UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

IDENTIFICAÇÃO DA COMPATIBILIDADE, SEXUALIDADE, FERTILIDADE E AVIRULÊNCIA EM POPULAÇÕES DE *Magnaporthe oryzae*, DE LAVOURAS DE ARROZ BRASILEIRAS

LORENA FERREIRA PEIXOTO

Orientadora:
Prof[a]. Marta Cristina Corsi de Filippi

Agosto - 2014

sistema de bibliotecas ufg

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: LORENA FERREIRA PEIXOTO

Título do trabalho: IDENTIFICAÇÃO DA COMPATIBILIDADE, SEXUALIDADE, FERTILIDADE E AVIRULÊNCIA EM POPULAÇÕES DE *Magnaporthe oryzae*, DE LAVOURAS DE ARROZ BRASILEIRAS

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Lorena Ferreira Peixoto
Assinatura do (a) autor (a) [2]

Data: 11 / 01 / 17

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

[2] A assinatura deve ser escaneada.

LORENA FERREIRA PEIXOTO

IDENTIFICAÇÃO DA COMPATIBILIDADE, SEXUALIDADE, FERTILIDADE E AVIRULÊNCIA EM POPULAÇÕES DE *Magnaporthe oryzae*, DE LAVOURAS DE ARROZ BRASILEIRAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Fitossanidade.

Orientadora:

Profª. Drª. Marta Cristina Corsi de Filippi

Co-orientador:

Dr. Anne Sitarama Prabhu

Goiânia, GO - Brasil

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG

Peixoto, Lorena Ferreira.
P379i Identificação da compatibilidade, sexualidade, fertilidade e avirulência em populações de *Magnaporthe oryzae*, de lavouras de arroz brasileiras [manuscrito] / Lorena Ferreira Peixoto. - 2014.
73 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Marta Cristina Corsi de Filippi; Co-orientador: Anne Sitarama Prabhu
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2014.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras e tabelas.

1. Arroz 2. Oryza sativa 3. Arroz–Genética vegetal 4.Brusone. I.Título.

CDU 633.18

Permitido a reprodução total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - A autora

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

UFG

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LORENA FERREIRA PEIXOTO - Aos quinze dias do mês de agosto do ano de dois mil e quatorze (15.08.2014), às 08h30min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Drª. Marta Cristina Corsi de Filippi - Orientadora/Presidente, Prof. Dr. Érico de Campos Dianese e Dr. João Leodato Nunes Maciel, para, em sessão pública realizada no Auditório do PPGA da Escola de Agronomia da UFG, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada: **"IDENTIFICAÇÃO DA COMPATIBILIDADE, SEXUALIDADE, FERTILIDADE E AVIRULÊNCIA EM POPULAÇÕES DE *Magnaporthe oryzae*, DE LAVOURAS DE ARROZ BRASILEIRAS"**, de autoria de **Lorena Ferreira Peixoto**, discente do curso de **Mestrado**, na área de Concentração em **Fitossanidade**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Drª. Marta Cristina Corsi de Filippi, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida a autora da Dissertação que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a examinanda, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. De acordo com a Resolução nº 1051, de 09.09.2011 do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Agronomia, e desde que procedidas às correções recomendadas, a dissertação será considerada **APROVADA** pela Banca Examinadora, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM AGRONOMIA**, na área de concentração em **FITOSSANIDADE**, pela Universidade Federal de Goiás. A mestranda deverá efetuar as modificações sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar a versão definitiva da Dissertação à secretaria do PPGA, no prazo máximo de trinta dias após a data da defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão após o cumprimento do Artigo 69, § 1º e § 2º, da Resolução CEPEC nº 1051, de 09.09.2011. A Banca Examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa Dissertação, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de efetuadas as modificações sugeridas. No caso da discente titulada não providenciar a publicação de seu trabalho final em forma de artigo(s) científico(s) no prazo de seis meses, após a data da defesa, serão aplicados os dispositivos do Artigo 70, § 1º e § 2º, da mesma Resolução. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12h20min a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Welinton Barbosa Mota, Secretário do PPGA, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em quatro vias de igual teor.

Drª. Marta Cristina Corsi de Filippi
Presidente - Embrapa Arroz e Feijão

Dr. João Leodato Nunes Maciel
Membro – Embrapa Trigo

Prof. Dr. Érico de Campos Dianese
Membro – EA/UFG

Declaração
Declaro para os devidos fins que, de acordo com o Regulamento do Programa de Pós - Graduação em Agronomia (PPGA), este documento não tem valor de Conclusão de curso de Pós - Graduação.
Goiânia, 22 de Agosto de 20 14

LORENA FERREIRA PEIXOTO

IDENTIFICAÇÃO DA COMPATIBILIDADE, SEXUALIDADE, FERTILIDADE E AVIRULÊNCIA EM POPULAÇÕES DE *Magnaporthe oryzae*, DE LAVOURAS DE ARROZ BRASILEIRAS

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 15 de Agosto de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:

Dr. João Leodato Nunes Maciel Membro – Embrapa Trigo	Prof. Dr. Érico de Campos Dianese Membro – Universidade Federal de Goiás (EA)

Profª. PhD. Marta Cristina Corsi de Filippi
Orientadora – Embrapa Arroz e Feijão

Goiânia, Goiás
Brasil

Aos meus pais, Divina e Léo
Ao meu namorado, Marcelo
Ao meu irmão, Rafael
À minha madrinha, Ábias
Aos meus avós

DEDICO.

"90% do sucesso se baseia simplesmente em insistir"
Woody Allen

"A descoberta consiste em ver o que todo mundo viu e pensar o que ninguém pensou"
A. Szent-gyorgyi

"A imaginação é mais importante que o conhecimento"
A. Einstein

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade da realização deste mestrado.

À Embrapa arroz e feijão, pela oportunidade de realização da pesquisa.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPEG, pelo apoio financeiro.

À Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi, pela orientação, paciência, atenção, amizade.

Ao Dr. Anne Sitarama Prabhu, pelo incentivo, empréstimo de conhecimentos, amizade.

Aos membros da banca, pela atenção e prontidão para participar da avaliação deste trabalho.

Ao Marcelo pelo amor, carinho, atenção, paciência, apoio, incentivo, companheirismo.

Aos meus pais, minha tia e meu irmão, pelo apoio, mesmo sem entender.

Aos companheiros de laboratório Alan, Amanda, Bárbara, Bruna, Carmen, Gabriela, Fábio, Leilane, Rafaela, Thatyane pela amizade, paciência, companheirismo, viagens, risadas.

Ao Márcio, pelo incentivo, apoio e amizade.

À Mônica, Ronair, Elder e Alécio pelo apoio e companheirismo.

À professora Walquíria pela dedicação, apoio, incentivo.

Às colegas Kellen, Jaqueline e Leila pelo apoio.

Às 'Luluzinhas', pela amizade de toda vida.

Às 'Azamigas', pelas boas risadas, viagens e momentos internacionais.

À Cia. de Dança Olhus, pela descontração e paciência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste curso.

AGRADEÇO.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....8
LISTA DE FIGURAS.....9
RESUMO.....11
ABSTRACT 12

1 INTRODUÇÃO.....13

2 REFERENCIAL TEÓRICO.....15
2.1PLANTA: *Oryza sativa*.....15
2.2 PATÓGENO: *Magnaporthe oryzae*.....16
2.3 INTERAÇÃO *Oryza sativa*/*Magnaporthe oryzae*.....18
2.3.1 **Ciclo de vida do patógeno e infecção do arroz**.....18
2.3.2 **Genes de Resistência (R)** 20
2.3.3 **Genes de Avirulência (Avr)** 22
2.3.4 **Interação de genes de resistência e avirulência**.....23
2.3.5 **Variabilidade do fungo**.....25
2.4 CARACTERÍSTICAS SEXUAIS DO FUNGO.....27
2.4.1 ***Mating type***.....28
2.4.2 **Sexualidade e Fertilidade**.....29

3 MATERIAL E MÉTODOS.....31
3.1 COLEÇÃO E ARMAZENAMENTO DE ISOLADOS.....31
3.2 ISOLADOS REFERÊNCIA.....31
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....41
3.4 PCR E ELETROFORESE PARA DETECÇÃO DE *MATING TYPE* E DO GENE *AVR1-CO39*.....42
3.5 CARACTERIZAÇÃO SEXUAL DE *Magnaporthe oryzae*.....43
3.6 MICROSCOPIA.....44
3.6.1 **Microscopia óptica**.....44
3.6.2 **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)** 46

4 RESULTADOS.....47
4.1 COLEÇÃO E ARMAZENAMENTO DE ISOLADOS.....47
4.2 ISOLADOS REFERÊNCIA.....48
4.3 PCR E ELETROFORESE PARA DETECÇÃO DE *MATING TYPE* E DO GENE *AVR1-CO39*.....48
4.4 CARACTERIZAÇÃO SEXUAL DE *Magnaporthe oryzae*.....49

5 DISCUSSÃO.....57

6 CONCLUSÃO.....65

7 REFERÊNCIAS.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de isolados de campo, subpopulação, origem geográfica, cultivar de origem, patótipos nacionais (P.N.) e internacionais (P.I.), safra, número de coleção, cor da colônia (E - escura ou C - clara), identificação do tipo de compatibilidade e gene de avirulência.....31

Tabela 2. Origem e descrição dos isolados referências de *Magnaporthe oryzae*.....40

Tabela 3. Constituintes da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) dos genes MAT1-1, MAT1-2 e AVR1-CO39.....42

Tabela 4. Relação de isolados de campo, número da coleção, cor da colônia (E - escura ou C - clara), população, avaliados quanto à fertilidade e sexualidade.....50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A, B e C – Microscopia de estruturas de *Magnaporthe oryzae*. A – seta indica o apressório formado; B e C – conídios com calcoflúor white (se liga a quitina) (Foto cedida por Rodríguez); D – foto em microscópio eletrônico de varredura, seta indica conídios ligados ao conidióforo.....17

Figura 2. Ciclo de vida de *Magnaporthe oryzae* (Fonte: Talbot, 2009).....19

Figura 3. Distribuição de *mating types* em uma coleção não-populacional de isolados de *M. oryzae* de arroz (amostras coletadas em escala continental). (a) Proporção de MAT1-1 (preto) e MAT1-2 (branco) em uma coleção de 3.800 isolados. Fonte: Saleh et al. (2012b).....29

Figura 4. Pareamento dos isolados através do método de *three-points*. A – modelo do método *three-points*, em azul KA-3 (*MAT1-1*), em amarelo GUY11 (*MAT1-2*), em verde isolado de campo. B – pareamento entre KA-3, GUY11 e o isolado de campo Py 10.873 após 21 dias de incubação em BOD, a 21°C, sob iluminação constante.....43

Figura 5. Variação morfológica em colônias de *Magnaporthe oryzae*. A – 1) colônia de *M. oryzae* com formação de setor; 2) colônia de coloração cinza desenvolvida a partir do setor cinza da placa 1; 3) colônia de coloração esbranquiçada desenvolvida a partir do setor esbranquiçado da placa 1 (Fonte: Gonçalves, 2013). B – colônias derivadas de setores formados da colônia original; seta indica o início de formação de setor; C – variação da cor das colônias, derivada de um mesmo isolado, crescido homogeneamente, sem formação de setores; cultivado em meio de cultura líquido de extrato de levedura, sob as mesmas condições ambientais.....46

Figura 6. Resultado das reações de cadeia da polimerase, em gel de agarose, para detecção dos idiomorfos de *mating type (MAT1-1* ou *MAT1-2*) e do gene *AVR1-CO39*. L: Marcador molecular de 100 bp; A: Py 184 (*AVR1-CO39* = 1,05 kb), K: KA-3 (*MAT1-1* = 960 bp); G: GUY11 (*MAT1-2* = 802 bp); B: controle negativo, sem DNA; 1-20 são isolados das 19 subpopulações, apresentando *mating type MAT1-2*, caracterizado neste estudo; o gene *AVR1-CO39* foi detectado nos isolados 4 e 8. 1=Py 10.651, 2=Py 10.873, 3=Py 9.978, 4=Py 10.830, 5=Py 10.890, 6=Py 10.182, 7=10.707, 8=Py 10.906, 9=Py 10.915, 10=Py 9.877, 11=Py 10.630, 12=Py 9.938, 13=Py 9.984, 14=Py 10.672, 15=Py 10.599, 16=Py 9.866, 17=Py 9.907, 18=Py 9.928, 19=Py 10.896, 20=Py 10.639.....48

Figura 7. Pareamento do isolado de campo A=Py 10.824, B=Py 10.854, C=Py 10.630 e D=Py 10.915, com os isolados referência KA-3 e GUY11, em placa de Petri, contendo meio de cultura farelo de arroz. A e B – isolados hermafroditas (formação de duas faixas paralelas de peritécios, na intersecção do crescimento micelial de ambos os isolados); C – isolados machos [formação de uma única faixa de peritécio do lado do isolado referência (KA-3)]; D – isolados fêmeas (formação de uma única faixa de peritécio do lado do isolado testado).....49

Figura 8. Estrutura de reprodução sexual de *Magnaporthe oryzae*, denominada peritécio (A, B e C), constituída de ascos (D1) contendo ascósporos (D2). Fotos obtidas em estereomicroscópio (A e B) e microscópio ótico (C e D).....53

Figura 9. Cortes longitudinais de protoperitécios e peritécios formados durante o pareamento dos isolados KA-3 e GUY11, em folhas de arroz esterilizadas. A – protoperitécio na epiderme da folha de arroz; B e C – peritécios e protoperitécios na epiderme abaxial da folha; D e E – peritécios na epiderme adaxial da folha; F – protoperitécio e peritécio na subepidermais (entre as duas camadas de epiderme da planta).....54

Figura 10. Peritécios de *Magnaporthe oryzae*, formados durante o pareamento entre KA-3 e GUY11, registrados por microscopia eletrônica de varredura. A e B – conjunto de peritécios, submersos no micélio, desenvolvidos sobre folha de arroz; C – peritécio isolado submerso e recoberto por micélio; D – conídios (seta) e peritécio formados lado a lado.....55

RESUMO

PEIXOTO, L. F. **Identificação da compatibilidade, sexualidade, fertilidade e avirulência em populações de *Magnaporthe oryzae*, de lavouras de arroz brasileiras.** 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitossanidade) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.[1]

O arroz é cultivado e consumido em todos os continentes, desempenhando um importante papel na dieta de mais da metade da população mundial. O seu cultivo vem sofrendo perdas na produção e na qualidade de grãos, devido a fatores bióticos como a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, que é a principal doença da cultura do arroz, representando uma ameaça à segurança alimentar mundial. O uso de cultivares resistentes é considerado o método mais efetivo para o controle da doença, porém, a alta variabilidade do patógeno resulta em uma rápida suplantação da resistência. Com a descoberta de isolados de alta fertilidade, hermafroditas, fora do centro de origem do arroz, sugere-se que a reprodução sexuada possa estar contribuindo para esta variabilidade genética, o que consequentemente influencia as estratégias apropriadas de controle. O estudo da reprodução sexuada em *M. oryzae* inicia-se com a definição dos tipos compatíveis, característica controlada pelo gene *mating type* com dois idiomorfos (*MAT1-1* e *MAT1-2*); além das características como sexualidade (hermafrodita, fêmea ou macho) e fertilidade (número de peritécios). Outra abordagem de grande importância para a cultura é a detecção de genes de avirulência de *M. oryzae*, visando estudos de sua variabilidade. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi investigar a presença dos genes *MAT1-1* ou *MAT1-2*, e do gene de avirulência *AVR1-CO39*, em isolados coletados em todas as regiões produtoras de arroz do Brasil, além de caracterizá-los quanto à sexualidade e fertilidade. Foram selecionados 208 isolados que forma cultivados em BDA e seus micélios utilizados para extração de DNA e detecção dos genes citados. Para a caracterização sexual, 106 isolados de campo foram pareados em placa de Petri, contendo meio de farelo de arroz, com dois isolados: KA-3 (*MAT1-1*) e GUY11 (*MAT1-2*), os quais apresentam *mating types* e alta fertilidade, conhecidos mundialmente. O gene *AVR1-CO39* foi detectado em apenas dois isolados, e um deles é patogênico à cultivar CO39, portadora do gene de resistência *Pi-CO39(t)*, levantando a possibilidade de que uma mutação possa ter ocorrido, como deleção, o que impossibilita o reconhecimento do efetor pela proteína do gene *Pi-CO39(t)*. Apenas um tipo compatível (*MAT1-2*) foi observado nos 208 isolados de campo. Foi observado também que, entre os 106 isolados analisados, um (0,94%), foi identificado como fêmea; três (2,8%), como hermafroditas; 62 (57,9%), como machos; e 41 (38,3%), como não determinados, sendo considerados inférteis. Observou-se também a formação de peritécios no interior da folha de arroz. Apesar do predomínio de um *mating type*, entre os isolados do arroz, há a possibilidade de ocorrência da reprodução sexuada, devido à presença do outro idiomorfo (*MAT1-1*) em isolados coletados de outras gramíneas, juntamente com a presença de hermafroditas e da fêmea-fértil, com alta fertilidade, de isolados *MAT1-2* identificados nesse trabalho.

Palavras-chave: brusone, *Pyricularia*, variabilidade genética, *mating type*, gene de avirulência.

[1] Orientadora: Profa. PhD. Marta Cristina Corsi de Filippi. EMBRAPA/UFG.

ABSTRACT

PEIXOTO, L. F. **Mating type, sexuality, fertility and avirulence identification of *Magnaporthe oryzae* from rice fields in Brazil.** 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitossanidade) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.[1]

Rice is a worldwide cultivated and consumed grain, playing an important role on the diet of half of the world's population. Several losses in production and grain quality have been reported due to biotic factors, such as rice blast, caused by *Magnaporthe oryzae*, which is the major disease in rice crops. One of the most effective ways to control this disease is the use of resistant cultivars. However, the high genetic variability of the pathogen results in a rapid resistance loss. The discovery of highly fertile, hermaphrodites individuals outside of the rice center of origin, suggests that sexual reproduction may contribute to this genetic variability, which influences the appropriate control strategies. *M. oryzae* reproduction studies begins with the determination of mating types, controlled by two idiomorphic genes (*MAT1-1* e *MAT1-2*), along with the sexuality (hermaphrodite, female or male) and fertility (number of perithecia). Another important approach under investigation for this crop is the detection of avirulence genes from *M. oryzae*, to understand the pathogen variability. Our study focused on the investigation of *MAT1-1* or *MAT1-2* genes, and the presence of the avirulence gene *AVR1-CO39*in field isolates collected from all rice production regions from Brazil. Sexuality and fertility were also characterized. 208 selected isolates were cultivated in PDA medium and the fungus mycelia were used for DNA extraction and PCR detection of the above-mentioned genes. For the sexual characterization, 106 field isolates were paired in Petri dishes containing rice bran medium with two reference isolates: KA-3 (*MAT1-1*) and GUY11 (*MAT1-2*), known worldwide for their mating type and high fertility. The *AVR1-CO39* gene was only detected in two field isolates. One of them was able to infect the rice cultivar CO39, which has the resistance gene *Pi-CO39(t)*. A mutation on *AVR1-CO39* gene could impair the recognition of its effector by *Pi-CO39(t)*protein. Only one mating type (*MAT1-2*) was observed on the 208 field isolates. It was also observed that, among the 106 analyzed isolates, one (0,94%) was identified as a female; three (2,8%) as hermaphrodite, 62 (57,9%) as male; and 41 (38,3%) were not determined, considered infertile. We also observed the formation of perithecia inside of rice leaves. Despite the predominance of one mating type among rice field isolates, there is a possibility that sexual reproduction may occur as the other idiomorphic gene (*MAT1-1*) is present on field isolates collected from other Poaceae. The identification of highly fertile hermaphrodites and fertile-female individuals in this study also highlight this possibility.

Keywords: rice blast, *Pyricularia*, genetic variability, mating type, avirulence gene.

[1] Adviser: Prof. PhD. Marta Cristina Corsi de Filippi. EMBRAPA/UFG.

1 INTRODUÇÃO

O arroz comum (*Oryza sativa* L.) está entre as principais culturas cultivadas no mundo, ocupando a terceira posição em área colhida [163 milhões de hectares (ha)], ficando atrás somente do trigo (215 milhões ha) e do milho (177 milhões ha). A produção mundial de arroz posiciona-se, também, em terceiro, produzindo 719 milhões de toneladas (ton), na safra 2011/2012, sendo que o Brasil é o nono país com maior produção (11,5 milhões ton) (FAO, 2013). Apesar da alta produtividade, o Brasil importa uma média aproximada de um milhão de toneladas por ano para atender a demanda (CONAB, 2013) evidenciando a sua importância social, cultural e econômica para a população.

Estimativas indicam que a produção de arroz deverá ser dobrada, até 2050, para atender a demanda da população mundial, sendo que a América Latina e África destacam-se como as únicas regiões com potencial para essa expansão (Guimarães et al., 2006). Devido a sua capacidade de ser implantada em diferentes condições ambientais e a sua qualidade nutritiva, a cultura do arroz também se enquadra como uma das culturas que podem auxiliar no combate à fome mundial.

