

Ocorrência de variabilidade genética interlesão em *Pyricularia grisea*

Maycon Eduardo Nicoletti¹, Leonardo Bitencourt Scoz²,
Ana Paula Boni³ e Fernando Adami Tcacenco⁴

Resumo – A principal doença da cultura do arroz é a brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., que pode apresentar variabilidade genética tanto entre cepas isoladas de diferentes locais ou lesões quanto entre cepas oriundas de uma mesma lesão, indicando o potencial mutativo desse fungo. Por meio de Rep-PCR, baseada no elemento repetitivo Pot-2, foi levantada a variabilidade genética de 64 isolados de *P. grisea* originados de lesões de seis panículas de arroz ‘Epagri 108’. Não houve diferenças genéticas intralesão, porém houve variabilidade genética interlesão para isolados de uma das panículas, que apresentaram três padrões moleculares distintos, indicando a coexistência, em um mesmo genótipo de arroz, de várias cepas do fungo. Isto pode ter implicações em levantamentos de ocorrência de raças, bem como em trabalhos de melhoramento genético da cultura do arroz para resistência à brusone.

Termos para indexação: *Magnaporthe grisea*, brusone, Rep-PCR, Pot-2.

Ocorrence of interlesion genetic variability in *Pyricularia grisea*

Abstract – Rice blast, caused by *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., is the most severe disease of rice. This fungus may present high genetic variability among strains from different locations or lesions, as well as, within lesions, indicating its mutational potential. The variability of 64 isolates of *P. grisea* from ‘Epagri 108’ rice panicles was surveyed using Rep-PCR, based on the repetitive element Pot-2. No intralesion genetic differences were found. However, interlesion genetic differences were found for strains from one of the panicles, which presented three different molecular patterns, indicating the coexistence of more than one strain of the fungus in the same rice genotype. This may have implications in surveys as well as in genetic improvement of rice for blast resistance.

Index terms: *Magnaporthe grisea*, blast disease, Rep-PCR, Pot-2.

Dentre as doenças que ocorrem no arroz cultivado, a brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. [telomorfo: *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.], é a mais severa. *P. grisea* apresenta alta variabilidade genética, e os mecanismos da formação de novas raças são alvo de intensos estudos,

envolvendo trocas genéticas entre cepas, inserções de elementos de transposição, mutações e deleções (Kistler & Miao, 1992). A alta variabilidade genética do fungo é a principal causa da perda de resistência genética das cultivares de arroz à brusone. O estudo da variabilidade de *P. grisea* pode ser realizado pela

inoculação de isolados em um conjunto de cultivares diferenciadoras que apresentam diferentes genes de resistência. Complementando e às vezes substituindo essa estratégia, muitos trabalhos vêm sendo realizados com o DNA do fungo, sendo que o seqüenciamento de seu genoma identificou transposons,

Aceito para publicação em 24/4/07.

¹Biólogo, Epagri/Estação Experimental de Itajaí, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC, fone: (47) 3341-5244, e-mail: maycon_bio@hotmail.com.

²Estudante de Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí – Univali, e-mail: zicoscoz@yahoo.com.br.

³Estudante de Ciências Biológicas, Universidade Regional de Blumenau – Furb –, e-mail: aninhaboni@hotmail.com.

⁴Eng. agr., Ph.D., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, e-mail: tcacenco@epagri.sc.gov.br.

denominados Pot-2, que se repetem em torno de cem vezes (Kachroo et al., 1994). A técnica de Rep-PCR (George et al., 1998) consiste na amplificação das seqüências que flanqueiam ambos os lados do Pot-2, gerando fragmentos de tamanhos variados, o que o torna um promissor marcador molecular no estudo de variabilidade genética de *P. grisea*.

Uma série de trabalhos tem demonstrado a ocorrência de variabilidade em isolados monospóricos *in vitro* (Bedendo & Prabhu, 2005). No campo, isolados obtidos de uma única lesão têm o potencial para originar várias raças fisiológicas diferentes (Bedendo et al., 1979), o que pode comprometer os estudos populacionais e a durabilidade da resistência genética das cultivares à brusone.

