

ANÁLISE DA SEGREGAÇÃO DE AVIRULÊNCIA DE
Magnaporthe grisea DO TRIGO

ALFREDO S. URASHIMA^{1*}, ANA C. BRUNO^{1**} & NORBERTO A. LAVORENTI²

¹Departamento de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Cx. Postal 153, CEP 13600-970 Araras, SP, fax (019) 542-3888, e-mail: alfredo@dbv.cca.ufscar.br; ²Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural, CCA, UFSCar, Araras, SP

(Aceito para publicação 13/07/2001)

Autor para correspondência: Alfredo S. Urashima

URASHIMA, A.S., BRUNO, A.C. & LAVORENTI, N.A. Análise da segregação de avirulência de *Magnaporthe grisea* do trigo. Fitopatologia Brasileira 26:644-648. 2001.

RESUMO

A segregação de avirulência entre progênies de cruzamento entre isolados de *Magnaporthe grisea* provenientes de trigo (*Triticum aestivum*) foi estudada utilizando cinco variedades de trigo. A população segregante desse estudo foi formada por 37 progênies resultantes do cruzamento entre dois isolados de campo que diferiram na reação de avirulência/virulência a essas variedades. Os resultados obtidos mostraram que para as variedades CNT 8, BR 17 e OR 1 a relação avirulência/virulência foi de 1:1, demonstrando segregação de um gene de avirulência, que foi diferente para

cada uma das variedades. A segregação observada para as variedades BR 31 e Iapar 3 foi de 1:3 avirulência/virulência indicando segregação de um gene de avirulência e do supressor desse gene de avirulência. Além disso, a recombinação sexual entre isolados de *M. grisea* em condições de laboratório possibilitou produzir isolados virulentos a todas as variedades podendo ser uma das causas para a quebra de resistência de variedades resistentes.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, *Pyricularia*, variabilidade, recombinação.

ABSTRACT

Segregation analysis of avirulence of *Magnaporthe grisea* of wheat

The segregation of virulence among progenies of a cross between wheat isolates of *Magnaporthe grisea* on five wheat (*Triticum aestivum*) varieties was studied. The segregating population was formed by 37 progenies resulting from the cross between two field isolates that differed in virulence. The results showed 1:1 avirulence/virulence segregation to the varieties CNT 8, BR 17, and OR 1 indicating the segregation of a single avirulence gene that

was specific to each variety. On the other hand, the segregation of avirulence/virulence of the varieties BR 31 and Iapar 3 was 1:3 indicating the segregation of one avirulence gene and the suppressor of this gene. Furthermore, the sexual recombination between fungal isolates under laboratory conditions produced isolates virulent to all varieties, which might be one of the causes for varietal resistance breakdown.

A brusone causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* Barr. (anam. *Pyricularia grisea* Sacc) foi observada pela primeira vez na cultura do trigo [*Triticum aestivum* (L.) Thell.] em 1985 (Igarashi *et al.*, 1986), constituindo a primeira constatação da ocorrência da brusone no trigo em condições naturais em todo o mundo. Atualmente essa doença está presente nas principais regiões tritícolas do Brasil e sua importância pôde ser verificada pelos danos à produtividade da ordem 10-11% no rendimento do trigo no Mato Grosso do

Sul (Goulart & Paiva, 1990).

Produtos químicos com bom desempenho no controle da brusone do arroz, não se mostraram eficientes na proteção de panículas do trigo (Urashima & Kato, 1994), restando como método de controle da doença o desenvolvimento de variedades resistentes. No entanto, o desenvolvimento de variedades com resistência alta e duradoura tem sido extremamente difícil e financeiramente onerosa. Além disso, *M. grisea* se notabiliza por quebrar a resistência das variedades após dois-três anos de sua liberação (Correa-Victoria & Zeigler, 1993).

A exata causa para a curta vida das variedades resistentes ainda não está esclarecida. Segundo Zeigler *et al.* (1995)

* Bolsista Pos-Doutor FAPESP (98/03699-3)

** Bolsista Iniciação Científica FAPESP (98/15702-9)

as possíveis causas poderiam ser agrupadas em dois grandes grupos: a) uma inadequada exposição dos materiais genéticos ou linhagens à diversidade populacional do patógeno e b) a alta variabilidade do patógeno que resultaria numa raça virulenta que não existia anteriormente.