A produção de arroz pode sofrer perdas causadas por fatores abióticos (deficiência hídrica, toxidade por ferro, profundidade de semeadura, etc) e/ou bióticos (doenças, pragas, plantas daninhas, etc) entre os quais se destaca a brusone, a principal doença causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, presente em todas as áreas produtoras. A adoção de um manejo adequado da cultura contribui para o controle da doença. Entre essas práticas destacam-se a semeadura em épocas recomendadas, o controle de plantas daninhas, a adubação equilibrada com as necessidades do solo e da cultura, o uso de cultivares resistentes e a aplicação de agrotóxico, sendo os dois últimos os mais utilizados pelos agricultores.

Em muitas plantações, produtos como os fungicidas ainda são os principais meios de controle de doenças, apesar de serem agressivos ao meio ambiente (WWF, 2009) e de apresentarem eficiência variável de controle entre as diferentes cultivares (Scheuermann et al., 2002). O uso da resistência genética é considerado a estratégia que

apresenta uma menor agressão ao meio ambiente, ao agricultor e ao consumidor, sendo uma estratégia de controle mais barata e de mais fácil utilização (Bespalhok et al., 2014), mas possui a desvantagem de não ser durável devido à variabilidade genética complexa e acentuada das populações do fitopatógeno (Ou et al., 1965; Ou, 1980; Correa-Victória & Zeigler, 1995; Levy et al., 1993; Filippi et al., 2011), permitindo que novos patótipos aumentem em frequência, ameaçando o potencial produtivo das cultivares de arroz.

A identificação de patótipos de *M. oryzae* permite a detecção de alguns genes de avirulência que auxilia na identificação e seleção de fontes de resistência à doença. No entanto, o monitoramento da ocorrência do número de patótipos é uma estratégia de difícil execução, tendo em vista a alta variabilidade de *M. oryzae*. Devido a essa grande variabilidade de patótipos, especula-se que o fungo submeta-se a recombinação sexuada no campo. Entretanto, as estruturas de reprodução sexual do fungo nunca foram encontradas em condições naturais.

Mesmo sabendo da complexidade de *M. oryzae*, a busca por seleção durável tem sido feita há muitos anos, e metodologias inovadoras sempre aparecem e oferecem uma nova perspectiva de se conseguir a resistência durável. Com isso, *M. oryzae* tem sido estudada por muitos grupos, com diferentes abordagens, como estudo de populações, genômica, transcriptoma e proteoma, visando explicar e compreender melhor sua variabilidade e biologia.

Dentre os estudos que visam compreender a variabilidade, os estudos de determinação de tipos de compatibilidade (*mating type*), sexualidade e fertilidade possibilitam averiguar a possibilidade ou não de ocorrer reprodução sexual em condições de campo. Para que a reprodução sexuada em *M. oryzae* ocorra, é necessário, primeiramente, que dois indivíduos sejam compatíveis, ou seja, que possuam um dos dois genes de *mating type* (*MAT1-1* e *MAT1-2*), que sejam de sexos opostos, e férteis.

Devido à constante suplantação da resistência de cultivares melhoradas geneticamente nos campos produtores do Brasil, essa dissertação visou em averiguar se a grande variabilidade genética dos patótipos observadas nos campos brasileiros pode ser atribuída também à reprodução sexuada. Assim, foi realizada a detecção e distribuição dos genes de *mating type* e a avaliação da sexualidade e fertilidade de isolados coletados em diversas regiões produtoras de arroz no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTA: *Oryza sativa*

O arroz pertence ao filo Streptophyta, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Poales, família Poaceae (gramínea), tribo Oryzae, gênero *Oryza* (NCBI, 2014), apresentando 22 espécies. Dentre essas, destacam-se a *O. glaberrima* Steud., cultivada no oeste da África e da Ásia e *O. sativa* L., cultivada em todo o mundo. Todas as espécies do gênero *Oryza* são diploides, possuem o número básico de 12 cromossomos (2n=24), enquanto sete espécies silvestres são tetraploides (4n=48) (Chang, 1996). O genoma deste gênero tem aproximadamente 430 Mb (Saji et al., 2001).

O arroz é uma planta autógama, monocotiledônea e possui ciclo anual, sendo cultivada em todos os continentes. *Oryza sativa* é uma espécie naturalmente hidrófila, contudo, com o processo evolutivo, e a interferência do homem, esta cultura se adaptou às diversas condições ambientais, podendo ser cultivada em sistemas de várzea (irrigado) e terras altas (sequeiro).

A origem do gênero *Oryza* ainda não é determinada. Convencionou-se dizer que o arroz tem origem asiática, como na região do vale do rio Yangtze (Vaughan, 2008). Porém, de acordo com Roschevicz (1931), o gênero pode ser oriundo do continente africano; ou do supercontinente "Gondwana", que após sua sedimentação, possibilitou a distribuição de espécies em distintos habitats (Chang, 1976).

Consequentemente, há também controvérsias quanto à domesticação. Zhu & Ge (2005) relatam que as subespécies *indica* e *japonica* foram originadas após a domesticação da espécie *O. sativa*. Já Huang et al. (2012), em um estudo mais recente e aprofundado, relataram que o arroz *Oryza sativa japonica* foi domesticado primeiro, de uma população específica de *O. rufipogon,* ao redor da área central do Rio das Pérolas (*Pearl River*), no sul da China, enquanto o arroz *Oryza sativa indica* foi posteriormente desenvolvido a partir de cruzamentos entre arroz *japonica* e arroz selvagem local, sendo essas as primeiras cultivares a serem distribuídas pelo Sudeste e Sul da Ásia distribuídas pelo Sudeste e Sul da Ásia.

2.2 PATÓGENO: *Magnaporthe oryzae*

Uma revisão da associação da revista Molecular Plant Pathology, juntamente com a comunidade internacional, nomeou *Magnaporthe oryzae* como o fungo fitopatogênico de maior importância científica e econômica, ficando em primeiro lugar em uma lista de 10 selecionados (Dean et al, 2012). Essa escolha está ligada ao fato de que este fungo é o agente causal da doença mais destrutiva do arroz no mundo (Ou, 1980). Sua importância é ressaltada pelo fato de que cerca de metade da população mundial depende do arroz como principal fonte de calorias em sua alimentação (Khush, 2005).

O agente fitopatogênico da brusone no arroz pode ser encontrado referenciado na literatura com vários nomes. *Pyricularia oryzae* é utilizado para se referir à fase assexuada do fungo (anamorfo), a qual é comumente encontrada no campo. Inicialmente, ela foi denominada *Trichothecium griseum* Cooke (Cooke & Ellis, 1879). Em 1880, esta espécie passou a ser chamada de *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. e classificada como espécie-tipo do gênero *Pyricularia*, estabelecida por Saccardo, ao parasitar a gramínea *Digitaria sanguinales* nos Estados Unidos. Em 1891, na Itália, Cavara descreveu a brusone em arroz e denominou a espécie como *P. oryzae*. Em 1901, Kawakami mostrou que *P. grisea* e *P. oryzae* se tratavam da mesma espécie. Em 1917, Sawada através de testes de patogenicidade, estabeleceu duas espécies: *P. grisea* infectando *Digitaria sanguinales* e milheto, e *P. oryzae* infectando o arroz, cevada e trigo. Em 1939, Thomas demostrou que *P. oryzae* isolado de arroz causava doença em trigo, cevada, aveia, milho e milheto, enquanto que o isolado de milheto não infectava o arroz. Mesmo com a diferença de patogenicidade, o fungo patogênico ao arroz foi morfologicamente indistinguível de patógenos de outros hospedeiros, e todo o grupo foi definido sob o nome *P. grisea* (Rossman et al., 1990). Entretanto, uma volumosa literatura já havia adotado o nome *P. oryzae*, o qual foi mantido.

A fase anamórfica *Pyricularia oryzae* apresenta conídios (esporos assexuais) piriformes, obclavados, normalmente com dois septos por conídio, com base circular e ápice fino, levemente escuros ou hialinos, com pequeno hilo na base e ligam-se aos conidióforos pelo seu lado mais dilatado (Figura 1). Os conidióforos são longos, septados, simples ou em pequenos feixes, raramente ramificados, simpodiais, geniculados com a parte basal mais larga do conidióforo, de cor marrom pálido (Kimati et al., 2005).

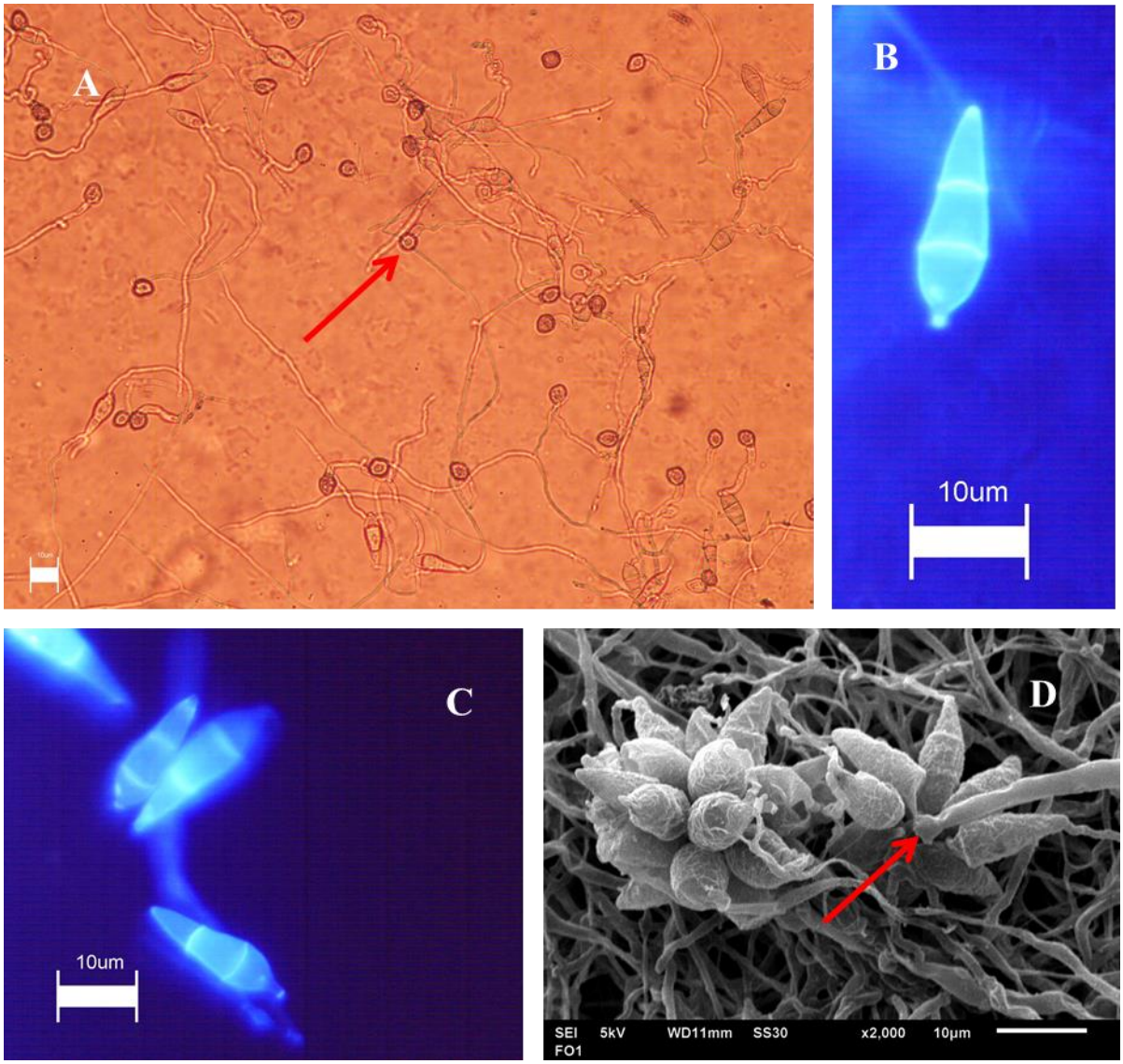

Figura 1. A, B e C – Microscopia de estruturas de *Magnaporthe oryzae*. A – seta indica o apressório formado; B e C – conídios com calcoflúor white (se liga a quitina) (Foto cedida por Rodríguez); D – foto em microscópio eletrônico de varredura, seta indica conídios ligados ao conidióforo

A fase sexual (teleomórfica) foi descoberta por Hebert em 1971, sendo denominada primeiramente de *Ceratosphaeria grisea*, a partir do isolado de *P. grisea* proveniente de *Digitaria sanguinalis*. Em 1972, Krause e Webster criaram o gênero *Magnaporthe* para acomodar a espécie-tipo, *M. salvinii* (Catt), descrita como causadora da podridão da haste do arroz. O teleomorfo dos isolados de *Pyricularia* obtidos de gramíneas assemelhavam-se ao de *Diaporthaceae* e foi sugerido inclui-los no gênero *Magnaporthe* ao invés do gênero *Ceratosphaeria* (Yaegashi & Nishihara, 1976). *Magnaporthe grisea* foi utilizado até que Couch & Kohn (2002), em um estudo com o objetivo de investigar a

relação filogenética entre isolados de *M. grisea* de diferentes hospedeiros, realizou uma genealogia multilocus a partir de fragmentos de sequência de DNA de três genes (actina, beta-tubulina e calmodulina) e de testes de fertilidade entre isolados. Eles concluíram que estes devem ser separados em espécies que infectam *Digitaria spp*. (capim-colchão), denominados de *M. grisea*, enquanto que *M. oryzae* se referiria aos outros isolados caracterizados, incluindo o patogênico ao arroz.

Por determinação do Comitê Internacional de Micologia deve-se referir ao fungo como um holomorfo, ou seja, o fungo deve ser tratado como um único microrganismo quando são conhecidas suas fases assexuada e sexuada. Devido a essa determinação e a descoberta de sua fase teleomórfica, a nomenclatura *Magnaporthe oryzae* será utilizada no decorrer desse trabalho, independente da denominação utilizada nos estudos citados.

Magnaporthe oryzae pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Magnaporthales, família Magnaporthaceae (NCBI, 2014). A fase teleomórfica é classificada como um fungo heterotálico, com peritécio marrom escuro a preto, com bico longo, podendo apresentar-se isoladamente ou em grupos. Os ascos são unitunicadas, cilíndricas, hialinas, com anel de refração em torno de um poro de sua ponta, contendo ascósporos hialinos, com três septos, levemente curvados, que se desenvolvem na base do peritécio. Cada asco contém normalmente oito ascósporos, mas ascos com um menor número de ascósporos são frequentemente observados. Hebert (1971) acredita que a liberação dos esporos seja por liquefação dos ascos e relata que muitos peritécios velhos contêm somente ascósporos livres, sem asco.

2.3 INTERAÇÃO *Oryza sativa*/*Magnaporthe oryzae*

2.3.1 Ciclo de vida do patógeno e infecção do arroz

O ciclo de vida de *M. oryzae* inicia-se com a infecção pelo patógeno que ocorre através de conídios (Figura 2) que entram em contato com a superfície das folhas do hospedeiro, que geralmente é hidrofóbica, e se fixa quando hidratada, com auxílio de uma mucilagem produzida em compartimentos existentes nas duas extremidades (Hamer et al., 1988; Prabhu & Filippi, 2006). A germinação dos conídios ocorre sob condições ambientais favoráveis, umidade de 92 a 96%, e após 30 a 90 minutos na presença de água. Em apenas duas horas, ocorre a formação de um tubo germinativo pela célula basal ou

apical de um conídio. Este emerge de uma das células terminais do conídio, crescendo apicalmente durante quatro horas. Após esse período, cessa-se o crescimento e o tubo germinativo recurva-se e diferencia-se em uma estrutura especializada de infecção, denominada apressório.

Durante a maturação, o apressório desenvolve uma camada de melanina, que é facilmente permeável à água, mas não ao soluto. Isto permite a manutenção de uma alta pressão interna de turgor, possibilitando a penetração. Com a maturação completa, uma hifa estreita de penetração, denominada *peg*, surge do poro central do apressório. Após a penetração, o *peg* de penetração diferencia-se em hifas infectivas primárias, não ramificadas que, por sua vez, desenvolvem hifas invasivas lobadas e bulbosas, nas células da planta (Howard & Valent, 1996; Money & Howard, 1996; Howard & Ferrari, 1989; Lee & Dean, 1993), resultando no desenvolvimento das lesões da brusone (Tucker & Talbot, 2001) e o fungo produz mais conídios para reiniciar o ciclo de infecção (Ding et al., 2009), além de poderem permanecer em restos culturais ou em plantas de arroz que permanecem no campo (Kimati et al., 2005).

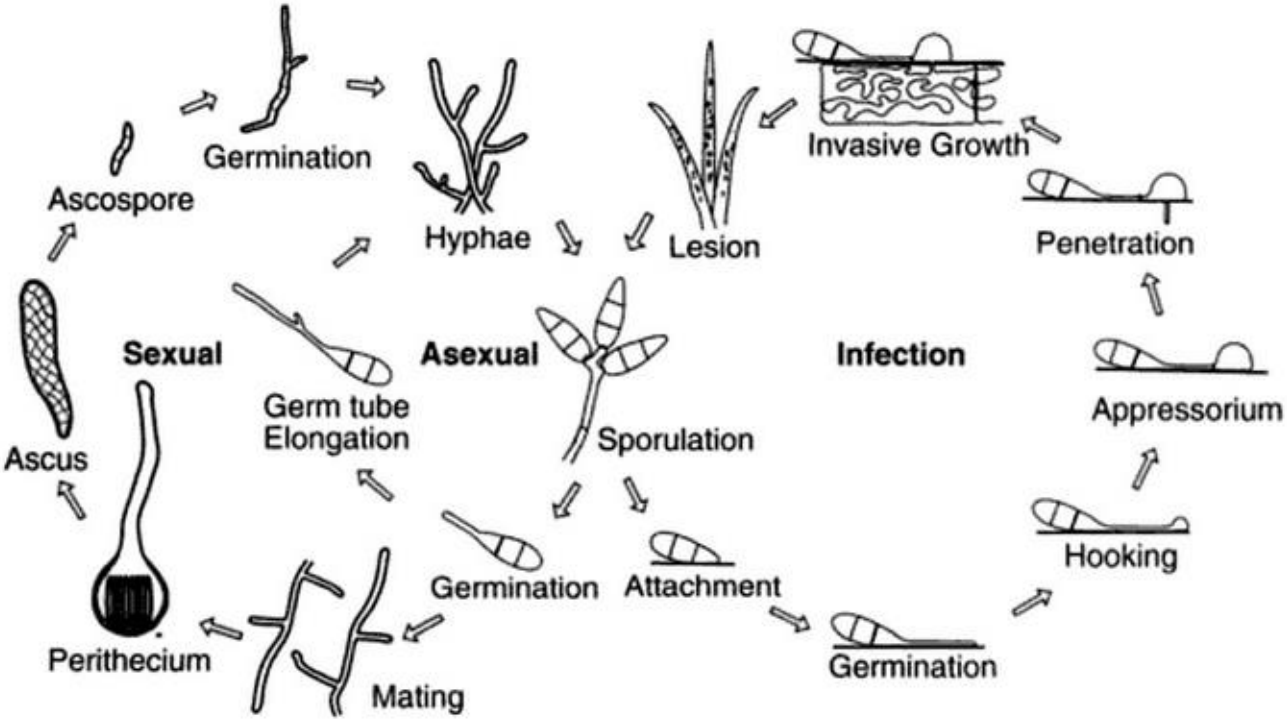

Figura 2. Ciclo de vida de *Magnaporthe oryzae* (Fonte: Talbot, 2009)

Nas folhas, os sintomas iniciam-se com pequenas lesões necróticas, de cor marrom, que crescem, tornando-se elípticas, com margem marrom e centro cinza ou esbranquiçado. As lesões podem coalescer, causando morte da folha, e muitas vezes a morte da planta inteira. Os sintomas nos nós são visualizados a partir do escurecimento da área infectada, impedindo a circulação da seiva e provocando o acamamento da planta ou a quebra no local infectado. Nas panículas, se a infecção ocorrer antes da fase leitosa, a panícula inteira morre, apresentando coloração parda. Se a mesma ocorrer mais tardiamente, os danos são limitados somente às áreas afetadas. Em condições muito elevadas de umidade, o fungo produz conídios nas espiguetas, causando chochamento completo dos grãos na fase leitosa (Prabhu et al., 1995).

Todas as regiões produtoras de arroz são afetadas pela brusone (Khush & Jena, 2009). Apesar do uso de cultivares resistentes à doença, esta resistência é frequentemente suplantada, resultando em cultivares que se tornam suscetíveis, o que pode levar a perdas significantes, variando de 20% a 100%, dentro de um ou dois anos de cultivo (Sobrizal & Anggiani, 2007; Khush & Jena, 2009). Porém, nem todos os indivíduos de *M. oryzae* são capazes de infectar o hospedeiro. Essa capacidade é mediada pela presença ou ausência de genes de resistência (R) no arroz e genes de avirulência (Avr) de *M. oryzae*. Devido a isso, as bases moleculares da interação têm sido alvo de intensos estudos.