Objetivou-se, neste trabalho, levantar diferenças genéticas entre isolados de *P. grisea* de diferentes lesões ocorrendo em uma mesma panícula. O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fitopatologia e de Biotecnologia Vegetal da Epagri/Estação Experimental de Itajaí – EEI. Foram coletadas seis panículas de plantas diferentes de arroz da cultivar Epagri 108 com sintomas de brusone, provenientes de um campo artificial de infecção da EEI ('boi-de-mamão') onde existiam genótipos diferentes de arroz e várias cepas do fungo. De cada panícula, foram selecionadas três lesões, das quais foram realizados isolamentos monospóricos, obtendo-se 64 isolados de *P. grisea*. O cultivo foi efetuado em placas de Petri com 20ml de meio BDA contendo quatro segmentos de papel filtro com 1cm², segundo Scoz et al. (2006), metodologia esta doravante denominada Método da Sobreposição do Papel (MSP). Após incubação por 10 dias, os segmentos de papel-filtro com sobreposição de micélio foram retirados e submetidos à extração do DNA segundo protocolo descrito por Scott et al. (1993), baseado em SDS, acetato de potássio e isopropanol, com posterior tratamento com RNase A. A quantificação e a qualificação de DNA foi feita através de fluorômetro (Bio-Rad VersaFluor™ corante Hoescht 33258) e corrida eletroforética em gel de agarose.

Com o DNA extraído aplicou-se

a técnica de Rep-PCR, baseada no elemento repetitivo Pot-2. A amplificação enzimática foi realizada em duplicata e em momentos distintos, nas condições descritas por George et al. (1998), em reações de 25µl com aproximadamente 50ng de DNA genômico, 3mM de MgCl₂, 600µM de dNTPs, 2U de enzima Taq polimerase Platinum, 0,5µM de cada iniciador (Pot2-1 5'CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT3' e Pot2-2 5'CCCTCATTCGTCACACGTTTC3'), sendo o restante do volume completado com tampão de PCR (20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50mM KCl). A ciclagem se deu em um termociclador PTC-100 (M.J. Research, Inc.), nas seguintes condições: desnaturação inicial de 2min30seg a 95°C; 4 ciclos de 1min a 94°C (desnaturação), 1min a 62°C (anelamento) e 10min a 65°C (extensão); 26 ciclos de 30seg a 94°C, 1min a 62°C e 10min a 65°C; e extensão final de 15min a 65°C.

Os fragmentos foram submetidos à corrida eletroforética por 150 minutos em géis de agarose 0,9% e, posteriormente, corados com brometo de etídio. Para estimativa do tamanho dos fragmentos, foi utilizado o marcador de peso molecular de 1Kb Plus (Invitrogen®). Os dados foram convertidos em presença/ausência de bandas em uma matriz de similaridade submetida à análise de conglomerados, gerando um cladograma baseado no coeficiente de Jaccard através do sistema UPGMA-NTSYS (Rohlf, 2000).

Foram amplificadas 11 bandas, variando de aproximadamente 1.200 pares de bases (pb) a 18.000pb (Figura 1), porém apenas as bandas de 1.300pb e 1.350pb foram polimórficas, sendo estas utilizadas na análise. Foram encontrados três padrões: (i) ausência das bandas polimórficas, (ii) presença da banda de 1.350pb e (iii) presença das bandas de 1.300pb e 1.350pb. A análise de conglomerados resultou na formação de três grupos (Figura 2), representando os três padrões genéticos distintos.