O presente trabalho visa estudar a segregação de progênies de cruzamento entre isolados de *M. grisea* para virulência em cinco variedades de trigo. Esse conhecimento é o primeiro passo para a análise genética da avirulência e consequente identificação dos genes.

Para a análise da segregação de avirulência/virulência de *M. grisea*, cinco variedades de trigo (OR 1, Iapar 3, CNT 8, BR 17 e BR 31) foram utilizadas. Variedades que produziram reação resistente e suscetível aos isolados parentais MS05-09 e PR02-05 de *M. grisea* e por isso utilizadas para o estudo de suas reações aos ascósporos.

As plantas de trigo foram semeadas em sacos plásticos, em casa de vegetação, utilizando-se cinco sementes germinadas. Foram mantidas sob temperatura de 25 °C até atingirem o estágio três a quatro folhas, quando foram inoculadas.

Escolheu-se dois isolados de *M. grisea* do trigo, MS05-09 (*MAT1-2*) e PR02-05 (*MAT1-1*), que apresentaram reações virulenta e avirulenta às cinco variedades, compatibilidade sexual e produção abundante de ascósporos viáveis. Desse cruzamento, 37 progênies foram obtidas através de isolamento ascóporico.

Os isolados foram colocados em placa de petri com meio de aveia, separados 3-4 cm e mantidos a 22 °C por três semanas, sob luz fluorescente contínua. Abundante formação de peritécio ocorreu na interseção após esse período. A seguir, um único peritécio maduro foi transferido para uma lâmina com uma gota de água destilada e espremida para a liberação das ascas. Logo em seguida as ascas foram levadas para câmara de fluxo laminar e deixadas por 30 min. Esse procedimento permitiu a desintegração das paredes das ascas e a separação de ascósporos individualmente em um micromanipulador. Somente um ascoporo por asca foi utilizado, resultado de apenas um evento meiótico na produção dos ascósporos (Leung, 1984).

A inoculação foi realizada através de pulverização com compressor manual, empregando-se 50 ml de suspensão de esporos por isolado (ascoporo) calibrada para uma concentração de 1×10^5 esporos/ml e Tween20 a concentração de 1×10^{-4} , como espalhante adesivo. Logo após a inoculação as plantas foram mantidas em sacos de polietileno para formação de câmara úmida, no escuro, a 25 °C por 15 h. Em seguida, as plantas foram transferidas para casa de vegetação por uma semana quando foram avaliadas quanto ao sintomas de brusone.

A avaliação das plantas inoculadas quanto a susceptibilidade à brusone foi realizada atribuindo-se notas de acordo com a reação apresentada. Os tipos de lesões foram classificadas em cinco categorias (Urashima & Kato, 1994): 0 = sem sintoma visível da doença; 1 = lesões minúsculas do tamanho cabeça de alfinete; 2 = manchas amarronzadas, embora possa haver variação quanto a coloração, não possuem

centro discernível; 3 = pequenas lesões com formato de olho e centro cinza; 4 = lesões típicas de brusone, elíptica e centro cinza. Lesões tipo 0, 1 e 2 que não esporularam quando submetidas as condições favoráveis de temperatura e umidade foram consideradas resistentes, enquanto lesões 3 e 4 foram consideradas como tipos susceptíveis, devido a esporulação em condições favoráveis.

Inoculação com cada isolado foi repetida pelo menos duas vezes. As plantas não foram consideradas individualmente, mas como população. Nesse sentido, o isolado foi considerado virulento, se pelo menos 50% das plantas em cada inoculação apresentaram sintomas susceptíveis da doença e se a mesma reação se repetiu na próxima repetição. Teste chi-quadrado foi utilizado para estimar a probabilidade da razão de segregação.