2.3.2 Genes de Resistência (R)

O uso de genes de resistência é uma das principais formas de controle da brusone. Vários estudos identificaram mais de 90 genes R de diversas cultivares de arroz à *M. oryzae* (Fukuoka et al., 2014). Até o momento, 21 desses genes foram clonados e caracterizados. São eles: *Pib*, *Pi-ta*, *Pi9*, *Pi2*, *Piz-t*, *Pi36*, *Pi37*, *Pikm*, *Pit*, *Pi5*, *Pid3*, *Pi54* (*Pikh*), *Pish*, *Pik*, *Pik-p*, *Pia*, *Pi25*, *Pb1*, *Pi1*, *Pi-d2* e *Pi21* (Liu et al., 2013).

Dependendo da estrutura e função, os genes de resistência podem ser subdivididos em cinco classes (Agrios, 2005). A maioria das proteínas geradas pelos genes de resistência à brusone no arroz pertence à classe das NBS-LRR (nucleotide-binding site leucine-rich repeats) (Liu et al., 2013). São proteínas citoplasmáticas, que possuem um sítio de ligação a nucleotídeos e uma região rica em leucina em seu C-terminal, como *motifs* (sequências curtas, padrões recorrentes no DNA, que muitas vezes indicam os locais de ligação de sequencias específicas para proteínas). Essas proteínas podem servir como receptores, que ativam a translocação de um fator de transcrição do citoplasma para o

núcleo, onde ativa a transcrição de genes relacionados com a resposta de hipersensibilidade (Agrios, 2005; Chen et al., 2006).

A proteína do gene *Pi-d2* pertence à outra classe, a das RLKs (receptor-like protein kinase), que são proteínas receptoras transmembranas que possuem um *motif* rico em leucina (LRR) extracelular e um domínio serina-treonina quinase intracelular. Essa classe de proteínas recebe o sinal extracelular e o transmite para fosfoquinases intracelulares, desencadeando uma cascata de sinalização (Agrios, 2005; Chen et al., 2006). Já o gene *Pi21*, que codifica uma proteína rica em prolina, possui um possível domínio de ligação a metais pesados e possíveis *motifs* de ligação proteína-proteína, apesar de não estar relacionada com uma resposta patótipo-específica. Os *motifs* dessa proteína e sua não especificidade faz com que essa proteína não seja classifica em nenhuma das 5 classes de gene R (Agrios, 2005; Fukuoka et al., 2009).

As proteínas produzidas pelos genes R das diversas plantas funcionam como sensores, e são capazes de detectar lipopolissacarídeos, peptídeos, quitina, RNA de cadeia dupla, DNA microbiano e outras moléculas de origem microbiana (Ronald & Beutler, 2010). Em arroz, as regiões conservadas de microrganismos (PAMPs), como os peptídeos sulfatados Ax21, quitina, peptídeo das flagelinas e lipopolissacarídeos são capazes de desencadear respostas imunes inatas do hospedeiro (Lee et al., 2009; Desaki et al., 2006).

O locus de resistência presente na planta de arroz, designado de *Pi-CO39(t)* é o que confere resistência a isolados de *Magnaporthe* sp. que carregam o locus de avirulência *AVR1-CO39*. O locus *AVR1-CO39* é conservado em isolados de *Magnaporthe grisea* (que não infectam o arroz), assim o locus *Pi-CO39(t)* tem potencial para ser utilizado para o melhoramento de outros cereais. Ainda não foi relatado nenhum *motif* identificado para *Pi-CO39(t)/AVR1-CO39* (Valent & Khang, 2010).

Pesquisadores tem usado este tipo de genes R em melhoramento genético, até mesmo pela facilidade, pois são geralmente dominantes e conferem altos níveis de resistência. No entanto, a desvantagem de tais genes é que muitas vezes não são duráveis, porque os patógenos podem evoluir passando a reconhecer os genes R (Correa-Victória & Zeigler, 1995; Boyd et al., 2013).

2.3.3 Genes de Avirulência (Avr)

Em um senso geral, efetores são um tipo de proteína que o patógeno secreta no citoplasma da planta, interferindo na defesa da mesma (Hogenhout et al., 2009). Efetoras

Avr são moléculas que podem ser reconhecidas direta ou indiretamente pelas células das plantas por uma proteína de resistência (R) de mesma origem e que pode ativar uma resposta de hipersensibilidade efetiva. Até o momento, 15 proteínas efetoras de *M. oryzae* foram caracterizadas, incluindo nove efetores Avr (*PWL1*, *PWL2*, *AvrPi-ta*, *AvrPiz-t*, *Avr-Pia*, *AvrPii*, *Avr-Pik/km/kp*, *ACE1* e *AVR1-CO39*) e seis outros efetores recém identificados, incluindo quatro proteínas secretadas associadas a fase biotrófica (BAS – biotrophy-associated secreted proteins) *BAS1*, *BAS2*, *BAS3*, *BAS4*, *Slp1* e *MC69* (Liu et al., 2013).

AVR1-CO39 é um gene de avirulência específico da cultivar de arroz CO39 (Valent et al., 1991; Smith & Leong, 1994), sendo identificado pela primeira vez em *M. oryzae* no isolado 2539 por Valent et al. (1991) e clonado por Farman & Leong (1998). A função de avirulência do gene *AVR1-CO39* depende de um gene de resistência, *Pi-CO39* (t), em CO39 seguindo o mecanismo de gene-a-gene (Chauhan et al., 2002). Foi relatado que um locus *AVR1-CO39* intacto não estava presente em nenhum dos isolados de *M. oryzae* do arroz, mas relativamente estáveis e conservados entre a maioria dos isolados de *M. oryzae* que não infectam o arroz (Zheng et al., 2011), o que pode explicar o porquê da maioria dos isolados de *M. oryzae* de arroz serem virulentos em CO39 (Gonçalves, 2013; Farman et al., 2002; Tosa et al., 2005).

Proteínas efetoras são importantes para a interação planta-patógeno. Em fungos, o *motif* de translocação é necessário e suficiente para a internalização de efetores em células de hospedeiros. O fungo *M. oryzae* secreta inúmeras proteínas efetoras, no entanto os mecanismos de translocação ainda são desconhecidos. Ribot et al. (2013) propôs o seguinte modelo para translocação do gene *AVR1-CO39* em células hospedeiras. *AVR1-CO39* é secretado pelas hifas invasoras de *M. oryzae* no interior da matriz entre a parede da célula fúngica e a membrana plasmática da planta durante as fases iniciais da infecção. Subsequentemente, *AVR1-CO39* entra nas células das plantas através de um mecanismo que pode basear-se, como para outros efetores fúngicos, na presença de um *motif* de translocação ainda desconhecido. Este *motif* de translocação é diferente de sequências fúngicas anteriormente descritas, tais como o *motif* RGD do ToxA (Manning et al., 2008) ou o *motif* hidrofóbico do AvrL567 (Rafiqi et al., 2010), que estão ambos ausentes da sequência *AVR1-CO39*. Também é diferente do *motif* semelhante ao RXLR (Kale et al., 2010), o qual, embora identificados em *AVR1-CO39*, não é necessário para a sua atividade de avirulência.

2.3.4 Interação de genes de resistência e avirulência

O modelo de interação gene-a-gene, conhecido como teoria de Flor, onde para cada gene de resistência do hospedeiro existe um gene, complementar, de avirulência do patógeno (Flor, 1971) é observado no patossistema *Oryza sativa*/*Magnaporthe oryzae*, o qual apresenta uma interação específica (Silué et al., 1992; Bryan et al., 2000). Durante o processo de colonização intracelular, ocorrem mecanismos de defesa constitutiva (pré-existentes) e induzida (pós-formada). Esta resposta ocorre a nível molecular, sendo regulada pela presença de genes do hospedeiro e do patógeno.

O reconhecimento de molécula efetora do patógeno (produzida por um gene Avr), denominada elicitor, por uma molécula receptora da planta (produzida pelo gene R), dispara vias de transdução de sinais, levando a ativação de um mecanismo de resistência com respostas locais e sistêmicas. Isso ocorre quando há interação específica, resultando em uma resposta no local da infecção, sendo característica das interações incompatíveis, não ocorrendo o desenvolvimento da doença (Elvira et al., 2008; Ballini et al., 2013).

Por outro lado, se o patógeno não possui o gene de avirulência, ele será virulento e não será reconhecido pelo hospedeiro. Consequentemente, a infecção também não será reconhecida, resultando em suscetibilidade, ou seja, o patógeno é capaz de causar doença. Essa interação é denominada de interação compatível. De acordo com Levy et al. (1993), a provável causa para que os genótipos tornem-se suscetíveis à doença é a ocorrência de trocas genéticas no patógeno, gerando formas diferentes de virulência, ou o aumento da frequência de formas virulentas, também designadas como patótipos, de ocorrência rara.

A resistência de plantas a patógenos é um processo complexo, contando com dois grandes níveis de resistência controlada por diferentes tipos de receptores de plantas (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010). A primeira linha de defesa das plantas é ativada por proteínas da membrana plasmática chamadas de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que percebem moléculas conservadas do patógeno, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Patógenos de plantas adaptados são capazes de contornar essa imunidade desencadeada pela PAMP produzindo efetores secretados que atuam dentro ou fora da célula hospedeira e manipulam os principais componentes de defesa da planta (Jones & Dangl, 2006).

A segunda camada de imunidade da planta depende do reconhecimento específico de alguns efetores AVR pelas proteínas produzidas pelos genes R. Esta imunidade ativada por efetores (ETI) dá origem às respostas de defesa mais fortes e mais rápidas do que a imunidade desencadeada pela PAMP, muitas vezes envolvendo a resposta de hipersensibilidade (Dodds & Rathjen, 2010).

Mas os genes R de arroz perdem eficácia dentro de um a dois anos depois de serem implantados no campo, por causa dos altos níveis de variabilidade dos efetores de AVR do fungo (Valent & Khang, 2010). A seleção natural estabelecida por patógenos é considerada uma das principais causas da evolução dos organismos. O impacto dos patógenos sobre a evolução e ecologia de seus hospedeiros depende da sua virulência, mas são eles responsáveis pelos mecanismos que fazem gerar a co-evolução da planta-patógeno (Ebert & Hamilton, 1996). Durante esta co-evolução a resistência mediada pelo gene R tornou-se uma defesa rápida e robusta contra a invasão de patógenos (Liu et al., 2013).

Ou (1980) afirma que a frequente suplantação da resistência nas cultivares comerciais é atribuída à alta variabilidade patogênica do fungo. Vários estudos relatam a ocorrência de variabilidade mesmo dentro de isolados monoconidiais (Kimati et al., 2005). Esta variabilidade pode ser por consequência de fatores como: a) a disseminação dos conídios ocorre principalmente através do vento e pode atingir 1 km de distância a partir de um campo infectado (Urashima et al., 2007), lavouras vizinhas ou distantes e aquelas implantadas mais cedo podem produzir considerável carga de conídios, constituindo-se em importantes fontes de inóculo; b) a sobrevivência dos patógenos pode ocorrer na forma de micélio ou conídio, sendo que as sementes contaminadas são uma das principais fontes de inóculo, assim como os restos culturais e plantas de arroz que permanecem no campo (Kimati et al., 2005); c) epidemias de brusone no campo são policíclicas, com a taxa da epidemia dependente das condições ambientais. Em ecossistemas temperados, a epidemia de brusone pode ter de 7 a 8 ciclos por estação de cultivo ou ano, enquanto que nas regiões tropicais podem ocorrer de 10 a 15 ciclos por estação (Teng, 1994); d) incidência, severidade e prevalência desta doença estão relacionadas à presença do patógeno viável, condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento e suscetibilidade da cultivar (Bedendo, 1997).

O alto número de ciclos do patógeno por ciclo do hospedeiro pode conferir uma vantagem evolutiva do primeiro com relação ao segundo, visto que certos patótipos podem ser gerados durante este período. O estudo das populações do patógeno e do seu

ciclo de vida é uma das vertentes que podem ser exploradas para auxiliar na previsão e prevenção da doença, apesar da alta variabilidade de *M. oryzae*.

2.3.5 Variabilidade do fungo

Magnaporthe oryzae se notabiliza por expressar um grande número de patótipos, sendo que novas formas aparecem no campo quando novas cultivares de arroz resistentes à brusone são introduzidas (Prabhu et al., 2009), embora se reproduza assexuadamente (reprodução clonal).

Scheuermann et al. (2012), analisando dados de diversidade genética, em diferentes países, observaram que alguns locais apresentavam uma baixa diversidade genética com uma diversidade patogênica considerável, enquanto em outras áreas apresentavam uma maior diversidade genética e patogênica. Com isso, sugeriram que mecanismos diferentes atuam de modo a criar variabilidade genética em *M. oryzae*.

Gonçalves (2013) organizou a estrutura populacional de isolados representativos das regiões produtoras de arroz no Brasil em 19 subpopulações genéticas. Com o intuito de rastrear a variabilidade genética de *M. oryzae* em regiões produtoras de arroz no Brasil, 18 marcadores microssatélites (SSR) foram utilizados, e indicaram uma tendência do agrupamento ser determinado por cultivar de origem do isolado, com destacada interação com o ambiente.

Entre os mecanismos envolvidos na variabilidade de *M. oryzae* estão a recombinação sexual, parassexualidade e a ocorrência de mutações (Kistler & Miao, 1992), em muitos casos provocada por deleções de genes Avr e inserções de elementos de transposição. O ciclo parassexual envolve a formação de anastomose, resultando em células heterocarióticas, que podem sofrer cariogamia (fusão de núcleo), tornando-se uma célula diploide, que pode realizar a recombinação mitótica. A volta ao estado haploide ocorre pela perda sucessiva de um cromossomo de cada par homólogo (aneuploidia) (Scheuermann et al., 2012). A recombinação parassexual representa uma alternativa ao ciclo sexual, visto que este raramente ocorre (Zeigler, 1998). Zeigler et al. (1997) observaram formação de anastomoses entre isolados provenientes do campo, e na região de encontro das colônias foram relatadas características comuns a ambos os parentais, indicando a ocorrência de recombinação. Esse fato é um indício de que a recombinação parassexual esteja ocorrendo na natureza, sendo um dos possíveis responsáveis pelo surgimento de novos patótipos.

Recombinação sexual em *M. oryzae* era considerada extremamente rara porque isolados de arroz coletados no campo tinham baixa fertilidade sexual (Kato & Yamaguchi, 1982; Nottéghem & Silué, 1992) e os estudos sobre a distribuição de tipos compatíveis mostraram que somente um tipo compatível (*mating type*) predominava numa determinada região orizícola (Kato & Yamaguchi, 1982; Yaegashi & Yamada, 1986). No entanto, descobriram isolados de alta fertilidade, hermafroditas, de ambos *mating type*, próximos ao centro de origem do arroz sugerindo que a recombinação sexual pode contribuir para a variabilidade genética desse fungo (Hayashi et al., 1997; Kumar, 1999; Mekwatanakarn, et al., 1999).

Inúmeros trabalhos acerca da compatibilidade e das características sexuais vêm sendo realizados no mundo, pois como a fase sexuada ainda não foi encontrada na natureza, com estas informações, pode-se avaliar a possibilidade da reprodução sexuada e, consequentemente, a recombinação em populações de campo de patógenos de plantas. Estes dados tornam-se importantes, porque a escolha da estratégia de controle, especialmente quanto ao uso de variedades resistentes e agrotóxicos, depende em grande parte do sistema de reprodução do patógeno. A recombinação aumenta a probabilidade de combinações alélicas favoráveis serem geradas, selecionadas e rapidamente disseminadas, comprometendo, assim, estratégias de controle clássicas (McDonald & Linde, 2002). A maioria das estratégias com base na resistência de plantas geralmente propostas para o controle da brusone, como por exemplo: a exclusão de subpopulações do patógeno (Zeigler et al., 1994) e piramidização (Bonman et al., 1992) apresentam probabilidades de falhas, se o patógeno apresentar reprodução sexuada (McDonald & Linde, 2002).

Formação de peritécio, produção de ascósporos, viabilidade e fertilidade masculina e feminina são características geneticamente independentes. Esta complexidade e as muitas mutações independentes que podem levar a esterilidade tem implicações para a recombinação em *M. oryzae* (Leslie & Klein, 1996).

2.4 CARACTERÍSTICAS SEXUAIS DO FUNGO

Como ainda não foi encontrada a estrutura da fase sexuada do fungo *Magnaporthe oryzae* em campo, o ciclo sexual, também, não pode ser fielmente relatado, mas tomando como base o ciclo sexual típico de um ascomicota (Figura 2), supõe-se que ocorra da seguinte forma: o micélio do fungo, de qualquer um dos *mating types*, produz protoperitécios (fêmea-fértil) que se constituem em formas imaturas de corpos de

frutificação. A partir do protoperitécio forma-se uma projeção de uma hifa especializada, chamada tricôgena (núcleos haploides), que se funde, por anastomose, com conídios ou hifas de *mating type* oposto, ocorrendo a plasmogamia (fusão de citoplasmas). Quando as hifas tricôgenas recebem núcleo distinto, os provenientes de origem opostas emparelham-se, estabelecendo a condição para se fundirem (condição dicariótica), mas não ocorre a fusão. Com as fusões nucleares (cariogamia), resultam em núcleos diploides (2n). Esses núcleos diploides que, em *M. oryzae*, possuem 24 cromossomos, ficam envolvidos por uma estrutura denominada asco. O núcleo diploide, dentro do asco, sofre meiose com recombinação meiótica no estágio de quatro fios voltando ao estado haplóide. As quatro células haplóides sofrem, em seguida, uma divisão mitótica, resultando em oito células, todas haplóides, dentro de cada asco. Cada uma dessas células é designada ascósporo, e os oito ascósporos dispõem-se linearmente no interior do asco. Centenas de ascos ficam reunidos em uma estrutura que é o corpo de frutificação maduro, denominado peritécio (Azevedo, 2008 - adaptado).

O potencial de contribuição da recombinação, para estruturas de populações, pode ser avaliado através da determinação da probabilidade de ocorrência da reprodução sexuada em uma população (Zeigler, 1998). Apesar da estrutura genética de populações de *M. oryzae* em arroz sugerir que a reprodução assexual ocorre na maioria das áreas de cultivo de arroz (Zeigler, 1998; El Guilli et al., 2005) e o não relato de peritécios no campo (Zeigler, 1998), a reprodução sexual tem sido relatada *in vitro* (Silué & Nottéghem, 1990; Hayashi et al., 1997) e em tecido morto (Hayashi et al., 1997).

Como em outros Ascomycota, o tipo compatível (*mating type*) em *M. oryzae* é controlada por um único locus, designado MAT1 (Yoder et al., 1986), com interações férteis possíveis apenas entre os indivíduos de tipo de acasalamento oposto (designado *MAT1-1* e *MAT1-2*) (Mekwatanakarn et al., 1999). No entanto, a capacidade de *M. oryzae* para produzir peritécio (fertilidade feminina) é, aparentemente, controlado por genes em vários locus, e estes segregam independentemente do tipo de acasalamento e de patogenicidade em diferentes hospedeiros (Kolmer & Ellingboe, 1988).

2.4.1 *Mating type*

A porcentagem de distribuição dos tipos compatíveis é uma forma de comprovação que pode auxiliar na determinação da existência da fase sexual no campo. Isso porque um gene com dois idiomorfos, denominados *MAT1-1* e *MAT1-2*, controla o

tipo compatível em *M. oryzae,* e a reprodução sexual pode produzir progênies de ambos *mating types* em igual proporção (Nottéghem & Silué, 1992). Portanto, se essa distribuição for igual, existe um alto indicativo da ocorrência de reprodução sexual na população.

Entre as dificuldades impostas pelas migrações e/ou efeitos seletivos devido às diferenças na aptidão entre as linhagens dos dois *mating types*, podem ter levado a fixação de um único *mating type* em áreas invadidas, impondo um modo assexuado obrigatório de reprodução em populações do patógeno fora do centro de origem (Saleh et al., 2012b).

Estudos que avaliam a distribuição de *mating types* comprovam isso, como é o caso do domínio de *MAT1-1* na Índia (Dayakar et al., 2000); na Argentina (Consolo et al., 2005); em 34 países na Europa (Nottéghem & Silué, 1992); Itália, Costa do Marfim, Egito, Índia, Filipinas, Japão, Colômbia (Kato & Yamaguchi, 1982); e *MAT1-2* em Guiné, Malásia, Indonésia, China (Kato & Yamaguchi, 1982); Burkina Faso, Benim, Costa do Marfim, Senegal (Nottéghem & Silué, 1992); na China, Tengchong, Indonésia, Java Ocidental, Kumingan, Bongor, Garut, Sumatra Ocidental, Gunun Medan e Granada-Meta (Yaegashi & Yamada, 1986). Considerando os mesmos dados e comparando por continentes há um domínio de *MAT1-1* na América do Sul, 100% de *MAT1-1* na Europa, *MAT1-2* na Ásia e a África apresenta um equilíbrio quanto aos *mating type*, o que caracteriza a possível ocorrência de reprodução sexuada neste continente.