Das seis panículas analisadas, cinco não apresentaram diferenças genéticas entre os isolados de diferentes lesões. No entanto, os diferentes isolados de uma das panículas apresentaram padrões distintos entre si. A baixa variabili-

dade genética dos isolados é condizente com a procedência destes, sendo da mesma cultivar e área, embora as coletas tenham sido feitas em um infectário artificial onde existiam vários genótipos diferentes de arroz, e várias cepas do fungo. Essa baixa variabilidade pode ser explicada pelo sistema gene-a-gene (Flor, 1971), em que os genes de avirulência (Avr) do patógeno apresentam uma correspondência com genes de resistência (R) do hospedeiro (Silué et al., 1992). Portanto, a cultivar torna-se seletiva à raça do patógeno que possui o gene Avr, e assim o número de raças do fungo que possam vir a infectar o hospedeiro torna-se limitada.

Por outro lado, a existência de diferentes padrões genéticos nos nove isolados de uma das panículas analisadas (Figura 2) corrobora a premissa inicial deste trabalho, que postulava a coexistência de diferentes cepas genéticas do fungo em uma mesma panícula ou lesão. Essa premissa foi baseada em resultados anteriores, que demonstraram haver várias raças fisiológicas diferentes em uma única lesão a campo (Bedendo et al., 1979).

Futuros trabalhos deverão verificar a correspondência entre a constituição genética dessas cepas e sua virulência em cultivares diferenciadoras. Na eventualidade de haver diferenças na virulência entre essas cepas, ficará patente a necessidade de se incorporarem múltiplos genes de resistência em uma mesma cultivar, conferindo assim resistência horizontal à brusone.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A existência de apenas três padrões de bandas indica a baixa variabilidade genética dos isolados analisados.
- Há diferenças genéticas interlesão, porém não há diferenças genéticas intralesão para os isolados da cultivar Epagri 108 analisados.
- Lesões de diferentes panículas podem apresentar o mesmo padrão genético.

Agradecimento

Ao CNPq pelas bolsas concedidas aos dois primeiros autores – Edital 014/2004, Projeto 507096/2004-5.

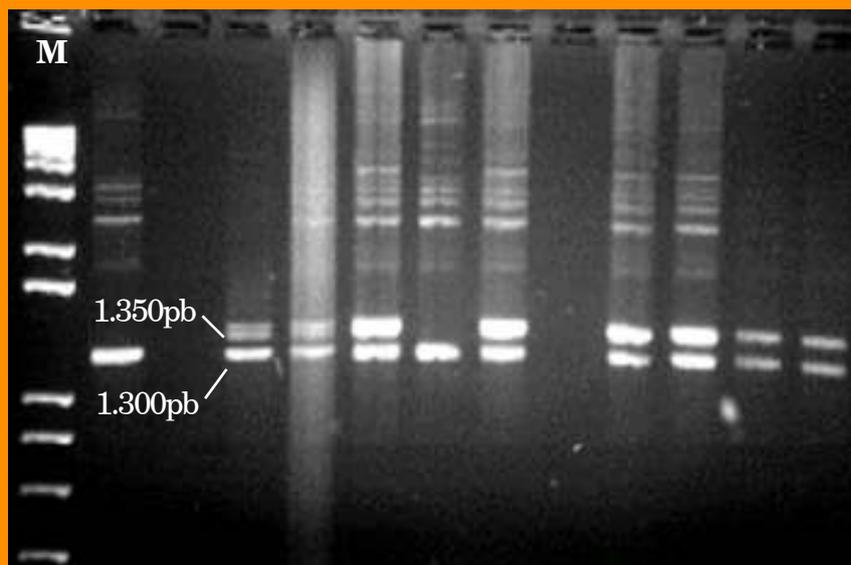


Figura 1. Padrões de bandas encontrados em isolados do fungo *Pyricularia grisea* originados de diferentes panículas da cultivar de arroz *Epagri 108* com sintomas de brusone. *Epagri / E.E. Itajaí, 2006*