Do cruzamento entre os isolados de *M. grisea* do trigo MS05-09 com PR02-05 foram produzidas 37 progênies, as quais foram inoculadas em cinco variedades de trigo e avaliadas de acordo com o tipo de lesão provocada. O parental MS05-09 foi virulento para as variedades CNT 8 e Iapar 3 e avirulento para BR 17, BR 31 e OR 1. Por outro lado, o parental PR02-05 foi virulento para BR 17, BR 31 e OR 1 e avirulento para as variedades CNT 8 e Iapar 3. Portanto, para cada variedade de trigo os isolados MS05-09 e PR02-05 apresentaram reação diferencial de avirulência/virulência.

Pelos tipos de lesões apresentadas nas diferentes variedades observou-se que as progênies tiveram uma considerável variação fenotípica quanto aos tipos de reações. No entanto, observou-se uma clara distinção qualitativa entre isolados avirulentos e virulentos em cada variedade. Essa diferença foi inequívoca devido aos exames microscópicos sobre a capacidade de esporulação das lesões quando submetidas às condições favoráveis. A segregação avirulência/virulência (Tabela 1) está baseada nessa diferença qualitativa.

Entre cinco cultivares de trigo estudadas, três (CNT 8, BR 17, OR 1), apresentaram segregação 1:1. Na variedade CNT 8, das 37 progênies 23 foram consideradas avirulentas e 14 virulentas, no trigo BR 17 a relação avirulência/virulência foi de 19/18, enquanto na variedade OR 1 essa taxa foi de 16/21. As duas classes de progênies puderam ser claramente diferenciadas não havendo confusão quanto aos fenótipos.

Em todas as variedades foram observadas progênies que apresentaram os mesmos tipos de lesões causadas nos parentais assim como progênies responsáveis por tipos de lesões distintos. Dezenove progênies causaram lesões semelhantes aos parentais MS05-09 e PR02-05 na variedade CNT 8 enquanto as 18 progênies restantes provocaram sintomas variando de lesão 0 (quatro progênies), lesão 2 (oito progênies) e lesão 3 (seis progênies). Nas variedades BR 17 e OR 1, as populações de progênies que provocaram lesões distintas dos parentais foram de 18 e 21, respectivamente.

Quando a relação de progênies avirulentas/virulentas foram analisadas estatisticamente, os valores de chi-quadrado (X^2) obtidos com 1 grau de liberdade (g.l.) (avirulência/virulência) e nível de significância de 5% foram de $X^2 = 2,19$ para a variedade CNT 8, $X^2 = 0,03$ para o trigo BR 17 e $X^2 =$

TABELA 1 – Reação de cinco variedades de trigo (*Triticum aestivum*) a inoculação com os isolados MS05-09 e PR02-05 e segregação de progênies de *Magnaporthe grisea*, de acordo com tipo de infecção

Variedade	Parentais		Tipos de infecção					Distribuição avirulenta:virulenta	X^2 1:1 ^a	X^2 1:3
	MS05-09	PR02-05	0	1	2	3	4			
CNT 8	4	1	4	11	8	6	8	23:14	2,19	27,25*
BR 17	1	4	2	7	10	6	12	19:18	0,03	13,70*
BR 31	0	4	3	4	6	8	16	13:24	3,27*	2,03
OR 1	1	4	4	7	5	12	9	16:21	0,68	6,57*
Iapar 3	3	0	3	7	2	13	12	12:25	4,57*	1,10

^a X^2 Chi quadrado com significância a P = 0,05

0,68 para OR 1. Como o valor crítico da distribuição de X^2 para essas amostras foi de 3,84, a relação 1:1 foi a que melhor explicou as segregações observadas nas três variedades.

A taxa de distribuição das progênies avirulentas/virulentas para as variedades BR 31 e Iapar 3 foi diferente da observada nas variedades CNT 8, BR 17 e OR 1. Na variedade BR31, treze progênies foram consideradas avirulentas e 24 virulentas e na variedade Iapar 3 essa taxa foi de 12/25. Quando as relações avirulência/virulência dessas variedades foram analisadas estatisticamente, os valores de chi-quadrado foram $X^2 = 2,03$ para BR 31 e $X^2 = 1,10$ para Iapar 3, indicando que a segregação 1:3 foi a que melhor explicou essa distribuição.