Em, um estudo mais atualizado, Saleh et al. (2012b) analisaram a distribuição geográfica mundial de tipos de acasalamento de 3.800 isolados de *M. oryzae.* Ambos os tipos de acasalamento foram encontrados na maioria das regiões do mundo (Figura 3), com exceção da região do Mediterrâneo (apenas *MAT1-1*). Mas, foi observada a mesma tendência em estudos anteriores.

No centro de origem do arroz (e por conclusão centro de origem de *M. oryzae*), há evidências de influências da recombinação sexual sobre a variabilidade das populações de *M. oryzae*, talvez da mesma forma que acontecia antes do cultivo de arroz a nível mundial (Kumar et al., 1999). A prevalência de isolados de *M. oryzae* de ambos os *mating types* nas cordilheiras do Himalaia e sul da província de Yunnan da China indica que a reprodução sexual pode estar ocorrendo ou que ocorreu, certamente, no passado recente (Talbot, 2003).

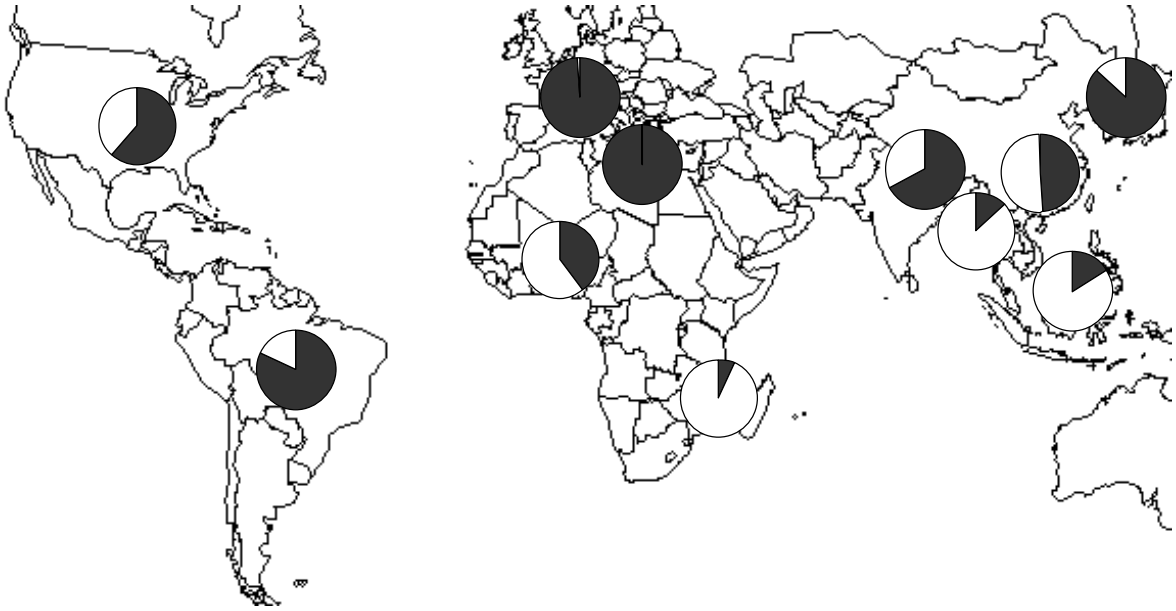

Figura 3. Distribuição de *mating types* em uma coleção não-populacional de isolados de *M. oryzae* de arroz (amostras coletadas em escala continental). (a) Proporção de MAT1-1 (preto) e MAT1-2 (branco) em uma coleção de 3.800 isolados. Fonte: Saleh et al. (2012b)

2.4.2 Sexualidade e Fertilidade

No ciclo sexual do fungo, além de requerer dois isolados de tipos compatíveis opostos, pelo menos um deve ser fêmea-fértil capaz de produzir peritécios e o outro deve ser macho-fértil. Isolados de *M. oryzae* podem ser hermafroditas (macho e fêmea fértil), fêmea-fértil (macho estéril), macho-fértil (fêmea-estéril), ou completamente estéreis (Zeigler et al., 1995).

A fertilidade feminina é uma característica fundamental à reprodução de *M. oryzae* (Saleh et al., 2012a), porém isolados fêmea-fértil são raramente encontrados. Migrações mundiais podem ser as responsáveis pela redução da diversidade da espécie (Zeigler, 1998; Tharreau et al., 2009) e uma perda da sua capacidade de reproduzir sexualmente (Saleh et al., 2012b).

Com a grande variabilidade deste fungo, acredita-se que a reprodução sexuada possa ocorrer, mesmo que a fase perfeita ainda não tenha sido encontrada na natureza. A avaliação de *mating type*, sexualidade e fertilidade de isolados de campo de arroz do Brasil ainda não foi descrita, sendo uma abordagem importante a ser explorada para se conhecer mais sobre as subpopulações brasileiras e seus possíveis impactos em estratégias de controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLEÇÃO E ARMAZENAMENTO DE ISOLADOS

Foram utilizados 208 isolados monoconidiais de *Magnaporthe oryzae* (Tabela 1). Estes isolados foram coletados em regiões produtoras de arroz do Brasil, durante as safras de 2008 a 2010, e pertencem à Coleção de Microrganismos e Fungos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão.

Segmentos de papel-filtro de cada isolado foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (200 g de batata descascadas, 20 g de dextrose, 15 g de ágar, 200µL de cloranfenicol (5mg.mL^{-1}), 1 L de água destilada) e incubados à 25°C, para crescimento e detecção das colônias viáveis. Em seguida, segmentos da colônia foram transferidos para cultivo em placas de Petri, contendo discos de papel-filtro esterilizados sobre o meio de cultura BDA.

Posteriormente, os discos de papel-filtro, contendo micélio crescido de *M. oryzae* foram transferidos para placa de Petri estéril, contendo um papel-filtro estéril sobre uma camada de sílica na base da placa, evitando assim, o contato direto entre sílica gel e os segmentos de micélio do fungo crescido em papel-filtro, permanecendo de 5 a 10 dias em dessecadoras. Após a secagem, realizou-se a segmentação do disco de papel-filtro e os segmentos contendo micélio do fungo foram transferidos para criotubos estéreis e armazenados em freezer a -20°C (Valent et al.,1986 com modificações).

3.2 ISOLADOS REFERÊNCIA

Os três isolados, Py 184, KA-3 e GUY11, pertencentes à Coleção de Microrganismos e Fungos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão, descritos na Tabela 2, foram utilizados como controle positivo nas reações de cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR), pois possuem os genes *AVR1-CO39*, *MAT1-1* e *MAT1-2*, respectivamente.

Tabela 1. Relação de isolados de campo, subpopulação, origem geográfica, cultivar de origem, patótipos nacionais (P.N.) e internacionais (P.I.), safra, número de coleção, cor da colônia (E - escura ou C - clara), identificação do tipo de compatibilidade e gene de avirulência

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção		Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
											MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
1	Dom Eliseu	PA	PRIMAVERA	IE 1	BC 16	09/10	Py	10.631	E	E	0	1	0
1	Dom Eliseu	PA	PRIMAVERA	IC 17	BC 6	09/10	Py	10.649	E	E	0	1	0
1	Vilhena	RO	SERTANEJA	IG 1	BI 1	09/10	Py	10.651	E	E	0	1	0
1	Vilhena	RO	SERTANEJA	IE 1	BC 8	09/10	Py	10.653	E	E	0	1	0
1	Dom Eliseu	PA	PRIMAVERA	IE 1	BC 8	09/10	Py	10.900	E	E	0	1	0
2	Paranatinga	MT	PRIMAVERA	IF 1	BD 16	08/09	Py	9.891	E	E	0	1	0
2	Goianira	GO	PRIMAVERA	IG 1	BI 1	08/09	Py	9.910	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IF 1	BD 16	09/10	Py	10.600	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IE 1	BE 8	09/10	Py	10.611	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IF 1	BD 16	09/10	Py	10.643	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	MARAVILHA	IB 57	BC 6	10/11	Py	10.776	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	MARAVILHA	IA 81	BA 72	10/11	Py	10.777	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	MARAVILHA	IA 63	BB 5	10/11	Py	10.778	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	MARAVILHA	IA 1	BC 8	10/11	Py	10.779	E	C	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	MARAVILHA	IB 47	BC 8	10/11	Py	10.780	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IA 17	BA 46	10/11	Py	10.781	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	MARAVILHA	IB 49	BC 8	10/11	Py	10.873	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	MARAVILHA	IA 1	BA 66	10/11	Py	10.874	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IA 113	BA 77	10/11	Py	10.875	C	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IA 1	BC 6	10/11	Py	10.876	E	E	0	1	0
2	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IA 49	BD 13	10/11	Py	10.997	E	E	0	1	0
3	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 114	IB 45	BB 46	08/09	Py	9.978	E	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 45	BA 126	10/11	Py	10.710	E	E	0	1	0

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção		Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
											MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 38	BA 70	10/11	Py	10.711	E	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 45	BA 22	10/11	Py	10.712	E	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 110	BF 1	10/11	Py	10.716	E	E	0	1	0
4	Meleiro	SC	EPAGRI 113	IA 45	BE 8	10/11	Py	10.767	E	E	0	1	0
4	Meleiro	SC	EPAGRI 113	IA 13	BE 8	10/11	Py	10.768	E	E	0	1	0
4	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 113	IA 45	BB 21	10/11	Py	10.816	E	E	0	1	0
4	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 113	IA 45	BE 6	10/11	Py	10.819	E	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 13	BB 21	10/11	Py	10.824	E	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 38	BE 6	10/11	Py	10.825	C	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 37	BA 54	10/11	Py	10.827	E	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 45	BG 2	10/11	Py	10.828	E	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 13	BG 1	10/11	Py	10.829	E	E	0	1	0
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 41	BA 128	10/11	Py	10.830	E	E	0	1	1
4	Miranda	MS	EPAGRI 116	IA 45	BB 54	10/11	Py	10.831	E	E	0	1	0
5	Vilhena	SC	EPAGRI 114	ID 14	BI 1	08/09	Py	10.636	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 114	IA 13	BA 5	10/11	Py	10.755	E	E	0	1	0
5	Meleiro	SC	EPAGRI 116	IA 43	BA 22	10/11	Py	10.760	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 112	IB 9	BA 21	10/11	Py	10.794	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 112	IB 41	BB 5	10/11	Py	10.795	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 112	IB 9	BA 22	10/11	Py	10.796	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 112	IA 45	BB 54	10/11	Py	10.797	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 112	IA 109	BF 1	10/11	Py	10.798	C	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 112	IA 109	BF 1	10/11	Py	10.798	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 114	IB 13	BC 21	10/11	Py	10.799	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 114	IB 15	BE 6	10/11	Py	10.800	E	E	0	1	0

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção		Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
											MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 114	IA 13	BB 21	10/11	Py	10.801	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 114	IB 46	BB 21	10/11	Py	10.802	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 114	IB 45	BA 53	10/11	Py	10.803	E	E	0	1	0
5	Rio dos Cedros	SC	EPAGRI 108	IA 45	BD 13	10/11	Py	10.806	E	E	0	1	0
5	Rio dos Cedros	SC	EPAGRI 116	IB 47	BE 5	10/11	Py	10.884	E	E	0	1	0
5	Rio dos Cedros	SC	EPAGRI 116	IB 48	BF 1	10/11	Py	10.885	E	E	0	1	0
5	Rio dos Cedros	SC	EPAGRI 116	IB 45	BA 125	10/11	Py	10.886	E	E	0	1	0
5	Forquilhinhas	SC	EPAGRI 108	IA 13	BA 70	10/11	Py	10.889	C	E	0	1	0
5	Rio do Campo	SC	EPAGRI 108	IA 45	BA 53	10/11	Py	10.890	E	E	0	1	0
5	Rio do Campo	SC	EPAGRI 108	IB 41	BB 62	10/11	Py	10.893	E	E	0	1	0
5	Rio do Campo	SC	EPAGRI 108	IA 13	BE 5	10/11	Py	10.895	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 114	IB 46	BA 21	10/11	Py	10.919	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 114	IA 47	BF 1	10/11	Py	10.920	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 112	IA 125	BE 8	10/11	Py	11.055	E	E	0	1	0
5	Nova Veneza	SC	EPAGRI 112	IA 45	BF 6	10/11	Py	11.056	E	E	0	1	0
6	Lambari	MG	RELAMPAGO	IB 45	BD 16	08/09	Py	9.888	E	E	0	1	0
6	Campo Florido	MG	PRIMAVERA	IG 1	BI 1	08/09	Py	9.889	E	E	0	1	0
6	Anderson Cunha	MG	PRIMAVERA	IG 1	BD 16	08/09	Py	9.935	E	E	0	1	0
6	Anderson Cunha	MG	PRIMAVERA	IG 1	BD 16	08/09	Py	9.936	E	E	0	1	0
6	Madre de Deus	MG	PRIMAVERA	IC 17	BC 32	08/09	Py	9.953	E	E	0	1	0
6	Madre de Deus	MG	PRIMAVERA	ID 1	BD 16	08/09	Py	9.954	E	E	0	1	0
6	Madre de Deus	MG	PRIMAVERA	IE 1	BD 16	08/09	Py	9.955	E	E	0	1	0
6	Anderson Cunha	MG	PRIMAVERA	IA 57	BD 16	08/09	Py	10.182	E	E	0	1	0
6	Anderson Cunha	MG	PRIMAVERA	IA 57	BD 16	08/09	Py	10.183	C	E	0	1	0
6	Anderson Cunha	MG	PRIMAVERA	IA 57	BD 16	08/09	Py	10.183	E	E	0	1	0

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção			Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
												MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
6	Agropecuária Mesapec	MG	PRIMAVERA	IG 1	BI 1	08/09	Py	10.188		E	E	0	1	0
7	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 115	IB 14	BI 1	08/09	Py	9.892		E	E	0	1	0
7	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 115	IA 45	BB 56	10/11	Py	10.662		E	E	0	1	0
7	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 115	IB 47	BI 1	10/11	Py	10.704		E	E	0	1	0
7	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 115	IB 47	BI 1	10/11	Py	10.705		E	E	0	1	0
7	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 115	IA 47	BE 6	10/11	Py	10.706		E	E	0	1	0
7	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 115	IB 47	BC 32	10/11	Py	10.707		E	E	0	1	0
7	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 115	IB 63	BE 8	10/11	Py	10.708		E	E	0	1	0
7	Rio Brilhante	MS	EPAGRI 115	II 1	BE 8	10/11	Py	10.821		E	E	0	1	0
8	Duerê	TO	KM 13	ID 1	BI 1	09/10	Py	10.019		E	E	0	1	0
8	Lagoa da Confusão	TO	IRGA 417	IA 109	BA 13	10/11	Py	10.732		E	E	0	1	0
8	Lagoa da Confusão	TO	IRGA 417	IA 77	BA 62	10/11	Py	10.733		C	E	0	1	0
8	Lagoa da Confusão	TO	IRGA 417	IA 77	BA 62	10/11	Py	10.733		E	E	0	1	0
8	Lagoa da Confusão	TO	IRGA 417	IF 1	BF 1	10/11	Py	10.734		E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 49	BB 62	10/11	Py	10.742		E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 65	BB 64	10/11	Py	10.743		E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BA 62	10/11	Py	10.746		E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 45	BA 125	10/11	Py	10.748		E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 127	BG 1	10/11	Py	10.749		E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IB 46	BA 122	10/11	Py	10.752		E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 63	BA 125	10/11	Py	10.753		E	E	0	1	0
8	Lagoa da Confusão	TO	IRGA 417	IA 109	BA 126	10/11	Py	10.841		E	E	0	1	0
8	Lagoa da Confusão	TO	IRGA 417	IH 1	BA 125	10/11	Py	10.843		C	E	0	1	0
8	Lagoa da Confusão	TO	IRGA 417	IH 1	BA 125	10/11	Py	10.843		E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BA 5	10/11	Py	10.848		E	E	0	1	0

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção		Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
											MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BA 77	10/11	Py	10.849	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 33	BA 126	10/11	Py	10.850	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BA 46	10/11	Py	10.851	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 128	BI 1	10/11	Py	10.852	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BG 1	10/11	Py	10.853	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BA 62	10/11	Py	10.854	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BA 61	10/11	Py	10.855	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 25	BA 62	11/01	Py	10.869	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 29	BB 30	11/01	Py	10.870	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 65	BA 118	11/01	Py	10.871	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 77	BA 61	11/01	Py	10.872	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	II 1	BI 1	10/11	Py	10.906	E	E	0	1	1
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 13	BB 64	10/11	Py	10.907	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 125	BI 1	10/11	Py	10.908	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 65	BG 2	10/11	Py	10.909	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 117	BI 1	10/11	Py	10.910	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BA 126	10/11	Py	10.912	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BA 62	10/11	Py	10.915	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 1	BB 54	10/11	Py	10.916	E	E	0	1	0
8	Formoso do Araguaia	TO	IRGA 417	IA 3	BB 38	10/11	Py	10.918	E	E	0	1	0
9	Duerê	TO	EPAGRI 109	IB 41	BI 1	08/09	Py	9.874	C	E	0	1	0
9	Duerê	TO	EPAGRI 109	IB 41	BI 1	08/09	Py	9.875	C	C	0	1	0
9	Duerê	TO	EPAGRI 109	IB 41	BI 1	08/09	Py	9.875	E	E	0	1	0
9	Duerê	TO	EPAGRI 109	IB 41	BB 32	08/09	Py	9.876	C	E	0	1	0
9	Duerê	TO	EPAGRI 109	IB 41	BB 32	08/09	Py	9.876	E	E	0	1	0

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção		Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
											MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
9	Duerê	TO	EPAGRI 109	IB 41	BI 1	08/09	Py	9.877	C	E	0	1	0
9	Duerê	TO	EPAGRI 109	IB 41	BI 1	08/09	Py	9.877	E	E	0	1	0
9	Lagoa da Confusão	TO	KM 13	ID 1	BI 1	08/09	Py	9.881	E	E	0	1	0
9	Duerê	TO	EPAGRI 109	IB 41	BI 1	08/09	Py	10.007	E	E	0	1	0
9	Indaial	SC	EPAGRI 109	IC 14	BA 118	10/11	Py	10.761	E	E	0	1	0
10	Vilhena	RO	SERTANEJA	IG 1	BC 16	09/10	Py	10.630	E	E	0	1	0
10	Vilhena	RO	SERTANEJA	IG 1	BC 16	09/10	Py	10.648	C	E	0	1	0
10	Vilhena	RO	SERTANEJA	IG 1	BC 16	09/10	Py	10.648	E	E	0	1	0
10	Vilhena	RO	SERTANEJA	IC 17	BC 8	09/10	Py	10.678	E	E	0	1	0
10	Vilhena	RO	SERTANEJA	IG 1	BI 1	09/10	Py	10.681	E	E	0	1	0
11	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.938	E	E	0	1	0
11	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 33	BB 108	08/09	Py	9.939	E	E	0	1	0
11	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.995	E	E	0	1	0
11	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.996	E	E	0	1	0
11	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	10.186	E	E	0	1	0
12	Paranatinga	MT	SERTANEJA	IB 1	BA 1	08/09	Py	9.984	E	E	0	1	0
12	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IF 1	BD 16	09/10	Py	10.595	E	E	0	1	0
12	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IB 43	BA 109	10/11	Py	10.790	E	E	0	1	0
13	Dom Eliseu	PA	PRIMAVERA	IG 1	BI 1	09/10	Py	10.627	E	E	0	1	0
13	Dom Eliseu	PA	PRIMAVERA	IG 1	BI 1	09/10	Py	10.628	E	E	0	1	0
13	Dom Eliseu	PA	PRIMAVERA	IE 1	BD 16	09/10	Py	10.629	E	E	0	1	0
13	Sto. Antônio de Goiás	GO	MONARCA	IF 1	BC 24	09/10	Py	10.672	E	E	0	1	0
13	Sto. Antônio de Goiás	GO	MONARCA	IF 1	BC 30	09/10	Py	10.675	E	E	0	1	0
13	Dom Eliseu	PA	PRIMAVERA	IF 1	BD 16	09/10	Py	10.679	E	E	0	1	0
14	Petrolândia	GO	PRIMAVERA	IB 17	BI 1	08/09	Py	9.890	E	E	0	1	0