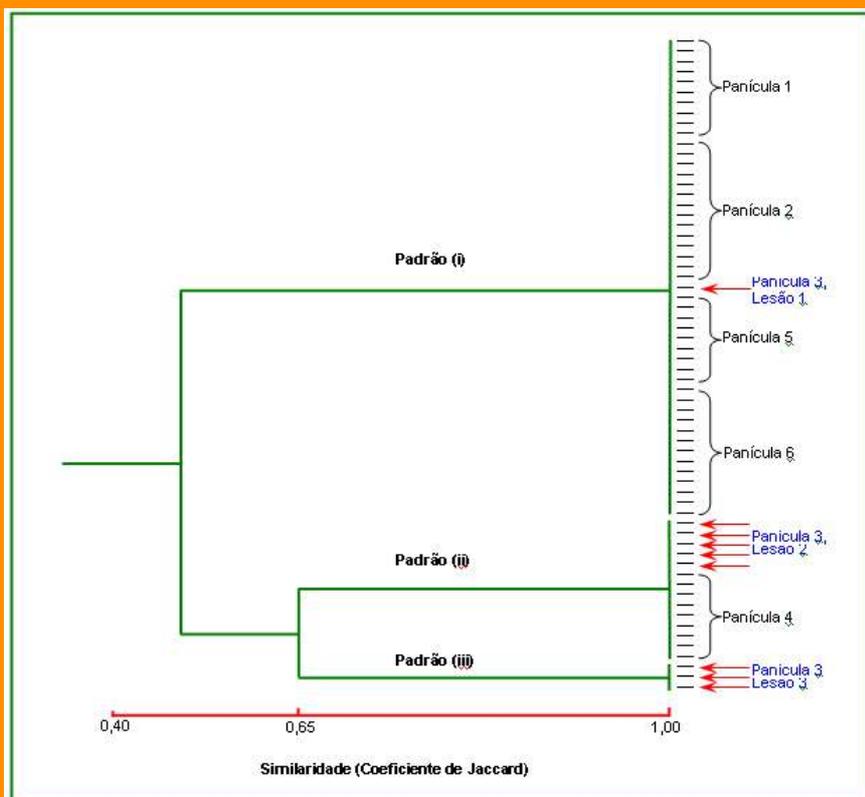


Figura 2. Cladograma baseado nos padrões genéticos de 64 isolados de *Pyricularia grisea* originados de 18 lesões de seis diferentes panículas (três lesões por panícula) de arroz da cultivar *Epagri 108*. *Epagri / E.E. Itajaí, 2006*

Literatura citada

1. BEDENDO I.P.; PRABHU A.S. Doenças do arroz – *Oryza sativa*. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M., et al. (Ed). *Manual de fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 79-90.
2. BEDENDO, I.P.; RIBEIRO, A.S.; CARDOSO, C.N. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae*, agente causal da brusone no arroz. *Summa Phytopathologica*, v. 5, p. 106-109, 1979.
3. FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.
4. GEORGE, M.L.C.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S. et al. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, n. 3, p. 223-229, 1998.
5. KACHROO, P.; LEONG, S.A.; CHATTOO, B.B. Pot-2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular General Genetics*, Berlin, v. 245, p. 339-348, 1994.
6. KISTLER, H.C.; MIAO, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, 1992.
7. ROHLF, F.J. *NTSYS-pc, version 2.10m: Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Setauket, New York: Exeter Software, 2000. 1 CD-ROM.
8. SCOTT, R.P.; ZEIGLER, R.S.; NELSON, R.J. A procedure for miniscale preparation of *Pyricularia grisea* DNA. *Intl. Rice Res. Notes*, v. 18, n. 1, p. 47-48, 1993.
9. SCOZ, L.B.; NICOLETTI, M.E.; MIURA, L. et al. Nova metodologia para obtenção de material genético para estudos de biodiversidade de *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. SC. *Anais eletrônicos...* São Paulo: SBPC/UFSC, 2006. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra>>. Acesso em: 27 mar. 2007.
10. SILUÉ, D.; NOTTEGHEM, J.L.; THARREAU, D. Evidence for a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa*-*Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology*, St. Paul, v. 82, p. 577-580, 1992.