plantas na lavoura. Fatores como umidade, temperatura, luz, idade da planta, posição da folha, genótipo do hospedeiro e virulência do isolado são variáveis que contribuem para a quantidade de inóculo a ser produzida e conseqüentemente na severidade da doença (COX & HOSFORD, 1987; CIUFFETTI & TUORI, 1999; PRESTES, 2002).

Para controle da doença, recomenda-se rotação de culturas, com o objetivo de reduzir o inóculo primário presente nos restos culturais. Tratamento da parte aérea com fungicidas é também uma estratégia recomendada e muito utilizada, porém, dependente de condições climáticas; pois justamente em períodos chuvosos, quando a doença se torna mais grave, o controle se torna mais difícil, pois não é possível a entrada de máquinas na lavoura. Um terceiro método de controle, muito buscado no melhoramento de plantas para diversos patógenos é o uso de cultivares resistentes. Para mancha amarela do trigo não há no mercado cultivares com alto nível de resistência. Por ser uma característica governada por vários genes, embora a busca por resistência seja de grande interesse aos melhoristas, isto requer uma busca constante de boas fontes de resistência e de métodos eficientes de introgressão de genes de interesse, além de ser necessário evitar que estes sejam perdidos por deriva durante o processo de melhoramento para as demais características de interesse (SINGH et al., 2006).

Entre os diversos fatores que compõem a resistência do trigo à mancha amarela, estão genes que governam características de sensibilidade a toxinas do patógeno, que são responsáveis por sintomas de necrose e clorose durante a infecção pelo fungo no tecido vegetal, conhecidas como toxinas seletivas ao hospedeiro (HST). Alguns desses genes já estão mapeados nos cromossomos de trigo, havendo disponível marcadores moleculares bastante próximos a eles, podendo assim serem utilizados como ferramenta molecular na seleção assistida de plantas com maior nível de resistência (CIUFFETTI et al., 1997; EFFERTZ et al., 2002)

Das toxinas do patógeno, as mais bem caracterizadas são PtrToxA, PtrToxB e PtrToxC. A primeira é responsável pelo sintoma de necrose e as demais por sintomas de clorose. Em função dos sintomas produzidos por estas toxinas em cultivares de trigo diferenciadoras (Glenlea, 6B365, Salamouni, Katepwa e ND495) é possível agrupar isolados do fungo em até oito raças (LAMARI et al., 2003; SANTANA & FRIESEN, 2007).

A caracterização do patógeno, por meio de identificação de raças, distribuição geográfica destas e análise do nível de diversidade genética da população do fungo, por meio de marcadores moleculares específicos, são premissas necessárias no processo de melhoramento genético de plantas com o objetivo de introgridir genes de resistência eficazes (FRIESEN et al., 2005; SANTANA & FRIESEN, 2007).

Este manuscrito objetiva apresentar os resultados parciais de identificação de raças obtidos de isolados de *P. tritici-repentis* coletados entre 2007 e 2008 nas principais áreas produtoras de trigo no Brasil.

Material e Métodos

Setenta e quatro isolados foram coletados em lavouras de trigo com sintomas de mancha amarela no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul (Fig. 1). Os pontos de coleta foram georreferenciados e plotados em imagem de satélite obtida no Google Earth.