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção			Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
												MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
14	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IF 1	BD 16	09/10	Py	10.593		E	E	0	1	0
14	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IF 1	BI 1	09/10	Py	10.594		E	E	0	1	0
14	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IE 1	BE 8	09/10	Py	10.597		E	E	0	1	0
14	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IC 29	BD 16	09/10	Py	10.599		E	E	0	1	0
14	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IF 1	BD 16	09/10	Py	10.619		E	E	0	1	0
14	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IC 25	BB 16	09/10	Py	10.641		E	E	0	1	0
14	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IA 89	BA 117	10/11	Py	10.666		E	E	0	1	0
14	Sto. Antônio de Goiás	GO	PRIMAVERA	IA 89	BA 117	09/10	Py	10.674		E	E	0	1	0
15	Lagoa da Confusão	TO	KM 13	IF 1	BI 1	08/09	Py	9.866		E	E	0	1	0
15	Lagoa da Confusão	TO	KM 13	IF 1	BI 1	08/09	Py	9.867		E	E	0	1	0
15	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.947		E	E	0	1	0
15	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.948		E	E	0	1	0
15	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.949		E	E	0	1	0
15	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.950		E	E	0	1	0
15	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.952		E	E	0	1	0
15	Anderson Cunha	MG	CARAVERA	IB 61	BD 16	08/09	Py	9.998		E	E	0	1	0
15	Duerê	TO	KM 13	II 1	BI 1	09/10	Py	10.014		C	E	0	1	0
15	Duerê	TO	KM 13	ID 1	BD 16	09/10	Py	10.015		C	E	0	1	0
15	Duerê	TO	KM 13	ID 1	BD 16	09/10	Py	10.017		E	E	0	1	0
15	Duerê	TO	KM 13	ID 1	BD 16	09/10	Py	10.018		E	E	0	1	0
16	Indaial	SC	EPAGRI 109	IB 41	BI 1	08/09	Py	9.900		E	E	0	1	0
16	Nova Veneza	SC	EPAGRI 109	IG 1	BD 16	08/09	Py	9.907		C	E	0	1	0
16	Nova Veneza	SC	EPAGRI 110	IG 2	BD 17	08/09	Py	9.907		E	E	0	1	0
16	Agronomica	SC	EPAGRI 109	IG 1	BD 16	08/09	Py	9.912		E	E	0	1	0
16	Nova Veneza	SC	EPAGRI 109	IG 1	BD 16	08/09	Py	10.189		E	E	0	1	0

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção		Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
											MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
16	Nova Veneza	SC	EPAGRI 109	IG 1	BD 16	08/09	Py	10.190	E	E	0	1	0
17	Torres	RS	IRGA 417	IC 16	BI 1	08/09	Py	9.928	C	E	0	1	0
17	Torres	RS	IRGA 417	IC 16	BI 1	08/09	Py	9.928	E	E	0	1	0
17	Rio Brilhante	MS	PIRACEMA	IB 57	BD 16	08/09	Py	10.005	E	E	0	1	0
17	Miranda	MS	PIRACEMA	IA 13	BA 22	10/11	Py	10.719	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 45	BA 53	10/11	Py	10.723	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 45	BA 117	10/11	Py	10.724	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 47	BA 126	10/11	Py	10.725	C	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 47	BA 126	10/11	Py	10.725	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 45	BE 6	10/11	Py	10.727	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 13	BA 61	10/11	Py	10.728	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 45	BA 109	10/11	Py	10.729	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 13	BA 57	10/11	Py	10.730	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 45	BA 126	10/11	Py	10.731	E	E	0	1	0
17	Capão do Leão	RS	QUERENCIA	IA 33	BA 105	10/11	Py	10.770	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 125	BF 1	10/11	Py	10.839	C	C	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 125	BF 1	10/11	Py	10.839	E	E	0	1	0
17	Lagoa da Confusão	TO	QUERENCIA	IA 48	BD 6	10/11	Py	10.840	E	E	0	1	0
18	Lagoa da Confusão	TO	KM 13	IF 1	BI 1	08/09	Py	9.862	C	E	0	1	0
18	Lagoa da Confusão	TO	KM 13	IF 1	BI 1	08/09	Py	9.862	E	E	0	1	0
18	Lagoa da Confusão	TO	KM 13	IF 1	BI 1	08/09	Py	9.863	E	E	0	1	0
18	Lagoa da Confusão	TO	KM 13	IF 1	BI 1	08/09	Py	9.864	E	E	0	1	0
18	Rio do Campo	SC	EPAGRI 108	IA 13	BC 23	10/11	Py	10.896	E	E	0	1	0
19	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 33	BD 16	08/09	Py	9.940	E	E	0	1	0
19	Madre de Deus	MG	RELAMPAGO	IB 45	BD 16	08/09	Py	9.942	E	E	0	1	0

População	Município	UF	Cultivar	P.I.	P.N.	Safra	N. Coleção		Cor		*Mating type*		Gene de Avirulência
											MAT1-1	*MAT 1-2*	*Avr-Co39*
19	Madre de Deus	MG	RELAMPAGO	IB 45	BD 16	08/09	Py	9.943	E	E	0	1	0
19	Madre de Deus	MG	RELAMPAGO	IB 45	BD 16	08/09	Py	9.944	E	E	0	1	0
19	Madre de Deus	MG	RELAMPAGO	IB 45	BD 16	08/09	Py	9.945	E	E	0	1	0
19	Madre de Deus	MG	CARAVERA	IB 33	BD 16	08/09	Py	9.997	E	E	0	1	0
19	Madre de Deus	MG	RELAMPAGO	IB 45	BD 16	08/09	Py	10.184	E	E	0	1	0
19	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IF 1	BC 8	09/10	Py	10.639	C	C	0	1	0
19	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IF 1	BC 8	09/10	Py	10.639	E	E	0	1	0
19	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IF 1	BC 8	09/10	Py	10.640	E	E	0	1	0
19	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IF 1	BC 8	09/10	Py	10.677	E	E	0	1	0
19	Sto. Antônio de Goiás	GO	SERTANEJA	IF 1	BI 1	09/10	Py	10.680	E	E	0	1	0

Além da caracterização molecular do gene *mating type*, os isolados de campo também foram analisados fenotipicamente, assim como as características de sexualidade e estado de fertilidade. As caracterizações fenotípicas foram determinadas através do pareamento com os dois isolados referência, GUY11 e KA-3.

Tabela 2. Origem e descrição dos isolados referências de *Magnaporthe oryzae*

Isolado	País de origem	Planta hospedeira	Patogenicidade	*Mating type*	Referência
Py 184	Brasil	*Triticum* spp. (trigo)	Não patogênico ao arroz	*MAT1-1*	Coleção, 1989*
KA-3	Uganda	*Eleusine coracana* (capim-pé-de-galinha-gigante)	Não patogênico ao arroz	*MAT1-1*	Nottéghem & Silué, 1992
GUY 11	Guiana Francesa	*Oryza sativa* (arroz)	Patogênico arroz	*MAT1-2*	Leung et al., 1988

* Isolado de trigo coletado no Brasil em 1989, pertencente à Coleção de Microrganismos e Fungos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de Dellaporta (1983), com modificações. Brevemente, seguimentos de papel-filtro contendo um isolado obtido conforme descrito no item 3.1, foram transferidos e cultivados em placa de Petri (6 centímetros de diâmetro), contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura BDA, durante 7-10 dias, a 25°C sob luz constante. Em seguida, o micélio da colônia crescida foi removido e transferido para microtubos. Adicionou-se à massa de micélio 500 µL de tampão de extração Dellaporta (1,57g Tris-HCL 100 mM; 1,86g EDTA 50 mM; 2,92g NaCl 500 mM; 100 mL de H_2O ultra-pura; pH corrigido para 8,0), seguido por agitação em vortex, durante dois minutos; ao volume do microtubo foi adicionado 30µL de SDS 20% (p/v). O conteúdo foi agitado, durante dois minutos com o auxílio de vortex e incubado a 65°C durante trinta minutos, com breve agitação em vortex a cada 10 minutos, seguido de resfriamento à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 150 µL de acetato de potássio 5M, seguido de agitação em vortex por dois minutos. Os microtubos foram centrifugados, a 18.626 x g, à 25°C por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido (400 µL) para microtubos estéreis, seguido da adição de 300 µL de isopropanol (álcool isopropílico) gelado. O material foi homogeneizado por inversão suave (50 repetições),

sendo então centrifugado a 18.626 x g, em 25°C por 10 minutos. É possível observar a formação do pellet nesta etapa (decantado). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol (álcool etílico) 70%, seguido por uma breve centrifugação de 30 segundos e descarte do sobrenadante. Essa etapa foi realizada duas vezes. A última etapa da limpeza foi realizada com 250 µL de etanol PA (álcool etílico), seguido de centrifugação a 18.626 x g, a 25°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras colocadas sobre a bancada para secagem do pellet. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE e armazenado a -20°C. O DNA obtido foi analisado em um espectrofotômetro (NanoDrop), utilizando os comprimentos de onda de 260 nm para quantificação de ácidos nucléicos e, de 230 nm e 280 nm para determinação das impurezas. Ao final o DNA obtido foi diluído para concentração final de 80 ng/µL e armazenado a -20°C.

3.4 PCR E ELETROFORESE PARA DETECÇÃO DE *MATING TYPE* E DO GENE *AVR1-CO39*

As PCRs foram realizadas utilizando o kit Qiagen® PCR Multiplex. Seguindo as instruções do fabricante, conforme a Tabela 3, para um volume final de reação de 10 µL, utilizou-se 80 ng/µL de concentração de DNA e 0,2 µmol de cada *primer*. Os *primers* específicos (Tabela 3), utilizados para detecção dos *mating types* e do gene de avirulência *AVR1-CO39*, foram sintetizados baseados nas sequencias descritas por Takan et al. (2012) e Tosa et al. (2005), respectivamente.

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador (Swift™ MaxPro, Esco) utilizando uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95ºC por 15 minutos, seguidas por 30 ciclos, com três etapas cada: desnaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 60ºC por 90 segundos, extensão inicial em 72ºC por 90 segundos. Ao final dos 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72ºC por 10 minutos.

O conteúdo das reações (10 µL) foi homogeneizado com tampão BlueJuice (4 µL) e submetido à eletroforese, em gel de agarose 1,5% (p/v). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X, à 90 V por aproximadamente 4,5 horas. Após a corrida, o gel foi depositado em um recipiente contendo brometo de etídio por 15 minutos. Em seguida, as bandas do gel foram visualizadas em um fotodocumentador (Universal Hood II, Bio-Rad) e as imagens capturadas através do software Quantity One (Bio-Rad). As imagens foram posteriormente utilizadas para analisar os fragmentos amplificados.

Tabela 3. Constituintes da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) dos genes MAT1-1, MAT1-2 e AVR1-CO39

Componente	Volume (µL)
H2O	1,4
Q-solution	1
Master Mix	5
Primer *MAT1-1* F: 5´-TGCGAATGCCTACATCCTGTACCGC-3´	0,1
Primer *MAT1-1* R: 5´-CGCTTCTGAGGAACGCAGACGACC-3´	0,1
Primer *MAT1-2* F: 5´-TCTGCTTGAAGCTGCAATACAACGG-3´	0,1
Primer *MAT1-2* R: 5´-CATGCGAGGGTGCCATGATAGGC-3´	0,1
Primer AVF 1-2: 5′-TGCCGCATTTTGCTAACC-3′	0,1
Primer AVR 1-2: 5′-GCGAATCCATAGACAAGGAC-3′	0,1
DNA	2

3.5 CARACTERIZAÇÃO SEXUAL DE *Magnaporthe oryzae*

A caracterização sexual de *M. oryzae* foi realizada através do pareamento de isolados. A identificação de *mating type* e sexualidade foram feitas, conforme Nottéghem & Silué (1992) e fertilidade, conforme Consolo et al. (2005). A avaliação baseou-se na formação, ou não de peritécios.

O pareamento foi realizado através do método de *three-points* (Figura 4), conforme descrito por Itoi et al. (1983), Valent et a. (1991), Nottéghem & Silué (1992), com modificações. Fragmentos de micélio de três isolados (dois isolados referência, KA-3 e GUY11, e um isolado de campo estudado) foram colocados equidistantes entre si (1 cm), em forma de triângulo (Figura 4), em placa de Petri, contendo meio de cultura farelo de arroz (15g de ágar, 20g dextrose, 50g de farelo de arroz, 1 L de água destilada, 100µL de cloranfenicol e 100µL de tetraciclina). As placas permaneceram no escuro por 2 dias a 25°C. Em seguida foram transferidas para BOD com luz continua a 21°C. A produção de peritécios foi observada após 21 dias de incubação (Figura 4B). Todos os cruzamentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

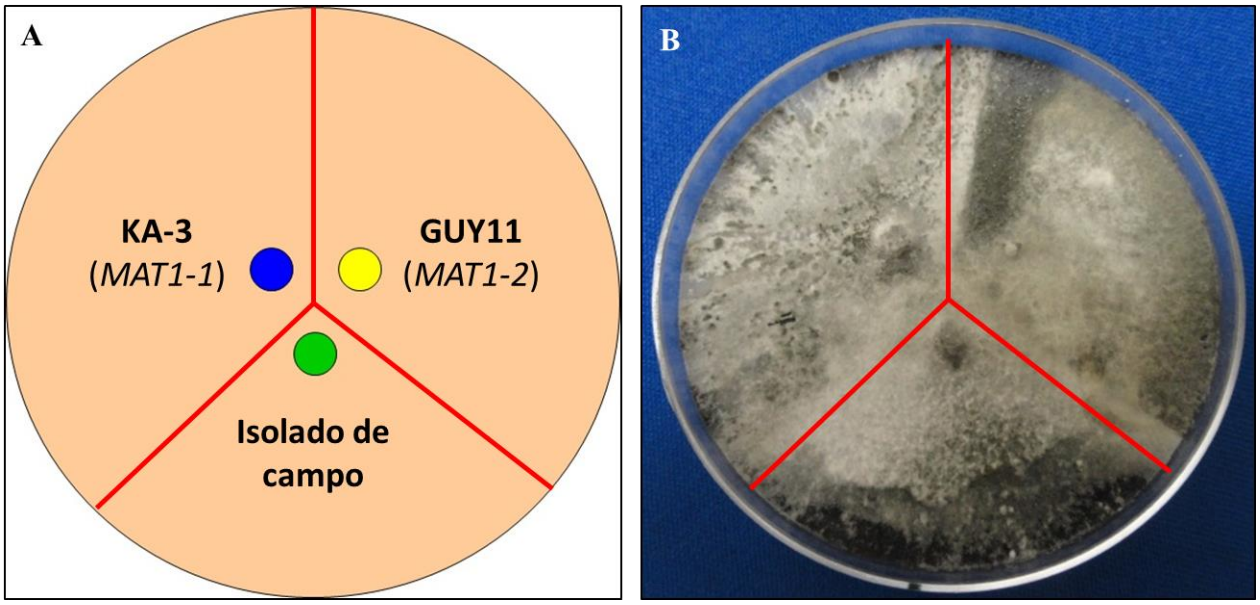

Figura 4. Pareamento dos isolados através do método de *three-points*. A – modelo do método *three-points*, em azul KA-3 (*MAT1-1*), em amarelo GUY11 (*MAT1-2*), em verde isolado de campo. B – pareamento entre KA-3, GUY11 e o isolado de campo Py 10.873 após 21 dias de incubação em BOD, a 21°C, sob iluminação constante

Baseado na metodologia utilizada por Consolo et al. (2005) a fertilidade dos isolados foram classificados como: alta – A (> 20 peritécios/1cm^2); média – M (10-19 peritécios/1cm^2); baixa – B (<10 peritécios/1cm^2); ou infértil – I (sem formação de peritécios).

3.6 MICROSCOPIA

3.6.1 Microscopia óptica

Os isolados KA-3 e GUY11 foram crescidos e impostos às mesmas condições do item 3.6. Após, os 21 dias em BOD os peritécios foram observados em estereomicroscópio, modelo S6D - L2 (Leica) e as imagens capturadas com auxílio de câmera digital EC3 e software LAS EZ Aplicattion Suites v. 1.3.0. Estas estruturas de reprodução sexuada foram transferidas para lâminas de microscópio contendo gotas de água destilada, com e sem corante (azul de algodão), seguido de leve pressão sobre a estrutura transferida com o auxílio da lamínula. Em seguida, as estruturas foram observadas em microscópio ótico modelo Eclipse 80i (Nikon) e as imagens capturadas com auxílio de câmera digital DXM 1200C e software (ACT - 1C v.1.1.0.25).

Para observação de cortes longitudinais dos peritécios e protoperitécios, os isolados KA-3 e GUY11 foram crescidos em placas de Petri contendo meio de farelo de arroz e uma folha de arroz esterilizada no centro da placa, entre os isolados. As mesmas condições do item 3.6 foram utilizadas. No Laboratório de Preparo de Amostras Biológicas do ICB III, segmentos de amostras medindo, aproximadamente, 5 mm^2 das regiões onde foi observada a formação de peritécio, sob a folha, foram removidas com o auxílio de bisturi, e realizada a preparação desta amostra para corte em micrótomo. Brevemente, 2 mL de glutaraldeido (2% v/v), paraformaldeido (2% v/v), em tampão fosfato (0,05 M, pH 7,2) foram adicionados em microtubos, seguido da adição das amostras e incubado *overnight* em geladeira. No dia seguinte, foram realizadas quatro lavagens com 500 μL de tampão fosfato (0,05 M, pH 7,2), por 15 minutos. Em seguida, realizaram-se as desidratações com etanol 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v), e 100% deixando agir por 10 minutos, sendo que a desidratação com etanol 100% foi realizada duas vezes. Após este processo de fixação, a amostra foi transferida para um molde com resina e deixado *overnight* sobre a bancada. No dia seguinte, foi realizada a inclusão, com a adição de resina e catalisador à amostra para polimerizar em bloquinhos de madeira. Após um dia estas amostras estavam prontas para o uso em micrótomo.

No Laboratório de Multiusuário do ICBIII-UFG, foram realizados cortes de 3 μm, com o auxílio do micrótomo modelo RM2245 (Leica). Após este processo, os cortes foram transferidos para água, em temperatura ambiente e "pescados" com auxílio de lâminas de microscopia. Estas lâminas foram selecionadas, com auxílio de um microscópio ótico, e em seguida os cortes foram corados.

A coloração foi realizada com dois corantes, PAS (ácido periódico de Schiff) e azul de toluidina 0,5%. Brevemente, uma gota de ácido periódico (10% v/v) foi adicionada sobre os cortes, por 20 minutos; após esse período, lavaram-se rapidamente os cortes com água e adicionou-se uma gota do reativo de Schiff sobre os mesmos, por cinco minutos; em seguida, lavou-se a lâmina, em água corrente, por 10 minutos. O processo de coloração com azul de toluidina foi realizado com a adição de uma gota deste corante sobre o corte, por dois minutos e lavagem em água corrente.

Após a coloração foi realizada a vedação desses cortes com a lamínula, com o auxílio do princípio ativo xileno (C_8H_{10}) e entellan. No dia seguinte, as imagens foram obtidas em microscópio ótico modelo Eclipse 80i (Nikon) e as imagens capturadas com auxílio de câmera digital DXM 1200C e software (ACT - 1C v.1.1.0.25).

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram realizadas análises dos conídios e peritécios por MEV, entre os isolados KA-3 e GUY11, através do MEV. Para esse processo, os fungos foram crescidos e impostos às mesmas condições do item 3.6.1. No Laboratório de Preparo de Amostras Biológicas do ICBIII, segmentos de amostras medindo, aproximadamente, 7 mm^2 das regiões onde foi observada a formação de peritécio, sobre a folha, foram removidas com o auxílio de bisturi e realizada a fixação, lavagem e desidratação destas amostras. Brevemente, foram adicionados a microtubos 2mL de glutaraldeido (2% v/v), paraformaldeido (2% v/v), em tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), em seguida colocadas as amostras, deixando *overnight* em geladeira. Após a fixação, foi realizada a lavagem retirando o fixador e colocando o tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por 15 minutos, repetindo esta operação por quatro vezes. Em seguida, realizou-se as desidratações com etanol 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v), deixando agir por 15 minutos, finalizando a desidratação com etanol 100%, por 10 minutos, duas vezes. Em seguida, estas amostras foram transferidas para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico do CO_2 (CPD – *critical point drying*) – aparelho Autosamdri-815 (Tousimis), por 50 minutos. As amostras foram transferidas para fita dupla face em um *stub* (disco de alumínio com 2,5 cm de diâmetro e 0,8 cm de espessura) previamente higienizado com acetona pura (C_3H_6O) e álcool isopropílico (C_3H_8O). As amostras foram expostas, por dois minutos, a recobrimento com carbono – aparelho Denton Vacuum (Desc V). Após a metalização, o *stub* contendo as amostras foi levado para visualização em MEV – aparelho Jeol (JSM-6610) equipado com EDS, Thermo Scientific NSS Spectral Imaging, para a obtenção das imagens.

4 RESULTADOS

4.1 COLEÇÃO E ARMAZENAMENTO DE ISOLADOS

Todos os 211 isolados (208 de campo e 3 referências) utilizados neste estudo encontram-se armazenados como descrito na seção anterior, acondicionados em criotubos à -20°C. De acordo com Gonçalves (2013), os isolados organizaram-se em 19 subpopulações genéticas baseado em estudos com marcadores microssatélites (Tabela 1).

Durante a manipulação da coleção, diversos isolados apresentaram formação de setores, identificados pela cor do micélio, dentro da mesma colônia (Figura 5). Entre os formadores de setores, 14 isolados foram selecionados, aleatoriamente, e os micélios de cores diferentes foram separados assim, cada isolado deu origem a dois, identificados pela cor da colônia, como claro (C) ou escuro (E), conforme encontrado na tabela 1 e 4. Esses isolados foram considerados como indivíduos diferentes, apesar de originários de uma mesma colônia, e avaliados em todos os testes.