Quando se examinou os tipos de fenótipos das progênies nas cinco variedades como um todo, observou-se que os fenótipos das progênies foram distintas aos fenótipos dos parentais. A Tabela 2 mostra os tipos de fenótipos resultantes e suas frequências, baseado na reação fenotípica em cinco variedades de trigo. Nas comparações das progênies para avirulência/virulência nessas variedades, quinze tipos diferentes de fenótipos foram obtidas nas progênies, por exemplo: somente tres isolados é que foram avirulentos para BR 17 e virulentos para CNT 8, BR 31, OR 1 e Iapar 3; dois

isolados que foram avirulentos para OR 1 e virulentas para as quatro variedades restantes e assim sucessivamente (Tabela 2). Sete isolados tiveram a capacidade de causar o mesmo tipo de reação virulenta em todas as variedades, demonstrando ausência de qualquer gene de avirulência. Por outro lado, seis isolados causaram reação de avirulência em todas as cinco variedades, sugerindo que o mesmo gene de avirulência pode estar presente em cada um desses isolados.

Os parentais MS05-09 e PR02-05 comportaram-se como avirulentos ou virulentos para as variedades CNT 8, BR 17, BR 31, OR 1 e Iapar 3. O fato desses isolados apresentarem reação diferencial de virulência em relação a uma mesma variedade e do fungo ser considerado haplóide, permitiram o estudo da análise da segregação avirulência/virulência já na geração F1, através do comportamento fenotípico das progênies resultantes desse cruzamento nessas variedades.

Quando os dados foram analisados de acordo com o tipo de lesão provocada, houve uma variação contínua na virulência das progênies em todas as variedades, desde totalmente avirulentas (lesão 0), reações intermediárias (lesões tipo 1, 2 e 3) e reação de completa compatibilidade (lesão 4), o que resultou que muitos isolados da população segregante

TABELA 2 – Avirulência/virulência das progênies do cruzamento MS05-09 e PR02-05 de *Magnaporthe grisea* em cinco variedades de trigo (*Triticum aestivum*) e número de progênies para cada fenótipo resultante

	Variedades de trigo					Número de progênies
	CNT8	BR17	BR31	OR1	Iapar3	
MS05-09	+ ^a	-	-	-	+	
PR02-05	-	+	+	+	-	
	+	+	+	+	+	7
	+	-	+	+	+	3
	+	+	+	-	+	2
	+	-	+	+	-	1
	+	+	-	-	+	1
	-	+	+	+	+	4
	-	-	+	+	+	4
	-	-	+	-	+	1
	-	+	-	-	+	1
	-	-	+	+	-	1
	-	+	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	1
	-	-	-	-	+	2
	-	+	-	-	-	2
	-	-	-	-	-	6

^atipos de infecção de acordo com a Tabela 1. + = virulento, - = avirulento

não puderam ser categorizadas com as mesmas reações apresentadas pelos parentais. Esse tipo de distribuição das lesões nas progênies resultantes de cruzamentos entre isolados avirulentos/virulentos também já havia sido observado no patossistema *M. grisea* – *O. sativa* (Ellingboe *et al.*, 1990, Valent *et al.*, 1991, Ellingboe, 1992, Silue *et al.*, 1992). A razão para tal fenômeno pode estar na segregação de genes menores, ou seja, vários genes de pequeno efeito individual (quantitativo) responsáveis pelas gradações observadas dentro das lesões classificadas tanto como avirulentas bem como nas virulentas, enquanto os genes de efeito maior, de efeito qualitativo, seriam responsáveis pela especificidade das variedades (Valent *et al.*, 1991).

O estudo da segregação no presente trabalho foi baseado nesses genes de efeito maior e não englobou necessariamente todos os genes envolvidos. A diferença entre isolados virulentos e avirulentos puderam ser distinguidos pela habilidade de esporulação dos isolados virulentos, o que permitiu a diferenciação da lesão tipo 3 da lesão tipo 2. Essa avaliação qualitativa das lesões também foi a adotada nos estudos de segregação do patossistema *M. grisea* – *O. sativa* (Ellingboe, 1992; Lau *et al.*, 1993; Chao & Ellingboe, 1997).