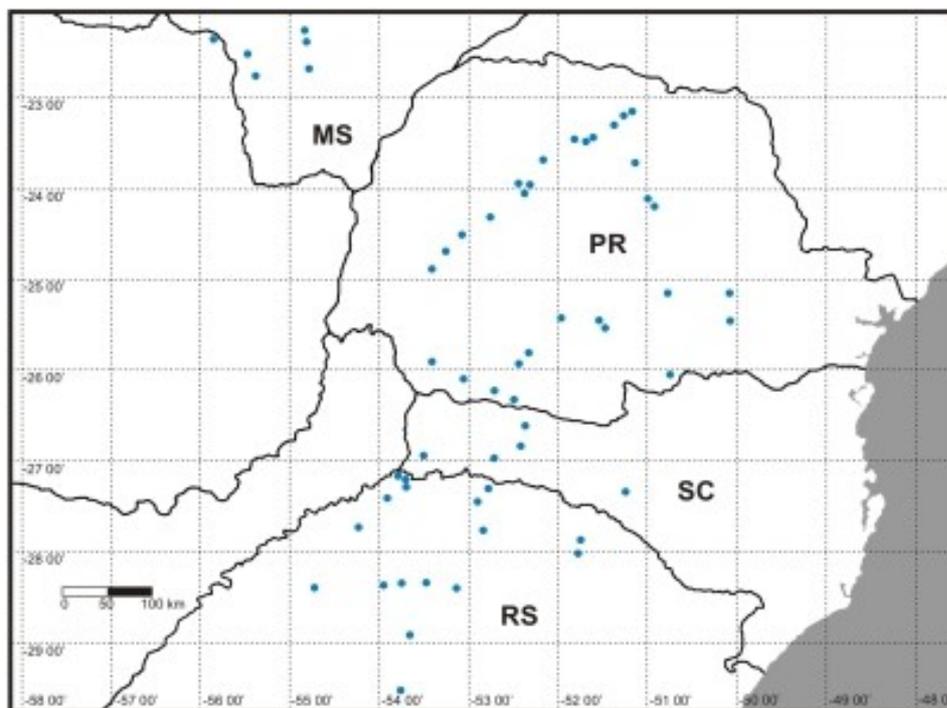


Fig. 1. Locais de coleta de isolados de *Pyrenophora tritici-repentis*.

Cada amostra foi coletada e encaminhada (em sacos de papel) ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo, onde se procederam os isolamentos do fungo em meio de cultura.

Isolamento

Para o isolamento do fungo, foram cortados pequenos pedaços das folhas com sintomas (aproximadamente de 2 x 2 mm), e dentro de um pequeno bequer, em câmara de fluxo laminar, realizada a assepsia com água destilada e autoclavada, acrescida de hipoclorito de sódio (2,0 -2,5%) na proporção de 1:1 por 1 minuto, seguida de enxágüe com água destilada e autoclavada. Em seguida os pedaços de folha, cinco fragmentos em cada placa, foram dispostos diretamente sobre meio BDA + streptomina (0,12 g/L). Dois a quatro dias após, os micélios de fungo em

crescimento, que apresentavam características do patógeno buscado, foram repicados para novas placas contendo V8-BDA (150ml suco V8, 10 agar, 10 BDA Merck, 3g CaCO₃) até a obtenção da cultura pura.

Produção de Esporos

O processo de produção de esporos foi utilizado tanto para confirmação do patógeno quanto para inoculações em plantas, de acordo com Lamari et al. (1995) com modificações. Para tanto, o fungo foi repicado para uma placa nova de V8-BDA, permanecendo cinco dias para crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro. No quinto dia, com um tubo de ensaio esterilizado, foi feito um esmagamento do micélio, procedimento essencial para que o fungo esporule. Em seguida as placas foram transferidas para outro ambiente onde permaneceram por 24 h de luz à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, período em que se desenvolvem conidióforos, seguido de mais 24h de escuro a $15 \pm 1^\circ\text{C}$, necessários para a formação de conídios. A confirmação do isolamento do patógeno foi feita no sétimo dia, quando era observado ao microscópio estereoscópico a formação abundante de esporos.

Armazenamento

Após a confirmação dos isolados, pequenos discos de meio V8-BDA contendo o fungo foram dispostos por uma noite em câmara de fluxo laminar para desidratar o meio. Em seguida os discos secos foram armazenados em freezer, onde permanecem viáveis por pelo menos um ano. Para recuperá-los, basta recolocá-los em meio de cultura (BDA ou V8-BDA).

Inoculação

O inóculo foi preparado vertendo-se pequena quantidade de água sobre o fungo com esporos, os quais são liberados com o auxílio de um pincel macio. Para ajuste do número de esporos a serem inoculados utilizou-se Câmara de Neubauer, ou uma simples regra de três aplicada em três repetições de gotas de 5µl da suspensão de esporos. Então o volume foi ajustado para aproximadamente 3.000 esporos/mL. Com tal suspensão de esporos plantas no estágio de 2 folhas foram pulverizadas completamente até o ponto de escorrimento pelas folhas. Após a inoculação as plantas foram mantidas em regime de umidade intermitente de 30 segundos a cada 30 segundos, por 48 horas, de acordo com Lamari et al. (1995) com modificações. Em seguida as plantas são transferidas para casa-de-vegetação onde permaneceram por mais cinco dias até a avaliação dos sintomas, para a qual foi utilizada uma escala de notas adaptada de Lamari & Bernier (1989).