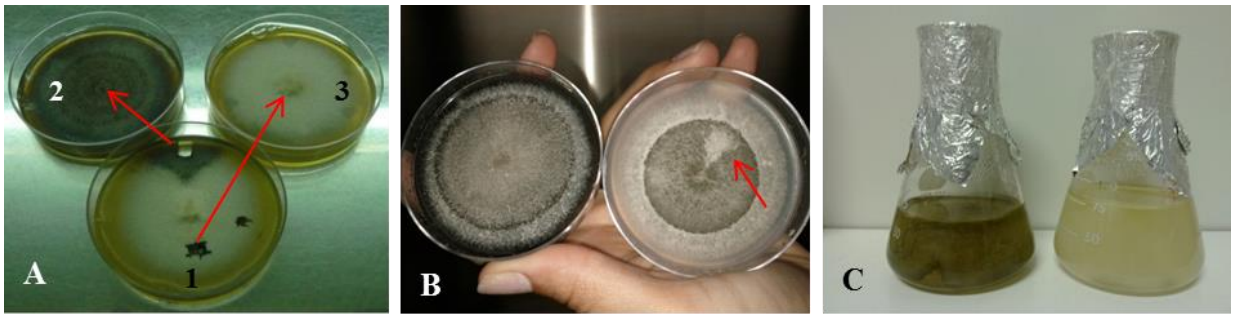

Figura 5. Variação morfológica em colônias de *Magnaporthe oryzae*. A – 1) colônia de *M. oryzae* com formação de setor; 2) colônia de coloração cinza desenvolvida a partir do setor cinza da placa 1; 3) colônia de coloração esbranquiçada desenvolvida a partir do setor esbranquiçado da placa 1 (Fonte: Gonçalves, 2013). B – colônias derivadas de setores formados da colônia original; seta indica o início de formação de setor; C – variação da cor das colônias, derivada de um mesmo isolado, crescido homogeneamente, sem formação de setores; cultivado em meio de cultura líquido de extrato de levedura, sob as mesmas condições ambientais

4.2 ISOLADOS REFERÊNCIA

Foram utilizados três isolados referências: KA-3, GUY11 e Py 184. Os isolados KA-3, portador do gene *MAT1-1*, e GUY11, portador do *MAT1-2* foram utilizados porque são conhecidos mundialmente como hermafroditas com alto grau de fertilidade, e por produzirem elevado número de peritécios, superior aos demais, quando pareados com isolados de *mating type* opostos (Nottéghem & Silué, 1992).

Zheng et al. (2011) relataram que o locus *AVR1-CO39* é relativamente estável e conservado, sendo encontrado na maioria dos isolados de *Magnaporthe oryzae* que não infectam o arroz, como observado por Maciel et al. (2014) em isolados que infectam o trigo. Devido a isso, a presença do gene *AVR1-CO39* foi investigada no isolado Py 184, da Coleção de Microrganismos e Fungos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão. Uma vez detectada a sua presença, o isolado Py 184 foi utilizado como controle positivo para as PCRs.

4.3 PCR E ELETROFORESE PARA DETECÇÃO DE *MATING TYPE* E DO GENE *AVR1-CO39*

Foram caracterizados 208 isolados quanto à presença do gene de avirulência e dos idiomorfos do gene *mating type*. Foi possível identificar, através de uma reação em cadeia de polimerase, com revelação da presença ou ausência, da banda amplificada referente ao gene *AVR1-CO39* (1,05 kb), *MAT1-1* (960 pb) e *MAT1-2* (802 pb) de todos os isolados (Figura 6).

Todos os 208 isolados analisados (100%) apresentaram o gene *MAT1-2* (Tabela 1) em seu genoma. Dentre todos os isolados analisados, somente os isolados Py 10.830 e Py 10.906, equivalendo a 0,96% da coleção estudada, apresentaram este gene (Tabela 1). Estes isolados pertencem às subpopulações 4 e 8, das regiões Centro-Oeste e Norte, isolados das cultivares EPAGRI 116 e IRGA 417, respectivamente.

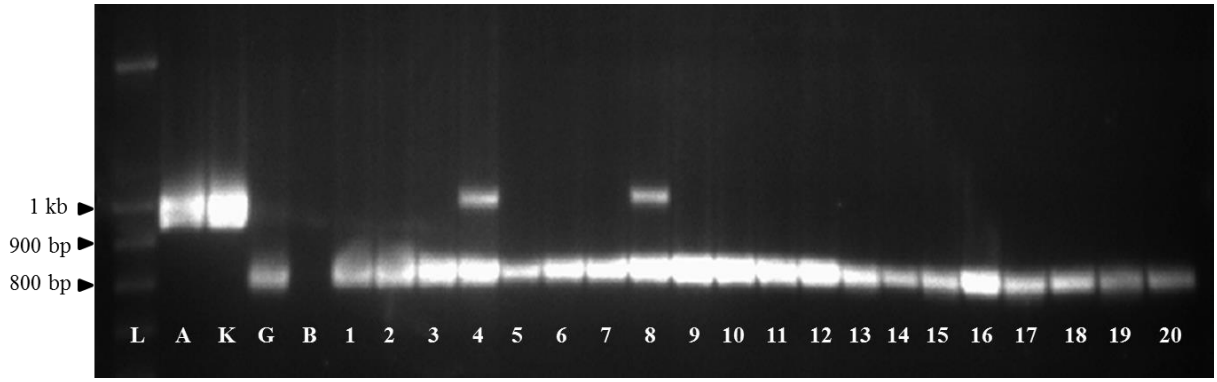

Figura 6. Resultado das reações de cadeia da polimerase, em gel de agarose, para detecção dos idiomorfos de *mating type (MAT1-1* ou *MAT1-2*) e do gene *AVR1-CO39*. L: Marcador molecular de 100 bp; A: Py 184 (*AVR1-CO39* = 1,05 kb), K: KA-3 (*MAT1-1* = 960 bp); G: GUY11 (*MAT1-2* = 802 bp); B: controle negativo, sem DNA; 1-20 são isolados das 19 subpopulações, apresentando *mating type MAT1-2*, caracterizado neste estudo; o gene *AVR1-CO39* foi detectado nos isolados 4 e 8. 1=Py 10.651, 2=Py 10.873, 3=Py 9.978, 4=Py 10.830, 5=Py 10.890, 6=Py 10.182, 7=10.707, 8=Py 10.906, 9=Py 10.915, 10=Py 9.877, 11=Py 10.630, 12=Py 9.938, 13=Py 9.984, 14=Py 10.672, 15=Py 10.599, 16=Py 9.866, 17=Py 9.907, 18=Py 9.928, 19=Py 10.896, 20=Py 10.639

4.4 CARACTERIZAÇÃO SEXUAL DE *Magnaporthe oryzae*

A análise fenotípica foi realizada em 106 isolados, confirmando, quanto ao tipo compatível. O *mating type* dos isolados de *M. oryzae* foi identificado em *MAT1-1* ou *MAT1-2*, conforme Nottéghem & Silué (1992). As colônias dos isolados de campo analisados, que ao parearem com a colônia de GUY11 (*MAT1-2*) e produziram peritécios, foram identificadas como *MAT1-1* e as que produziram peritécios do lado do isolado KA-3 (*MAT1-1*) foram identificadas como *MAT1-2*. Os isolados que não formaram peritécio em nenhum dos dois lados dos isolados de referência foram identificados como não determinado (N.D.), apesar dos resultados de PCR terem permitido a identificação molecular do *mating type*.

Depois de 21 dias, quando as colônias dos três isolados estavam crescidas e pareadas, formou-se uma linha de encontro entre os isolados, local onde formou-se ou não os peritécios. A sexualidade dos isolados de *M. oryzae* foi classificada em fêmea, macho ou hermafrodita (Figura 7). Os isolados foram considerados fêmeas (F) quando formaram uma única faixa de peritécio no seu próprio lado; machos (M) foram os que formaram uma única faixa de peritécio do lado do isolado referência; e, isolado hermafrodita (H) aqueles que formaram duas faixas de peritécios paralelas na intersecção do crescimento micelial. Isolados que não produziram peritécios, não tiveram sua sexualidade determinada (N.D.).

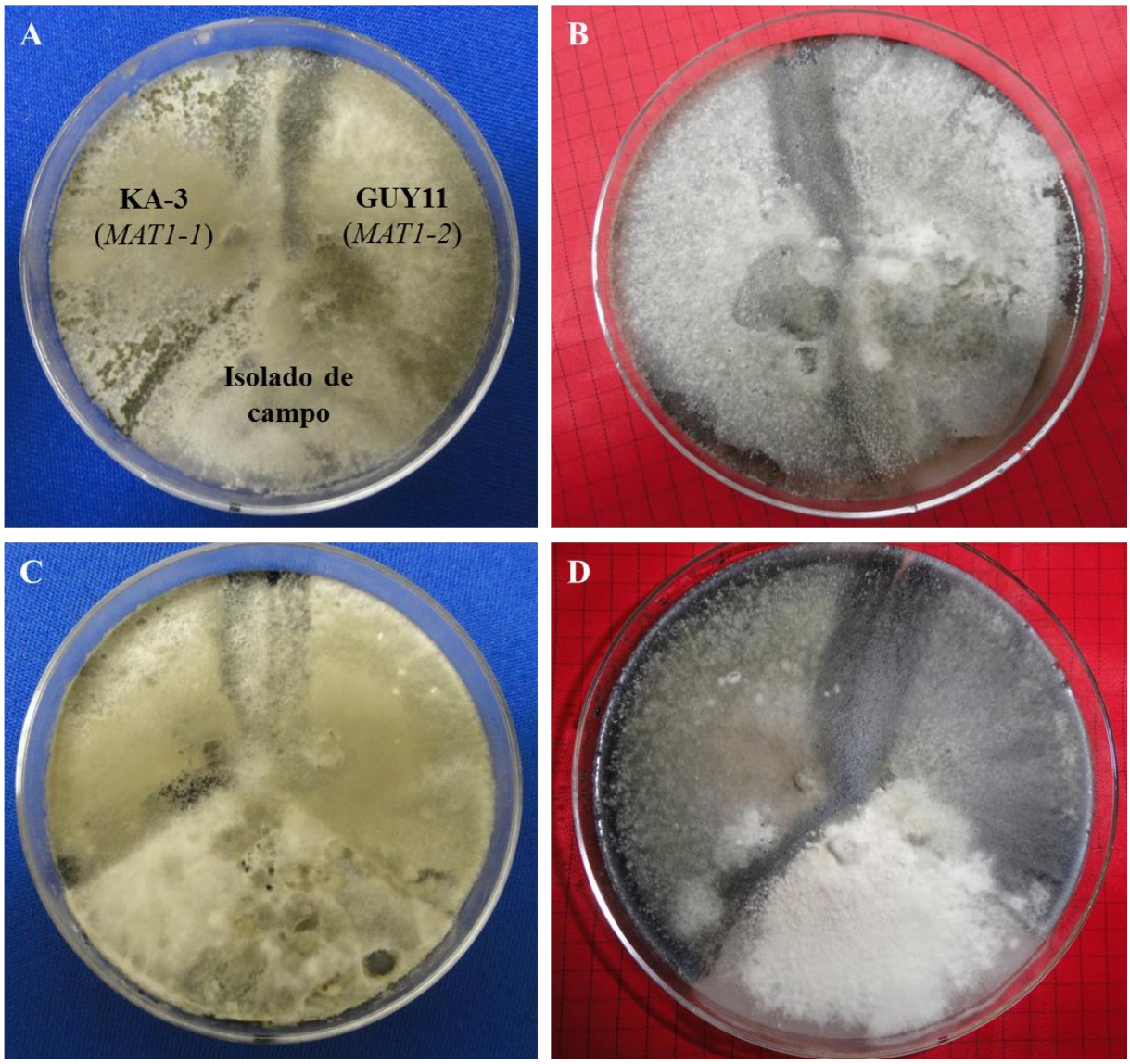

Figura 7. Pareamento do isolado de campo A=Py 10.824, B=Py 10.854, C=Py 10.630 e D=Py 10.915, com os isolados referência KA-3 e GUY11, em placa de Petri, contendo meio de cultura farelo de arroz. A e B – isolados hermafroditas (formação de duas faixas paralelas de peritécios, na intersecção do crescimento micelial de ambos os isolados); C – isolados machos [formação de uma única faixa de peritécio do lado do isolado referência (KA-3)]; D – isolados fêmeas (formação de uma única faixa de peritécio do lado do isolado testado)

Dentre os 106 isolados pareados estudados, um, ou 0,94%, foi identificado como fêmea (F): Py 10.915, pertence à subpopulação 8, da região Norte, no município de Formoso do Araguaia, em Tocantins, e foi isolado da cultivar IRGA 417; três, ou 2,8%, foram identificados como hermafrodita (H): Py 10.824, Py 10.854 e Py 10.890; 62, ou 57,9%, como macho (M); e 41, ou 38,3%, como não determinado, considerados inférteis

(I), pois não foi observado a formação da estrutura de reprodução sexual, não sendo possível verificar em qual lado formou peritécio (Tabela 4).

Assim como a sexualidade, a fertilidade dos isolados de *M. oryzae* foi avaliada após 21 dias e foi determinada pela quantidade de peritécios formados em uma área de 1 cm^2 na superfície do meio de cultura de farelo de arroz. Entre os 106 isolados estudados, 37 (34,9%) foram altamente férteis (A); 4 (3,8%), medianamente férteis (M); 23 (21,7%) apresentaram baixa fertilidade (B); 42 (39,6%) são inférteis (I), conforme tabela 4. A subpopulação 11 foi a única em que todos os isolados apresentaram o mesmo estado de fertilidade (altamente férteis).

Tabela 4. Relação de isolados de campo, número da coleção, cor da colônia (E - escura ou C - clara), população, avaliados quanto à fertilidade e sexualidade

N. Coleção		Cor		População	Fertilidade	Sexualidade
Py	9.862	E	E	18	Baixa	Macho
Py	9.866	E	E	15	Baixa	Macho
Py	9.875	C	C	9	Infértil	Macho
Py	9.875	E	E	9	Infértil	Macho
Py	9.877	C	E	9	Baixa	Macho
Py	9.907	E	E	16	Infértil	N.D.*
Py	9.912	E	E	16	Infértil	N.D.
Py	9.928	C	E	17	Alta	Macho
Py	9.928	E	E	17	Baixa	Macho
Py	9.935	E	E	6	Infértil	N.D.
Py	9.936	E	E	6	Infértil	N.D.
Py	9.938	E	E	11	Alta	Macho
Py	9.940	E	E	19	Alta	Macho
Py	9.942	E	E	19	Infértil	N.D.
Py	9.943	E	E	19	Infértil	N.D.
Py	9.944	E	E	19	Infértil	N.D.
Py	9.945	E	E	19	Infértil	N.D.
Py	9.947	E	E	15	Infértil	N.D.
Py	9.948	E	E	15	Baixa	Macho
Py	9.949	E	E	15	Baixa	Macho
Py	9.950	E	E	15	Infértil	N.D.
Py	9.952	E	E	15	Baixa	Macho
Py	9.978	E	E	3	Infértil	N.D.
Py	9.984	E	E	12	Alta	Macho
Py	9.995	E	E	11	Alta	Macho
Py	9.996	E	E	11	Alta	Macho
Py	10.005	E	E	17	Baixa	Macho

Coleção		Cor		População	Fertilidade	Sexualidade
Py	10.007	E	E	9	Infértil	N.D.
Py	10.014	C	E	15	Infértil	N.D.
Py	10.015	C	E	15	Baixa	Macho
Py	10.017	E	E	15	Baixa	Macho
Py	10.018	E	E	15	Infértil	N.D.
Py	10.182	E	E	6	Alta	Macho
Py	10.184	E	E	19	Infértil	N.D.
Py	10.188	E	E	6	Baixa	Macho
Py	10.594	E	E	14	Baixa	Macho
Py	10.595	E	E	12	Infértil	N.D.
Py	10.599	E	E	14	Alta	Macho
Py	10.600	E	E	2	Baixa	Macho
Py	10.629	E	E	13	Infértil	N.D.
Py	10.630	E	E	10	Alta	Macho
Py	10.631	E	E	1	Infértil	N.D.
Py	10.636	E	E	5	Infértil	N.D.
Py	10.639	C	C	19	Alta	Macho
Py	10.639	E	E	19	Infértil	N.D.
Py	10.640	E	E	19	Infértil	N.D.
Py	10.641	E	E	14	Infértil	N.D.
Py	10.648	E	E	10	Infértil	N.D.
Py	10.649	E	E	1	Infértil	N.D.
Py	10.651	E	E	1	Baixa	Macho
Py	10.653	E	E	1	Baixa	Macho
Py	10.662	E	E	7	Baixa	Macho
Py	10.672	E	E	13	Alta	Macho
Py	10.674	E	E	14	Média	Macho
Py	10.677	E	E	19	Infértil	N.D.
Py	10.679	E	E	13	Infértil	N.D.
Py	10.707	E	E	7	Alta	Macho
Py	10.712	E	E	4	Alta	Macho
Py	10.716	E	E	4	Baixa	Macho
Py	10.719	E	E	17	Infértil	N.D.
Py	10.724	E	E	17	Baixa	Macho
Py	10.725	C	E	17	Infértil	N.D.
Py	10.727	E	E	17	Alta	Macho
Py	10.728	E	E	17	Alta	Macho
Py	10.729	E	E	17	Alta	Macho
Py	10.732	E	E	8	Alta	Macho
Py	10.733	C	E	8	Alta	Macho
Py	10.746	E	E	8	Média	Macho

Coleção		Cor		População	Fertilidade	Sexualidade
Py	10.753	E	E	8	Infértil	N.D.
Py	10.755	E	E	5	Baixa	Macho
Py	10.760	E	E	5	Infértil	N.D.
Py	10.761	E	E	9	Infértil	N.D.
Py	10.768	E	E	4	Infértil	N.D.
Py	10.776	E	E	2	Infértil	N.D.
Py	10.794	E	E	5	Alta	Macho
Py	10.798	C	E	5	Infértil	N.D.
Py	10.798	E	E	5	Infértil	N.D.
Py	10.806	E	E	5	Baixa	Macho
Py	10.819	E	E	4	Alta	Macho
Py	10.821	E	E	7	Infértil	N.D.
Py	10.824	E	E	4	Alta	Hermafrodita
Py	10.827	E	E	4	Infértil	N.D.
Py	10.830	E	E	4	Alta	Macho
Py	10.831	E	E	4	Alta	Macho
Py	10.840	C	E	17	Alta	Macho
Py	10.841	E	E	8	Alta	Macho
Py	10.848	E	E	8	Alta	Macho
Py	10.852	E	E	8	Alta	Macho
Py	10.853	E	E	8	Infértil	N.D.
Py	10.854	E	E	8	Alta	Hermafrodita
Py	10.871	E	E	8	Baixa	Macho
Py	10.873	E	E	2	Alta	Macho
Py	10.876	E	E	2	Infértil	N.D.
Py	10.884	E	E	5	Infértil	N.D.
Py	10.885	E	E	5	Alta	Macho
Py	10.890	E	E	5	Alta	Hermafrodita
Py	10.893	E	E	5	Alta	Macho
Py	10.896	E	E	18	Média	Macho
Py	10.907	E	E	8	Alta	Macho
Py	10.908	E	E	8	Média	Macho
Py	10.909	E	E	8	Baixa	Macho
Py	10.910	E	E	8	Alta	Macho
Py	10.915	E	E	8	Alta	Fêmea
Py	10.919	E	E	5	Baixa	Macho
Py	11.055	E	E	5	Alta	Macho
Py	11.056	E	E	5	Infértil	N.D.

*N.D. - Sexualidade não determinada.

A estrutura sexual formada do pareamento dos isolados KA-3 e GUY11 crescidos em meio de cultura de farelo de arroz foram avaliados microscopicamente. Através da microscopia óptica, observamos a região de encontro das colônias, onde foi possível observar a formação de peritécios escuros, globosos; de pescoço comprido, cilíndricos (Figura 8 A, B e C), ascos unitunicados, parede fina, hialino; ascósporos longos fusiformes, curvos, tricelulares, hialinos (Figura 8 D).