Para CNT 8, BR 17 e OR 1, a segregação observada foi do tipo 1:1. Isso sugere que os isolados MS05-09 e PR02-05 diferem em um locus com dois alelos no controle da avirulência/virulência para essas variedades, indicando segregação de um “gene de avirulência” (e não “gene de virulência”, em concordância com a nomenclatura internacional para *M. grisea*). Essa segregação, no entanto, não é suficiente para se concluir que existe somente um gene de avirulência envolvido nessa relação, necessitando-se de cruzamentos adicionais de gerações posteriores porque existe a possibilidade da segregação 1:1 ser obtida de diversas maneiras. Por exemplo, essa segregação pode ser resultado do cruzamento entre isolados que estejam segregando para o locus de avirulência (*Pa sa* X *pa sa*) ou entre isolados com genótipo segregando para o locus do supressor de avirulência (*Pa sa* X *Pa Sa*) (Chao & Ellingboe, 1977). Nesse sentido, a partir desse primeiro estágio de investigação sobre os padrões de segregação dos isolados de *M. grisea* nas variedades de trigo, estudos estão sendo conduzidos para se confirmar a existência desses supressores dos genes de avirulência através do cruzamento entre progênies e retrocruzamentos.

A existência de supressores de genes de avirulência também explicaria a segregação observada nas variedades BR 31 e Iapar 3. A distribuição das progênies avirulentas/virulentas para essas variedades se aproximou da relação 1:3. Esse padrão de segregação não é comum em *M. grisea*, embora já tenha sido observado em alguns trabalhos (Leung *et al.*, 1988; Ellingboe, 1992) e uma possível explicação, segundo Lau *et al.* (1993), para essa segregação (1:3 avirulência/virulência) seria a existência de dois genes de avirulência e dois supressores específicos desses genes de avirulência, havendo entretanto segregação somente de um gene de avirulência e seu supressor. Esses pesquisadores postularam o cruzamento dos seguintes genótipos: *p11P12S11s12* X

p11p12s11S12 (sendo *P* o alelo de avirulência e *S* o alelo supressor), estando esse cruzamento em homozigose para *p11* e em heterozigose para *S11* e *S12*. Entretanto não haveria segregação para *S11* porque ambos os isolados parentais conteria *p11* e a segregação de *P12* e *S12* produziria *P12s12*, *P12S12*, *p12s12* e *p12S12*, onde somente *P12s12* seria avirulento. A existência de supressores de genes de avirulência também foi postulada em outros estudos para explicar o surgimento de progênies avirulentas em cruzamento de dois isolados virulentos (Lawrence *et al.*, 1981, Ellingboe, 1992).

O gene que segregou para avirulência na variedade CNT 8 é diferente do gene que segregou na BR 17, porque do conjunto das 23 progênies avirulentas na CNT 8, oito progênies (Pg5, Pg9, Pg16, Pg17, Pg19, Pg27, Pg38 e Pg39) não foram avirulentas para a variedade BR 17 (dado não apresentado). Igualmente, da população avirulenta para CNT 8, dez progênies não causaram o mesmo tipo de reação na variedade OR 1. Da mesma forma, da população de 19 progênies avirulentas para a variedade BR 17, nove progênies não foram avirulentas para OR 1, evidenciando que a população detectada na variedade BR 17 é diferente da população avirulenta observada na variedade OR 1. Por conseguinte esses dados indicam claramente que três genes que segregaram para avirulência nas três variedades são diferentes. Vários genes de avirulência de controle monogênico tem sido identificados em *M. grisea* do arroz (*Oryza sativa* L.), por exemplo para as variedades CO39, M201, Yashiro-mochi (Valent *et al.*, 1991), bem como controle da avirulência por dois genes como para as variedades Cica6, Cica8 e Med Noi (Silue *et al.*, 1992).