Identificação das raças

Para identificação das raças cada isolado, previamente armazenado como descrito acima, foi recuperado por reidratação e repicado para novas placas contendo V8-BDA. Plantas diferenciadoras são inoculadas conforme procedimento descrito acima. As plantas diferenciadoras foram as cultivares Glenlea, Salamouni, Katepwa, 6B365 e ND495, nas quais a identificação das raças foi realizada conforme a Tabela 1. Vinte e quatro isolados foram utilizados para identificação de raças.

Tabela 1. Reação das cultivares diferenciadoras às toxinas produzidas pelas raças mais comuns de *P. tritici-repentis*. Adaptado de Ali & Francl (2003).

Raça	Série diferencial					Toxina	Sintoma
	Glenlea	Katepwa	6B365	ND495	salamouni		
1	Nec	Nec	Clo	Nec	R	PtrToxA & PtrToxC	Necrose e clorose
2	Nec	Nec	R	Nec	R	PtrToxA	Necrose somente
3	R	R	Clo	R	R	PtrToxC	Clorose extensa
4	R	R	R	R	R		Pontos necróticos
5	R	Clo	R	R	R	PtrToxB	Clorose extensa

Clo = clorose; Nec = necrose; R = resistência

Resultados e discussão

Dos 24 isolados avaliados 50% corresponderam à raça 1 e a outra metade à raça 2 (Fig. 2). No Paraná apenas a raça 2 foi identificada em duas regiões, mas isso não indica que haja uma separação geográfica entre elas, pois são necessários mais dados para se chegar a uma conclusão de distribuição de raças. No Rio Grande do Sul, onde a mancha amarela ocorre com mais frequência e tem causado maiores danos à cultura, as duas raças aparentemente estão igualmente distribuídas nas regiões tritícolas do estado. É possível que uma maior diversidade do patógeno seja um dos fatores que contribuam para que a doença cause mais danos no Rio Grande do Sul e juntamente com condições climáticas predisponentes tenha levado a falhas de controle e a grandes perdas, como ocorreu na safra de trigo em 2008.