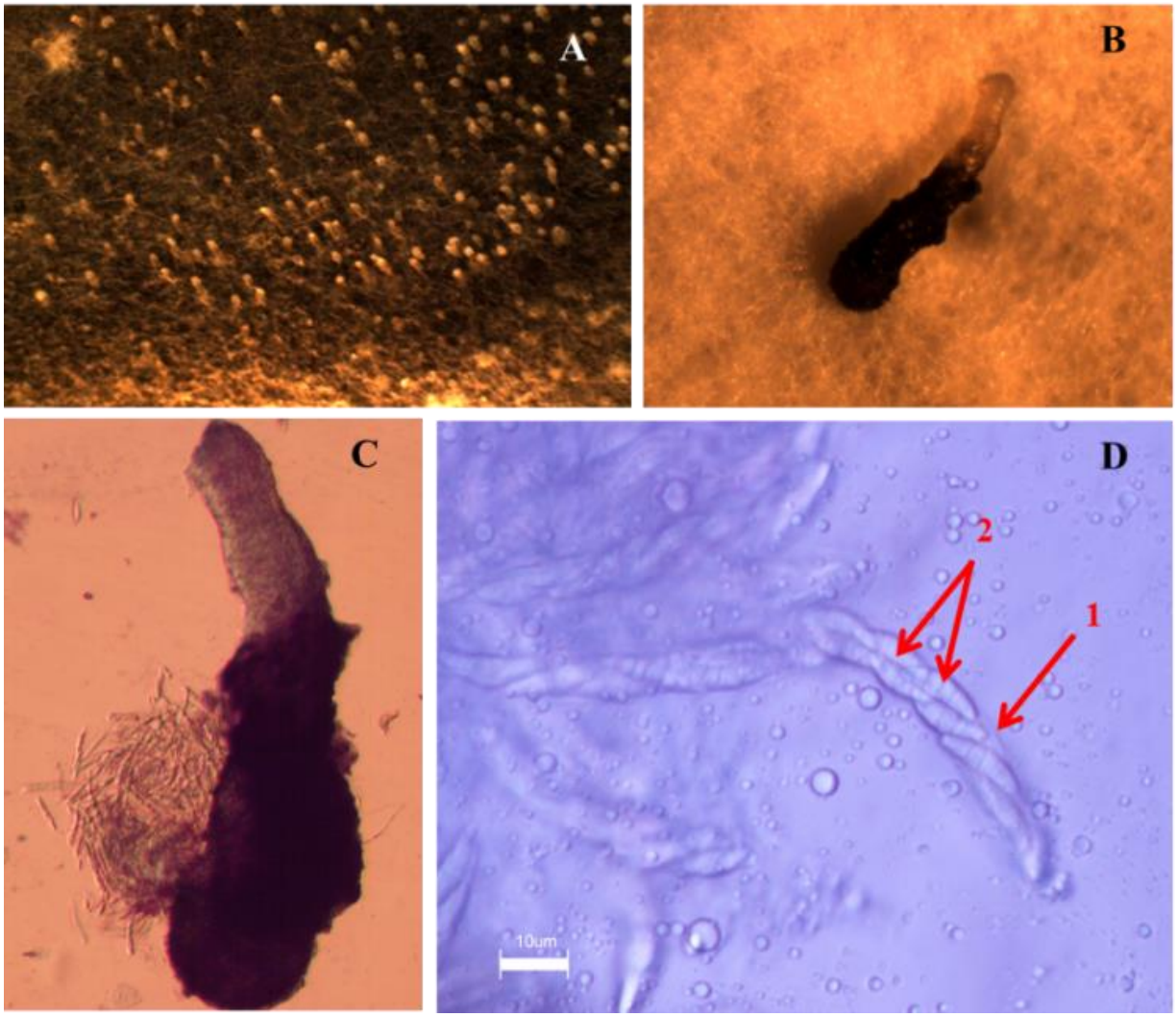

Figura 8. Estrutura de reprodução sexual de *Magnaporthe oryzae*, denominada peritécio (A, B e C), constituída de ascos (D1) contendo ascósporos (D2). Fotos obtidas em estereomicroscópio (A e B) e microscópio ótico (C e D)

O pareamento dos isolados KA-3 e GUY11 em folha de arroz esterilizada e posta em meio de cultura de farelo de arroz revelou, a partir de imagens microscópicas obtidas de diversos cortes, com o uso de micrótomo, a formação de peritécio e protoperitécio, na epiderme da folha do arroz (Figura 9). Podemos observar também, a formação de peritécio em três partes da folha: abaxial [parte superior, ventral (Figura 9 B e C)], adaxial [parte inferior, dorsal (Figura 9 D e E)] e no interior [entre as epidermes, subepidermial (Figura 9 F)].

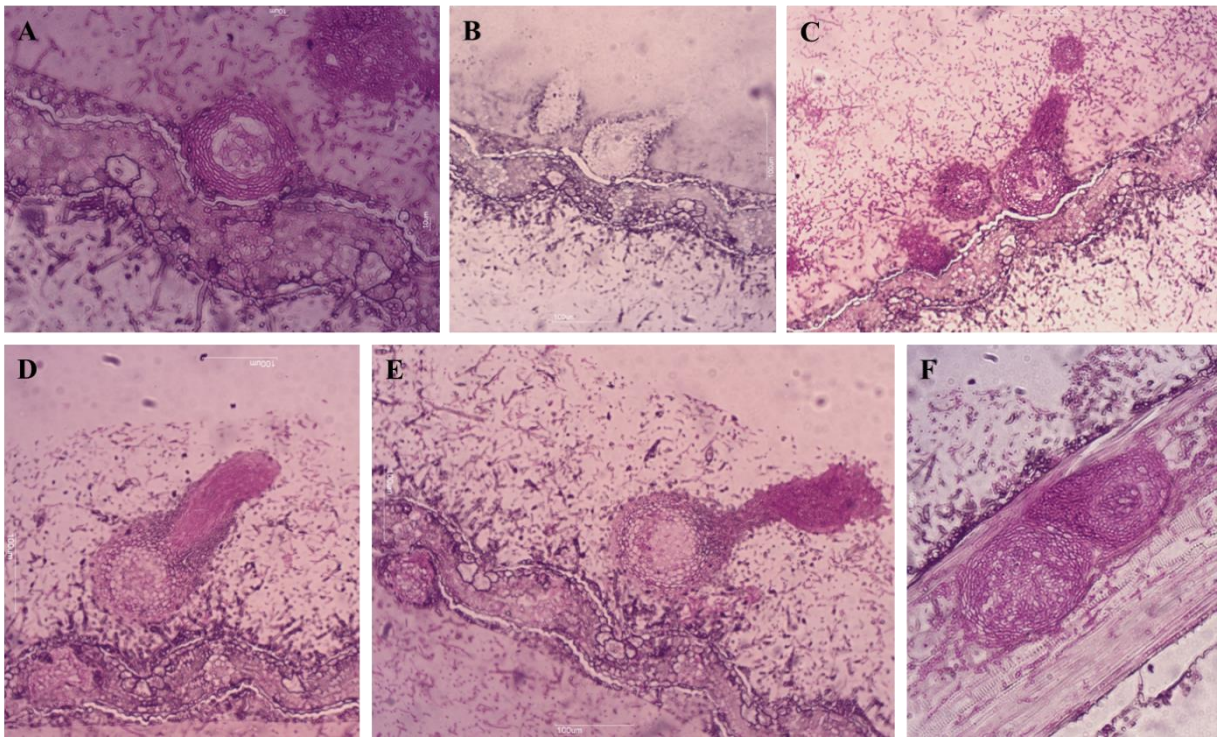

Figura 9. Cortes longitudinais de protoperitécios e peritécios formados durante o pareamento dos isolados KA-3 e GUY11, em folhas de arroz esterilizadas. A – protoperitécio na epiderme da folha de arroz; B e C – peritécios e protoperitécios na epiderme abaxial da folha; D e E – peritécios na epiderme adaxial da folha; F – protoperitécio e peritécio na subepidermais (entre as duas camadas de epiderme da planta)

Com auxílio do microscópio eletrônico de varredura, foi possível observar a formação de peritécios em conjunto, isolados e formados em uma mesma colônia juntamente com a fase assexual deste fungo, caracterizada pela presença de conídios (Figura 10).

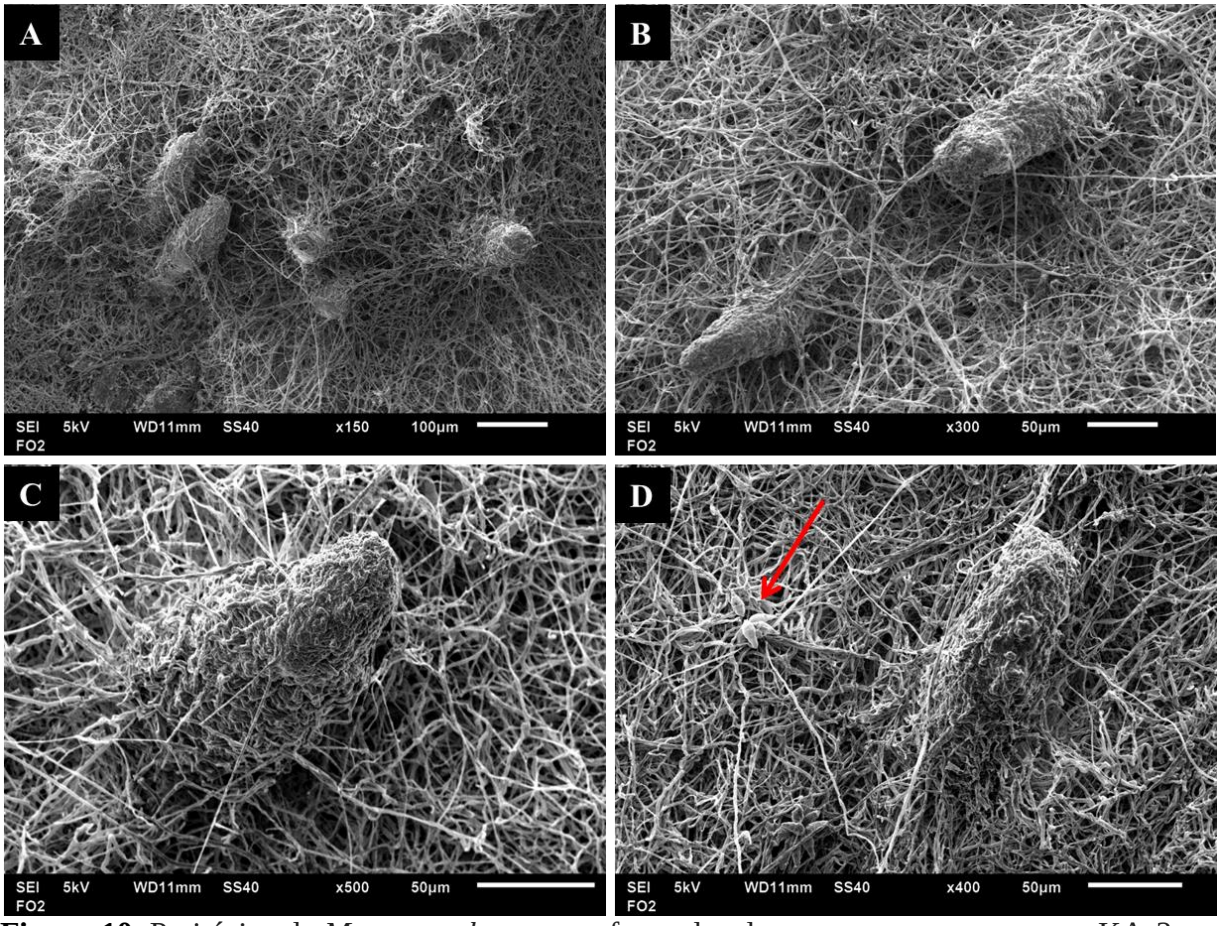

Figura 10. Peritécios de *Magnaporthe oryzae*, formados durante o pareamento entre KA-3 e GUY11, registrados por microscopia eletrônica de varredura. A e B – conjunto de peritécios, submersos no micélio, desenvolvidos sobre folha de arroz; C – peritécio isolado submerso e recoberto por micélio; D – conídios (seta) e peritécio formados lado a lado

5 DISCUSSÃO

Este trabalho relata a primeira análise, realizada no Brasil, com subpopulações de *Magnaporthe oryzae*, identificadas por Gonçalves (2013), coletadas de todas as regiões produtoras de arroz do país, para determinação da presença dos idiomorfos *MAT1-1* e *MAT1-2* do gene *mating type* e do gene *AVR1-CO39*; as características sexuais como a sexualidade e fertilidade também foram avaliadas. Os resultados indicam apenas um tipo compatível (*MAT1-2*), o qual encontra-se presente em todas as subpopulações amostradas, totalizando 208 isolados de campo, enquanto somente dois isolados apresentaram o gene *AVR1-CO39*. Foi relatado também que, entre os 106 isolados analisados para sexualidade e fertilidade encontrou-se três hermafroditas e uma fêmea-fértil, todos com alta fertilidade.

Os resultados sobre as características sexuais de *M. oryzae* são importantes, pois, se confirmada a reprodução sexuada, as estratégias de controle devem ser alteradas. Devido a rápida suplantação de resistência das cultivares, novas estratégias podem auxiliar na seleção e identificação de novas resistências como forma de reduzir as perdas causadas pela brusone. Conforme McDonald & Linde (2002), a recombinação aumenta a probabilidade de combinações alélicas favoráveis serem geradas, selecionadas e rapidamente disseminadas, comprometendo, assim, estratégias de controle como a exclusão de subpopulação e piramidização que apresentam probabilidades de falhas, se o patógeno apresentar reprodução sexuada.

O estudo do gene *AVR1-CO39* apresenta grande importância, pois ele é utilizado como referência em estudos de população e a cultivar CO39 é muito utilizada em pesquisas, por razão das isolineas. Assim sendo, este estudo é de grande importância ao melhoramento de plantas, pois com a rápida suplantação da resistência é preciso ter informações de quais genes de avirulência estão sendo perdidos, para utilizar o respectivo gene de resistência em novas cultivares. Os dados obtidos neste trabalho complementam os dados apresentados por Gonçalves (2013).

Isolados de campo: Os isolados de campo utilizados foram anteriormente estudados por Gonçalves (2013), o qual organizou a estrutura populacional de isolados, com o intuito de rastrear a variabilidade genética de *M. oryzae* em regiões produtoras de

arroz no Brasil. Assim, os resultados apresentados neste trabalho refletem a população brasileira.

No estudo de Gonçalves (2013), ao analisar o setor formado na colônia monoconidial, foi detectado que os isolados, oriundos da colônia formadora de setor, classificaram-se como patótipos diferentes, e os marcadores SSR identificaram variabilidade genética entre eles. Essa diferença nos levou a analisar se entre 14 isolados monoconidiais, com colônia formadora de setor (totalizando 28 indivíduos), haveria alguma mudança quanto às características genéticas estudadas no presente trabalho. Foi observado que não houve relação da cor da colônia ao *mating type* e/ou gene de avirulência.

Conforme Punkari & Henrici (1933) a formação de setores é facilmente observada em publicações sobre colônias de leveduras. Segundo Prabhu & Filippi (2006), estes setores ocorrem comumente e são formados durante o estabelecimento de isolados monoconidiais de *M. oryzae*, e relatam que setores formados de um isolado, ao serem inoculados em plantas de arroz causaram diferentes reações de resistência e suscetibilidade, quando comparado à colônia principal.

Punkari & Henrici (1933) relataram, em um estudo minucioso, que a formação de setores pode ocorrer devido a gradiente metabólico ou mudanças semelhantes à mutação. Suzuki (1965) atribuiu este evento, em partes, à dissociação de heterocarióticos.

No presente trabalho, foi observado que algumas colônias, que se tornaram claras, se mantiveram claras (Py 9.875, Py 10.639 e Py 10.839), com isso para estes isolados há a possibilidade da mutação ser a causa da formação de setores destas colônias estudadas, como proposto por Punkari & Henrici (1933). Porém foi observado, também, que a coloração das colônias de 18 isolados (Tabela 1 e 4) não se mantiveram claras, assim, hipotetizamos que a razão da formação de setores é devida a fatores como a oscilação da incidência de luz, temperatura, umidade, homogeneidade do meio de cultura, antibiótico, que pode influenciar no metabolismo do fungo, sendo necessário novos experimentos que abordem este assunto. Foi observado também que a coloração da colônia de somente um (Py 10.779), dentre estes 18 isolados, passou de escura para clara, mostrando um baixo potencial para a perda de uma das principais características necessárias para penetração deste fungo, a melanina, o que indica um possível mecanismo de regulação de expressão gênica. Para um conhecimento mais aprofundado quanto à formação de setores, outros estudos, comparando formadores e não de setores, são necessários.

Gene *AVR1-CO39*: O patossistema *M. oryzae*-arroz é explicado pela interação 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). Entre os 208 isolados analisados, somente os isolados Py 10.830 e Py 10.906, equivalendo a 0,96% da coleção estudada, apresentou este gene (Tabela 1). Estes isolados pertencem à subpopulações 4 e 8; da região Centro-Oeste e Norte; e foram isolados da cultivar EPAGRI 116 e IRGA 417, respectivamente.

A caracterização quanto ao gene de avirulência *AVR1-CO39*, somou-se aos resultados de Gonçalves (2013), que ao realizar os testes de patogenicidade observou que, aproximadamente, 74% dos isolados foram capazes de infectar a cultivar CO39, que possui o gene de resistência *Pi-CO39*. Farman et al. (2002) descobriram que todos os isolados que infectaram o arroz apresentaram rearranjos no locus *AVR1-CO39* que tornou este locus não funcional. Esta descoberta fornece uma explicação molecular para o qual a maioria dos isolados de arroz são virulentos em CO39.

Entre os 72 isolados avaliados, tanto para a patogenicidade na cultivar CO39, realizada por Gonçalves (2013), como a presença do gene *AVR1-CO39* do patógeno, no presente trabalho, 15 foram incapazes de infectar a planta, sendo que somente um (Py 10.906) destes 15, apresentou o gene *AVR1-CO39*, apresentando a interação gene-a-gene (Flor, 1971; Silué et al., 1992). Os demais 14 isolados não apresentaram o gene *AVR1-CO39* e, mesmo assim, a cultivar apresentou resistência, indicando outro possível mecanismo envolvido nessa interação. Assim, esta resistência pode estar relacionada com outros genes, sendo que estes 14 isolados podem ser fonte rica em outros genes de avirulência específicos para diferentes cultivares de arroz, como foi sugerido ao isolado 2539 por Leong et al. (1994) aos resultados de Smith & Leong (1994).

Dos demais 57 isolados, os quais infectaram a CO39, 56 não apresentaram o gene de avirulência, corroborando com os dados de outros estudos em que o gene de avirulência não está presente na maioria dos isolados que infectam o arroz (Farman et al., 2002; Tosa et al., 2005). Porém, o isolado Py 10.830, que de acordo com Gonçalves (2013) infectou a cultivar CO39 (que apresenta o gene de R, denominado de *Pi-CO39(t)*), foi detectado, neste trabalho, a presença do gene *AVR1-CO39*, ou seja, mesmo apresentado o gene *AVR1-CO39* e *Pi-CO39(t)* aconteceu a doença. Isso pode ser devido à ausência de um outro gene de avirulência que juntamente com gene de resistência específicos presente, geraria a resistência; ou, mesmo com a presença de outros genes de avirulência, além do

gene *AVR1-CO39*, a cultivar CO39 não apresenta os outros genes de resistência específicos. Além disso, a resistência à *AVR1-CO39*, não depende somente da presença dos dois genes (resistência e avirulência) para que ocorra. É necessário que não ocorram deleções, nem substituições de alguns nucleotídeos do gene, para que não ocorram mudanças conformacionais na proteína, e que o *motif* esteja presente para auxiliar na translocação, visto que este *motif*, aparentemente, é necessário para atividade de avirulência.

AVR1-CO39 foi relatado pela primeira vez por Valent et al. (1991), e desde os primeiros estudos para detecção deste gene, os isolados de arroz já apresentavam baixa presença do mesmo, assim, com a detecção de dois isolados, somente, podemos concluir que este gene de avirulência ocorre em frequências muito baixas na população brasileira.

Outra explicação para esta baixa frequência, está na pressão de seleção e co-evolução desse patossistema. Como a cultivar CO39 já foi muito utilizada no estado do Tocantins, esta baixa ocorrência pode ser devido a uma perda de função do gene *AVR1-CO39*, frente à evolução do patógeno, pois com a presença do gene de resistência, da CO39, os isolados sem o gene de avirulência ou com rearranjos no locus, sobreviveram à pressão de seleção e se tornaram predominantes.

Mating type: Estudos que avaliam a distribuição de *mating type* relatam predomínio de *MAT1-1* na América do Sul, 100% de *MAT1-1* na Europa, *MAT1-2* na Ásia e um equilíbrio dos dois tipos na África (Galbieri & Urashima, 2008; Dayakar et al., 2000; Consolo et al., 2005; Nottéghem & Silué, 1992; Kato & Yamaguchi, 1982; Yaegashi & Yamada, 1986). Em um estudo mais atualizado, Saleh et al. (2012b) analisaram a distribuição geográfica mundial de *mating types* de 3.800 isolados de *M. oryzae.* Ambos os tipos de acasalamento foram encontrados na maioria das regiões do mundo (Figura 3). Com os dados gerados por Saleh et al. (2012b), observamos predomínio de *MAT1-1* na América do Sul e do Norte, 100% de *MAT1-1* na Europa, *MAT1-2* na Ásia e na África.

No presente trabalho, realizado em isolados coletados nas regiões produtoras de arroz no Brasil (Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul), que representam as 19 subpopulações, e pertencente à América do Sul, relatamos o predomínio de 100% do gene *MAT1-2* em isolados de arroz. Como em outros estudos observou o predomínio do gene *MAT1-1*, em outros países da América do Sul, é preciso uma avaliação quanto a possibilidade de cruzamento sexual entre estes diferentes isolados.

Através do método do pareamento, não foi possível determinar o *mating type* e, consequentemente, as demais características sexuais de todos os isolados de campo, pois apresentaram baixa habilidade/capacidade de cruzamento, assim como observado em outros estudos (Galbieri & Urashima, 2008; Bruno & Urashima, 2001; Dayakar & Narayanan, 2000; Silué & Nottéghem, 1990; Zeigler, 1998).

