

10. Caracterização molecular e de virulência de isolados de *Pyricularia grisea*

Cruz, M.F.A¹.; Prestes, A. M².; Maciel, J. L. N³. ¹Universidade Federal de Viçosa - UFV, Av. PH Rolfs, s.n, 3657-000, Viçosa, MG, fertunes@bol.com.br; ²Universidade de Passo Fundo – UPF; ³Embrapa Trigo

A variabilidade genética de *Pyricularia grisea* do arroz tem sido avaliada com o uso de marcadores moleculares a pelo menos 15 anos. Ao longo do tempo diferentes estratégias foram desenvolvidas para detectar com maior acurácia a ocorrência de diferentes patótipos do fungo, tanto na cultura do arroz, quanto em outras gramíneas (LEVY et al., 1991; KACHROO et al., 1994). Dessa forma, o uso de marcadores microsatélites SSR (Simple Sequence Repeats) têm sido eficiente na caracterização de isolados de *P. grisea* obtidos de cereais de inverno, em especial aqueles obtidos do trigo (GARRIDO, 2001; BRONDANI et al., 1998). A partir da caracterização da população de patótipos de uma determinada região agrícola é possível a elaboração de estratégias que visem o controle da doença, através do uso e/ou construção de cultivares resistentes à aquela população do patógeno. Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar a variabilidade genética de isolados de *P. grisea* do trigo originários de quatro estados brasileiros através do uso de marcadores moleculares microsatélites, e relacionar o padrão molecular obtido com a reação promovida por esses isolados quando utilizados em procedimentos de inoculação de genótipos de trigo na fase de planta jovem.

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Fitopatologia e Biologia Molecular da Embrapa Trigo. Os isolados monospóricos foram obtidos de ráquis, folhas e glumas de espigas de trigo com sintomas de brusone nos anos de 2005 e 2006. As amostras foram obtidas de cultivares originárias de lavouras dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás, ao total de 32 isolados monospóricos. O DNA dos isolados foi amplificado utilizando os primers dos marcadores PG3, PG5, PG12, PG20, PG15, PG21, desenvolvidos por Garrido (2001), e os primers MG1 e MG21 (BRONDANI et al., 1998). A reação de amplificação foi composta de: DNA 25ng/μL, Tampão 10x, MgCl₂ 20 mM, dNTP 10 mM, primer 5 μM, Taq polimerase 5 U/mL e H₂O. A eletroforese e a detecção dos fragmentos de PCR marcados foram feitas no seqüenciador ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) e a análise dos fragmentos no programa GeneMapper™ v3.5. Os dados de polimorfismo de DNA dos isolados do fungo detectados via marcadores microsatélites foram analisados empregando-se a estimativa de similaridade genética entre os isolados. Desta forma foi necessária a construção de uma matriz de similaridade contendo dados binários para cada primer utilizado. Atribuiu-se o valor 0 para ausência do alelo e valor 1 para presença do alelo. A partir da matriz de similaridade genética e de virulência foi possível a construção dos dendrogramas com base na análise molecular. O dendrograma de virulência foi construído a partir da reação de 70 genótipos de plantas jovens de trigo quando submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *P. grisea*. Para construção dos dendrogramas utilizou-se o programa NTSYSpc 2.02 (ROHLF, 1997). Para a estimativa da similaridade genética entre os isolados foi utilizado o coeficiente de Jaccard. Para o agrupamento hierárquico dos isolados utilizou-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages).

A análise hierárquica dos dados de amplificação permitiu constatar uma similaridade mínima de cerca de 47% entre os isolados de *P. grisea* de trigo. Já o isolado proveniente de arroz apresentou 14 % de similaridade em relação aos isolados de trigo. O conjunto dos 31 isolados de *P. grisea* do trigo foi dividido em quatro grupos, caracterizados pelas letras A, B, C e D. Os isolados pertencentes a cada grupo apresentaram uma similaridade mínima entre si de 75% (Fig. 1). O grupo A foi formado por 22 isolados, 18 desses apresentaram, no mínimo, 90% de similaridade entre si, neste grupo foram inclusos representantes de todas as regiões amostradas e de diferentes partes vegetais.

Nesse grupo estão os dois isolados do Rio Grande do Sul (Py 5001 e Py 5002) e os isolados de Goiás que apresentaram mais de 85% de similaridade. De um mesmo centro comum com 75% de similaridade ocorreu uma ramificação que uniu isolados de todas as regiões amostradas. O grupo B foi composto por cinco isolados. O grupo C foi formado pelos isolados Py 5031 e Py 5029 (63% de similaridade) ambos originários do cultivar CD 105. O grupo D apresentou menor similaridade genética em relação ao restante dos isolados, foi composto pelos isolados: Py 5038 e Py 5020 (47%). A análise hierárquica do padrão de virulência (Fig.2) dos isolados considerando o mesmo grau de similaridade estabelecido para separação dos grupos de acordo com o padrão molecular permitiu a formação de três grupos identificados pelas letras a' até c', com os isolados agrupados de forma semelhante à análise molecular.