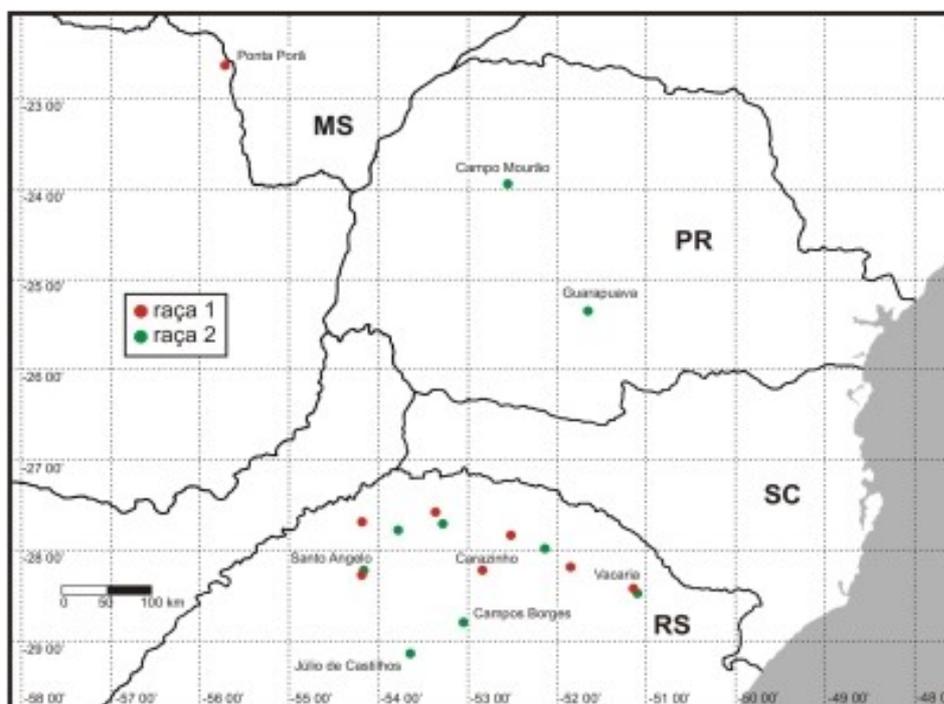


Fig. 2. Locais onde confirmou-se presença das raças 1 e 2. Pontos marcados em vermelho: raça 1; pontos marcados em verde: raça 2.

Considerações finais

Além da identificação de raças por meio de série diferencial, está em andamento na Embrapa Trigo, em parceria com a Universidade Federal de Pelotas, a avaliação da diversidade da população de *P. tritici-repentis*, por meio de marcadores microssatélites. Os dados a serem coletados servirão de suporte ao programa de melhoramento da Embrapa Trigo para atender às demandas de mercado por cultivares mais resistentes à mancha amarela.

Referências bibliográficas

- ALI, S.; FRANCL, L. J. Population race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* prevalent on wheat and noncereal grasses in the great plains. **Plant Disease**, v. 87, p. 418-422, 2003.
- CIUFFETTI, L. M.; TUORI, R. P. Advances in the characterization of the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. **Phytopathology**, v. 89, p. 444-449, 1999.
- CIUFFETTI, L. M.; TUORI, R. P.; GAVENTA, J. M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. **The Plant Cell**, v. 9, p. 135-144, 1997.
- COX, D. J.; HOSFORD, R. M. Resistant winter wheats compared at differing growth stages and leaf positions for tan spot severity. **Plant Disease**, v. 71, p. 883-886, 1987.
- EFFERTZ, R. J.; MEINHARDT, S. W.; ANDERSON, J. A.; JORDAHL, J. G.; FRANCL, L. J. Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat. **Phytopathology**, v. 92, p. 527-533, 2002.
- FRIESEN, T. L.; ALI, S.; KLEIN, K. K.; RASMUSSEN, J. B. Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. **Phytopathology**, v. 95, p. 1144-1150, 2005.
- LAMARI, L.; SAYOUD, R.; BOULIF, M.; BERNIER, C. C. Identification of a new race in *Pyrenophora tritici-repentis*: implications for the current pathotype classification system. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, p. 312-318, 1995.
- LAMARI, L.; BERNIER, C. C. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] based on lesion type. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, p. 49-56, 1989.
- LAMARI, L.; STRELKOV, S. E.; YAHYAOU, A.; ORABI, J.; SMITH, R. B. The identification of two races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. **Phytopathology**, v. 93, p. 391-396, 2003.
- PRESTES, A. M.; SANTOS, H. P.; REIS, E. M. Práticas culturais e incidência de manchas foliares em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 791-797, 2002.
- SANTANA, F. M.; FRIESEN, T. L. **Tan spot disease of wheat: race characterization**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 14 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos online, 84). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do84.htm>.

SINGH, P. K.; MERGOUM, M.; ALI, S.; ADHIKARI, T. B.; ELIAS, E. M.; HUGHES, G. R. Identification of new sources of resistance to tan spot, *Stagonospora nodorum* blotch, and *Septoria tritici* blotch of wheat. **Crop Science**, v. 46, p. 2047-2053, 2006.



**Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento Online, 60**

Embrapa Trigo
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970
Passo Fundo, RS
Fone: (54) 3316 5800
Fax: (54) 3316 5802
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

Expediente

Comitê de Publicações

Presidente: **Leandro Vargas**

Anderson Santi, Antônio Faganello, Casiane Saete
Tibola, Leila Maria Costamilan, Lisandra Lunardi, Maria
Regina Cunha Martins, Sandra Maria Mansur Scagliusi,
Sandro Bonow

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

SANTANA, F. M.; CLEBSCH, C. C.; FRIESEN, T. L. **Caracterização de raças de *Pyrenophora tritici-repentis*, agente etiológico da mancha amarela do trigo, no sul do Brasil.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 13 p. html (Embrapa Trigo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, 60). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp60.htm>.