Nenhuma das 37 progênies apresentou o mesmo padrão de avirulência/virulência nas cinco variedades semelhante aos parentais. Por exemplo, o parental MS05-09, que foi virulento para CNT 8 e Iapar 3 e avirulento para BR 17, BR 31 e OR 1, não teve nenhuma progênie com esse fenótipo (Tabela 2). Esse resultado demonstra claramente que todos os isolados foram resultantes da recombinação sexual entre os parentais e que a avirulência/virulência foi controlada por diferentes genes em cada um desses 15 fenótipos resultantes. Um dos aspectos mais intrigantes em *M. grisea* é o estudo da variabilidade do fungo, que tem como consequência direta a quebra da resistência de variedades 2-3 anos após sua liberação (Correa-Victoria & Zeigler, 1993). Evidências da reprodução sexual tem surgido em estudos recentes realizados em várias partes do mundo (Kumar *et al.*, 1999; Urashima *et al.*, 1999). O presente estudo demonstrou que a recombinação pode possibilitar o aparecimento de isolados do fungo virulentos a várias variedades a partir do cruzamento entre isolados e portanto ser uma das possíveis causas para a quebra de variedade resistentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Yodiro Masuda pelas sugestões apresentadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAO, C.T. & ELLINGBOE, A.H. Genetic analysis of avirulence/virulence of an isolate of *Magnaporthe grisea* from a rice field in Texas. *Phytopathology* 87:71-76. 1997.
- CORREA-VICTORIA, F.J. & ZEIGLER, R.S. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast 'hot spot' site. *Plant Disease* 77:1029-1034. 1993
- ELLINGBOE, A.H. Segregation of avirulence/virulence on three rice variedades in 16 crosses of *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 82:597-601.1992.
- ELLINGBOE, A.H., WU, B.C. & ROBERTSON, W. Inheritance of avirulence/virulence in a cross of two isolates of *Magnaporthe grisea* pathogenic to rice. *Phytopathology* 80:108-111. 1990.
- GOULART, A.C.P. & PAIVA, F.A. Perdas em trigo (*Triticum aestivum*) causadas por *Pyricularia oryzae*. *Fitopatologia Brasileira* 15:122. 1990.
- IGARASHI, S., UTIAMADA, C.M., IGARASHI, L.C., KAZUMA, A.H. & LOPES, R.S. *Pyricularia* em trigo. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 11:351-352. 1986.
- KUMAR, J., Nelson, R.J. & ZEIGLER R.S. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics* 152: 971-84. 1999.
- LAU, G.W., CHAO, C.T. & ELLINGBOE, A.H. Interaction of genes controlling avirulence/virulence of *Magnaporthe grisea* on rice variedade Katy. *Phytopathology* 83:375-382. 1993.
- LAWRENCE, G.J., MAYO, E. & SHEPERD, K.W. Interactions between genes controlling pathogenicity in the flax rust fungus. *Phytopathology* 71:12-19. 1981.
- LEUNG, H. Genetic and cytological characterization of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara (Ph.D. Thesis). Madison. University of Wisconsin. 1984.
- LEUNG, H., BORROMEIO, E.S., BERNARDO, M.A. & NOTTEGHEM, J.L. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 78:1227-1233. 1988.
- SILUE, D., THARREAU, D. & NOTTEGHEM, J.L. Identification of *Magnaporthe grisea* avirulence genes to seven rice cultivars. *Phytopathology* 82:1462-1466. 1992.
- URASHIMA, A.S., HASHIMOTO, Y., DON L.D., KUSABA, M., TOSA, Y., NAKAYASHIKI, H. & MAYAMA, S. Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homologue of retrotransposon MGR583. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 65:429-436. 1999.
- URASHIMA, A.S. & KATO, H. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. *Summa Phytopathologica* 20:107-112. 1994.
- VALENT, B., FARRAL, L. & CHUMLEY, F.G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. *Genetics* 127:87-101. 1991.
- ZEIGHER, R.S., CUC, L.X., SCOTT, R.P., BERNARDO, M.A., CHEN, D.H., VALENT, B. & NELSON, R. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology* 85:443-451. 1995.