Os dados obtidos evidenciaram uma estreita similaridade molecular entre os isolados utilizados no experimento, mesmo tendo sido obtidos de locais, cultivares, estruturas vegetais e períodos diferentes. Embora o número de isolado amostrados tenha sido pequeno, os mesmos representam um importante segmento da população de *P. grisea* que ocorre no Brasil, pois os mesmos foram obtidos de plantas coletadas de um número representativo de estados brasileiros (4). Dessa forma constatou-se que, os primers utilizados no experimento foram eficientes na caracterização dos isolados de *P. grisea* do trigo, pois geraram polimorfismo que permitiu separar os 18 isolados em grupos distintos. Observando-se os dendrogramas construídos, pôde-se verificar que a variabilidade genética detectada foi bastante compatível com a variabilidade apresentada pelos isolados em relação às suas respectivas capacidades infectivas e de virulência. Essa era a expectativa inicial do trabalho, ou seja, estabelecer uma característica única que contemplasse aspectos relacionados à variabilidade genética e fenotípica, esta última apresentada pela questão da virulência. Embora inicialmente já tenha sido proposto, para *P. grisea* do arroz, que a relação entre as características moleculares e de virulência fosse relativamente simples (LEVY et al., 1991), avaliações realizadas em períodos posteriores demonstraram que existe diversidade entre e dentro dos grupos formados de acordo com cada um dos dois critérios (MACIEL et al., 2004). Nesta situação, provavelmente, se inclui o isolado Py 5002, avaliado no presente trabalho, e cuja relação com os demais isolados não foi a mesma de acordo com o critério utilizado para o agrupamento. Apesar das discrepâncias mencionadas, a estratégia de se utilizar marcadores para monitorar a população e os próprios genes de avirulência de *P. grisea* de arroz já demonstrou sua eficiência. Além disso, o uso de marcadores moleculares continuam sendo avaliados quanto à sua utilidade para caracterizar *P. grisea* em diferentes países.

Referências Bibliográficas

- BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; GARRIDO, L.; FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers for genetic analysis of *Pyricularia grisea*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 31, 1998, Fortaleza. **Resumos...**, Fortaleza: Fitopatologia Brasileira, 1998. p. 230.
- GARRIDO, L.R. Desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipervariáveis do genoma de *Magnaporthe grisea* na análise da estrutura de populações do patógeno infectando plantações de arroz. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2001.
- KACHROO, P.; LEONG, S.A.; CHATHOO, B.B. *Pot-2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular General Genetics**, New York, v. 245, p. 39-48.1994.

LEVY, M.; ROMAO, J.; MARCHETTI, M.A.; HAMER, J.E. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. **The Plant Cell**, Rockville, v.3, p.95-102.1991.

MACIEL, J.L.N.; RODRIGUES, P.C.S.; AVOZANI, O, A.; MORAES, M.G. Padrão molecular e de virulência de isolados de *Pyricularia grisea* do estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, n.5, p.504-510, set-out. 2004.

ROHLF, F.J. NTSYS-PC ver. 2.02. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Publishing, Setauket, New York. 1997.

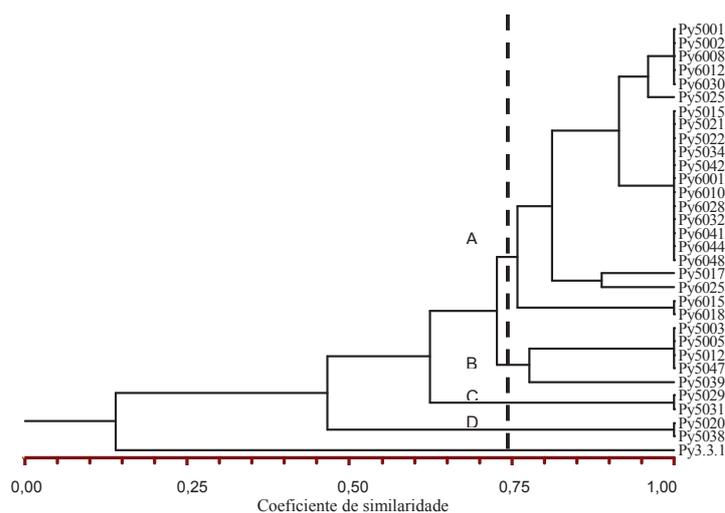


Figura 1. Dendrograma baseado no perfil de amplificação do DNA de 32 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea* utilizando 8 primers microssatélites. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.

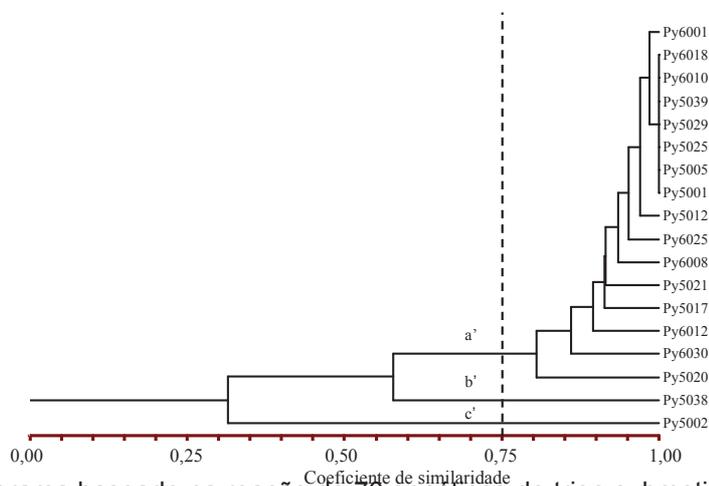


Figura 2. Dendrograma baseado na reação de 70 genótipos de trigo submetidos à inoculação com 18 isolados monospóricos de *Pyricularia grisea*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. 2007.