A possível troca de material genético entre isolados de *M. oryzae*, ocorre apenas entre os indivíduos de *mating type* oposto (*MAT1-1* e *MAT1-2*) (Mekwatanakarn et al., 1999). Como observamos uma prevalência de 100% de um *mating type* (*MAT1-2*), em um primeiro momento, descartamos a hipótese de que esteja ocorrendo reprodução sexuada, em condições de campo no Brasil. Porém, a possibilidade de ocorrência da reprodução sexuada, mesmo com os isolados apresentando somente um tipo compatível, é plausível quando detecta-se a ocorrência de *mating type* oposto ao dos isolados de arroz, em outras hospedeiras alternativas/secundárias, ou outra cultura (Galbieri & Urashima, 2008; Bruno & Urashima, 2001; Urashima et al., 1993), podendo ocorrer na entre safra do arroz (Saleh et al., 2012b), e/ou em uma mesma área.

Maciel et al. (2014) observaram ambos *mating types* em quase todas as populações de *M. oryzae* que infectam trigo e, juntamente com Galbieri & Urashima (2008), Bruno & Urashima (2001), Urashima et al. (1993), relatam a alta incidência de *MAT1-1* em isolados de trigo e outros hospedeiros, além da possibilidade de haver um predomínio de *MAT1-1* em hospedeiros alternativos/secundários, e em *Magnaporthe* sp. que sobrevivem na palhada, abre a possibilidade de ocorrerem tipos compatíveis opostos entre isolados de diferentes culturas. Consequentemente, devemos considerar que há condições biológicas para o pareamento/compatibilidade, necessária para posterior reprodução sexuada entre os isolados de *M. oryzae*. Contudo, a ocorrência de *mating types* opostos é um dos três requisitos para que o evento da reprodução sexuada seja bem sucedido, sendo necessário que os tipos opostos sejam de sexos opostos e férteis.

Sexualidade: Houve um predomínio de isolados machos (fêmeas-estéreis) (~58%), daqueles que tiveram a sexualidade determinada, o que está de acordo com as observações de Zeigler (1998), de que a maioria dos ascomicetos são fêmeas-estéreis. Apesar do predomínio de isolados machos, encontrou-se, entre os isolados analisados, a presença de três hermafroditas e uma fêmea-fértil, sendo este o primeiro relato da presença no Brasil. São raros estes tipos de isolados fora do centro de origem do arroz, sendo que

somente outros dois isolados fêmeas-férteis foram identificados fora dessa região, na Guiana Francesa (Saleh et al., 2012b).

De acordo com Bruno & Urashima (2001), para que haja cruzamento sexual entre diferentes isolados é necessário que haja hermafroditismo e feminilidade. Apesar do predomínio de machos, em todos os estudos, para que haja cruzamento sexual é necessário não somente da fêmea-fértil, mas sim de um equilíbrio quanto à sexualidade, não dependendo de isolados hermafroditas, também pouco encontrados. Além de que, conforme Saleh et al. (2012a), a fertilidade feminina de isolados de arroz pode ser perdida em culturas assexuais *in vitro*, o que é explicado pela ocorrência de mecanismos genéticos como mutações, deleção do gene ou expressivos grandes rearranjos cromossômicos (Xu, 2002). O resultado dessa perda da fertilidade feminina também é explicado por Leslie & Klein (1996), os quais justificam através da feminilidade ser geneticamente complexa e devido às muitas mutações únicas diferentes. Com essa fácil perda *in vitro*, não pode se concluir que a característica fêmea-fértil seja, também, facilmente perdida na natureza, podendo estar em equilíbrio; e também não podemos concluir que todos os isolados identificados como machos-férteis, não sejam hermafroditas, já que há esta fácil perda da fertilidade feminina *in vitro*.

Fertilidade: Apesar de aproximadamente 40% dos isolados representantes do Brasil serem inférteis, em torno de 35% são altamente férteis. O único isolado fêmea identificado (Py 10.915) e os três hermafroditas (Py 10.824, Py 108.54 e Py 10.890) apresentam alta fertilidade. Saleh et al. (2012a) concluíram que o número de peritécios reflete a proporção do tipo selvagem dos indivíduos fêmeas-fértéis restantes na população. Apesar de Park et al. (2010) afirmarem que o genoma de *M. oryzae* é estável após 10 gerações em meio artificial e em plantas, Saleh et al (2012a) observaram uma diminuição gradual na produção de peritécios até alcançar a esterilidade feminina completa, indicando que a reprodução assexual induz a perda rápida e permanente da capacidade de reprodução sexual de isolados fêmeas-férteis. São necessários mais estudos do genoma e de genômica funcional para que encontremos genes, que poderiam estar relacionadas com a sexualidade e fertilidade dos indivíduos de *M. oryzae*.

Como podemos observar em trabalhos como o de Leung & Williams (1985), Consolo et al. (2005) e Bruno & Urashima (2001) há uma variação quanto à área, na placa de Petri, a ser avaliada, para o número de peritécios formados, sendo eles 5mm^2, 1 cm^2 e 25 mm^2, respectivamente. Isso faz com que os resultados mundiais não possam ser comparados. Neste trabalho, utilizamos o meio termo das opções disponíveis na literatura

(1 cm^2), sendo necessária uma padronização para o estudo desse parâmetro. Apesar de a literatura ter como indicativo a análise de fertilidade através do número de peritécios formados em uma determinada área, ao conduzir este trabalho, acreditamos que a fertilidade deva ser avaliada também, através da capacidade dos peritécios formados de produzir ascos e ascósporos e até mesmo a viabilidade destes ascósporos poderia ser considerada como critério de avaliação da fertilidade.

Variabilidade: O emprego de métodos inadequados para seleção de genótipos resistentes (Chen et al., 1995), e o uso intensivo de determinadas cultivares muito próximas geneticamente, contribuem para a instabilidade da resistência genética observada em campo (Zhu et al., 2000). Diferentes estratégias de melhoramento têm sido adotadas para o aumento da durabilidade da resistência e estas requerem conhecimentos sobre a estrutura da população do patógeno (Silva, 2004). Um dos fatores da estrutura de população que interfere na estratégia de melhoramento são os mecanismos de variabilidade genética em fungos. Scheuermann et al. (2012), sugeriram que mecanismos diferentes atuam de modo a criar variabilidade genética em *M. oryzae*. De acordo com (Kistler & Miao, 1992), os principais mecanismos de variabilidade presente neste fungo são: recombinação sexual, parassexualidade e a ocorrência de mutações.

Apesar do peritécio, o qual evidencia a reprodução sexual, ainda não ter sido encontrado em campo, o alto nível de diversidade apresentada por *M. oryzae* nos leva a considerar que exista a recombinação genética neste fungo. Com os dados apresentados no presente trabalho (isolados hermafroditas e fêmea férteis; *MAT1-2* em isolados de arroz), em conjunto com outros trabalhos (prevalência de *MAT1-1* em outras gramíneas), existe a possibilidade que a grande variabilidade observada desse fungo pode estar ocorrendo por conta da reprodução sexual. Além disso, a observação da formação de peritécio dentro da folha de arroz *in vitro* levanta a possibilidade de este evento ocorrer dentro da planta, o que precisa ser investigado em condições de campo, para saber se tais estruturas não foram observadas até hoje devido a isso.

Com a possível raridade da ocorrência do ciclo sexual em campo, a recombinação parassexual em *M. oryzae* pode ser uma alternativa para a geração de variabilidade, visto que, para a fusão de hifas, é necessária a presença de indivíduos com diferentes *mating types*, assim como na reprodução sexuada. Estudos visando evidenciar a possibilidade de ocorrência de parassexualidade em condições de campo no Brasil são necessários para tentar melhor entender a geração de patótipos de *M. oryzae*.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, pudemos concluir que as subpopulações de *Magnaporthe oryzae* dos campos produtores de arroz do Brasil são compostas de isolados que possuem o gene idiomorfo *MAT1-2*. Dos isolados testados, pudemos observar três isolados hermafroditas e um isolado fêmea-fértil, todos com alta fertilidade, o que é um evento raro de ser encontrado fora do centro de origem do arroz, sendo, apenas, o segundo local relatado até hoje. Além disso, aproximadamente 60% dos 106 isolados testados apresentaram algum grau de fertilidade.

Dentre os isolados testados, apenas dois apresentaram o gene *AVR1-CO39*, evidenciando a perda ou rearranjos expressivos desse gene em isolados que infectam arroz devido à pressão de seleção. O isolado Py 10.830, apesar de possuir o gene, foi capaz de infectar a cultivar CO39, indicando que mutações possam ter ocorrido nesse gene tornando seu efetor irreconhecível pela proteína produzida pelo gene de resistência *Pi-CO39(t)*. Estudos da sequência do gene *AVR1-CO39* do isolado Py 10.830 são de interesse para entender se mutações podem ter sido a causa desse evento, o que seria de grande valia para entender melhor a interação do gene de avirulência com o gene de resistência.

Devido à grande variabilidade e geração de patótipos de *M. oryzae*, acreditamos que a recombinação genética deste fungo possa estar ocorrendo em campo, mesmo que apenas um *mating type* tenha sido relatado para isolados que infectam o arroz. A presença do outro *mating type* em isolados de outras gramíneas, assim como a observação de peritécio sendo formado no interior da folha de arroz *in vitro*, levanta a possibilidade de ocorrência de reprodução sexuada e uma possível razão do porque as estruturas sexuais nunca foram relatadas em campo. Além da recombinação sexuada, a presença de isolados, mesmo que de culturas diferentes, com ambos os *mating types*, levanta a possibilidade de, pelo menos, estar ocorrendo a recombinação parassexual.

Através dos dados obtidos nesse trabalho, pudemos caracterizar as subpopulações de *M. oryzae* e levantar questões que precisam de uma melhor investigação para conseguirmos entender melhor a interação arroz/*M. oryzae*, visando utilizar um método de controle mais efetivo, para reduzir a incidência da doença e, consequentemente, melhorar a produção e qualidade dos grãos.

7 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922 p.

AZEVEDO, J. L. Recombinação em fungos. In: AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. 2 ed. Goiânia: Editora UFG, 2008. cap. 3, p. 130-176.

BALLINI, E.; NGUYEN, T. T. T.; MOREL, J. -B. Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. **Rice**, New York, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.

BEDENDO, I. P. Manchas foliares. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia:** Princípios e Conceitos. 4 ed., v. 1, Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v.1, cap. 25, p. 459-466.

BESPALHOK, F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Introdução ao Melhoramento de Plantas. In: BESPALHOK, F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento para resistência a doenças**. Disponível em: http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo % 2016 .pdf. Acesso em: set. 2014. cap 16, p.11-18.

BONMAN, J. M.; KUSH, G. S.; NELSON, R. J. Breeding Rice for resistence to pests. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, n. 30, p. 507-528, 1992.

BOYD, L. A.; RIDOUT, C.; OSULLIVAN, D. M.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Plant pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, London, v. 29, n. 4, p. 233-240, 2013.

BRUNO, A. C.; URASHIMA, A. S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo com a brusone de outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 21-26, 2001.

BRYAN, G. T.; WU, K. S.; FARRALL, L.; JIA Y. L.; HERSHEY, H. P.; MCADAMS, S. A.; FAULK, K. N.; DONALDSON, G. K.; TARCHINI, R.; VALENT, B. A single amino, acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 11, p. 2033-2045, 2000.

CAVARA, F. Fungi Longobardiae exsiccate sive mycetum specimina in *Longobardia collecta*, exsiccate et speciebus novis vel criticis, iconibus illustrata, Ed. Pugillus I, n. 49, 1891. Citado em: PADWICK, G. W. p. 18, 1950.

CHANG, T. T. Rice. In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. New York: Longman, 1996. p. 147-155.

CHANG, T. T. The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of the Asian and African rices. **Euphytica**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 4245-441, 1976.

CHAUHAN, R. S.; FARMAN, M. L.; ZHANG, H. B.; LEONG, S. A. Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVR1-CO39* of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v. 267, p. 603-612, 2002.

CHEN, D.; ZEIGLER, R. S.; LEUNG, H.; NELSON, R. J. Population structure of *Pyricularia grisea* at two sreening sites in the Philippines. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 1011-1020, 1995.

CHEN, X.; SHANG, J.; CHEN, D.; LEI, C.; ZOU, Y.; ZHAI, W.; LIU, W.; XU, J.; LING, Z.; CAO, Z.; MA, B.; WANG, Y.; ZHAO, X.; LI, S.; ZHU, L. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. **The Plant Journal**, Malden, v. 46, p. 794-804, 2006.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2013/14. v. 1, n. 3 - Terceiro Levantamento, Brasília: Conab, 2013. 72 p.

CONSOLO, V. F.; CORDO, C. A.; SALERNO, G. L. Mating-type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 160, p. 285-290, 2005.

COOKE, M. C.; ELLIS, J. B. New Jersey fungi. **Grevillea**, v. 8, n. 45, p. 11-16, 1879.

CORREA-VICTÓRIA, F. J.; ZEIGLER, R. S. Stability of partial and complete resistance in rice to *Pyricularia grisea* under rain-fed upland conditions in eastern Colombia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 977–982, 1995.

COUCH, B. C.; KOHN, L. M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia**, Bronx, v. 94, n. 4, p. 683-693, 2002.

DAYAKAR, B. V.; NARAYANAN, N. N.; GNANAMANICKAM, S. S. Cross-compatibility and distribution of mating type alleles of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in India. **Plant Disease**, Saint. Paul, v. 84, p. 700-704, 2000.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology,** Hoboken, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A Plant DNA Minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DESAKI, Y.; MIYA, A.; VENKATESH, B.; TSUYUMU, S.; YAMANE, H.; KAKU, H.; MINAMI, E.; SHIBUYA, N. Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, p. 1530-1540, 2006.

DING, S.; ZHOU, X.; ZHAO, X.; XU, J. R. The PMK1 MAP kinase pathway and infection-related morphogenesis. In: WANG, G. -L.; VALENT, B. **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. New York: Springer, 2009. p. 13-21.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, p. 539-548, 2010.

EBERT, D.; HAMILTON, W. D. Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. **Trends in Ecology & Evolution**, Oxford, *v.* 11, n. 2, p. 79-81, 1996.

EL GUILLI, M.; OUASSOU, A.; ADREIT, H.; MILAZZO, J.; NOTTÉGHEM, J. -L.; THARREAU, D. Caractérisation de la diversité génétique des isolats marocains de *Magnaporthe grisea* par des marqueurs RAPD et SCAR. **Al Awamia**, Montpellier, v. 2, p. 105-116, 2005.

ELVIRA, M. I.; GALDEANO, M. M.; GILARDI, P.; GARCÍA-LUQUE, I.; SERRA, M. T. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L^3 plants. **Journal of Experimental Botany**, Madrid, v. 59, n. 6, p. 1253-1265, 2008.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division, 2013. Disponível em: http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E. Acesso em: 09 jul. 2014.

FARMAN, M. L.; LEONG, S. A. Chromosome walking to the *AVR1-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: Discrepancy between the physical and genetic maps. **Genetics**, Baltimore, v. 150, p. 1049-1058, 1998.

FARMAN, M. L.; ETO, Y.; NAKAO, T.; TOSA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; MAYAMA, S.; LEONG, S. A. Analysis of the structure of the *AVR1-CO39* avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interacttions**, Saint Paul, v. 15, p. 6-16, 2002.

FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; CÔRTES, M. V. C. B.; MORAES, A. J. G.; PRABHU, A. S. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, San Diego, v. 58, p. 160-166, 2011.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

FUKUOKA, S.; SAKA, N.; KOGA, H.; ONO, K.; SHIMIZU, T.; EBANA, K.; HAYASHI, N.; TAKAHASHI, A.; HIROCHIKA, H.; OKUNO, K.; YANO, M. Loss of Function of a Proline-Containing Protein Confers Durable Disease Resistance in Rice. **Science**, Washington, v. 325, p. 998-1001, 2009.

FUKUOKA, S.; YAMAMOTO, S.; MIZOBUCHI, R.; YAMANOUCHI, U.; ONO, K.; KITAZAWA, N.; YASUDA, N.; FUJITA, Y.; NGUYEN, T.T.T.; KOIZUMI, S.; SUGIMOTO, K.; MATSUMOTO, T.; YANO, M. Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 4550, p. 1-7, 2014.

GALBIERI, R.; URASHIMA, A. S. Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual entre isolados de *Pyricularia grisea* de diferentes hospedeiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 22-28, 2008.

GONÇALVES, F. J. **Estrutura populacional de isolados de *Magnaporthe oryzae* Couch & Kohn de regiões produtoras de arroz (*Oryza sativa*) no Brasil**. 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

GUIMARÃES, C. M; SANTOS, A. B.; MAGALHÃES, A. M. J.; Sistema de cultivo. In: SANTOS, A.B.; STONE, L.F.; VIEIRA, N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2006. p. 53-96.

HAMER, J. E.; HOWARD, R. J.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science**, Washington, v. 239, n. 4837, p. 288-290, 1988.

HAYASHI, N.; LI, C. Y.; LI, J. L.; NAITO, H. *In vitro* production on rice plants of perithecia of *Magnaporthe grisea* from Yunnan, China. **Mycological Research**, New York, v. 101, n. 11, p. 1308-1310, 1997.

HEBERT, T. T. The Perfect Stage of *Pyricularia grisea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 83-87, 1971.

HOGENHOUT, S. A.; VAN DER HOORN,R. A. L.; TERAUCHI, R.; KAMOUN, S. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint. Paul, v. 22, n. 2, p. 115-122, 2009.

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A. Role of melanin in appressorium function. **Experimental Mycology**, San Diego, v. 13, p. 403-418, 1989.

HOWARD, R. J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 491-512, 1996.

HUANG, X.; KURATA, N.; WEI, X.; WANG, Z. -X.; et al. A map of rice genome variation reveals. **Nature**, London, v. 490, p. 497-503, 2012.

ITOI, S.; MISHIMA, T.; ARASE, S.; NOZU, M. Mating behavior of Japanese isolates of *Pyricularia oryzae*. **Phytopatologhy**, Saint Paul, v. 73, p. 155-158, 1983.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, p. 323-329, 2006.

KALE, S. D., GU, B., CAPELLUTO, D. G. S., et al. External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. **Cell**, Shaanxi, v. 142, p. 284-295, 2010.

KATO, H.; YAMAGUGHI, T. The Perfect State of *Pyricularia oryzae* Cav. from rice Plants in Culture. **Annals of the Phytopathological Society**, Tokyo, v. 48, p. 607-612, 1982.

KAWAKAMI, T. On the rice blast disease. **Journal of the Sapporo Society of Agriculture and Forestry**, Japan, v. 2, p. 1-47, 1901.

KHUSH, G. S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, n. 1, p. 1-6, 2005.

KHUSH, G. S.; JENA, K. K. Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In: WANG G. -L.; VALENT B. **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. New York: Springer, 2009. p 1-10.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3. ed., v. 2, São Paulo: Agronômica Ceres. 2005. 663 p.

KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, n. 1, p. 131-152, 1992.

KOLMER, J. A.; ELLINGBOE, A. E. Genetic relationships between fertility and pathogenicity and virulence to rice in *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Montreal, v. 66, p. 891-897, 1988.

KRAUSE, R. A.; WEBSTER, R. K. The morphology, taxonomy, and sexuality of the rice stem rot fungus, *Magnaporthe salvinii* (*Leptosphaeria salvinii*). **Mycologia**. New York, v. 64, p. 103-114, 1972.

KUMAR, J.; NELSON, R. J.; ZEIGLER, R. S. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. **Genetics**, Baltimore, v. 152, p. 971-984, 1999.

LEE, S. -W.; HAN, S. –W; SRIRIYANUM, M.; PARK, C. -J.; SEO, Y. -S.; RONALD, P. C. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. **Science**, Washington, v. 326, p. 850-853, 2009.

LEE, Y. -H.; DEAN, R. A. cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 693-700, 1993.

LESLIE, J. F.; KLEIN, K. K. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. **Genetics**, Baltimore, v. 144, p. 557-67, 1996.

LEUNG, H.; BORROMEO, E. S.; BERNARDO, M. A.; NOTTÉGUEM, J. -L. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1227-1233, 1988.

LEUNG, H.; WILLIAMS, P. H. Genetic analyses of electrophoretic enzyme variants, mating type, and hermaphroditism in *Pyricularia oryzae* Cavara. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Montreal, v. 27, p. 697-704, 1985.

LEVY, M.; CORREA-VICTÓRIA, F. J.; ZEIGLER, R. S.; XU, S.; HAMMER, J. E. Genetic diversity of the rice blast fungus in disease nursery in Colombia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1427-1433, 1993.

LIU, W.; LIU, J.; NING, Y.; DING, B.; WANG, X.; WANG, Z.; WANG, G. -L. Recent Progress in Understanding PAMP- and Effector-Triggered Immunity against the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant**, v. 6, n. 3, p. 605-620, 2013.

MACIEL, J. L. N.; CERESINI, P. C.; CASTROAGUDIN, V. L.; ZALA, M.; KEMA, G. H. J.; MCDONALD, B. A. Population Structure and Pathotype Diversity of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 Years After Its Emergence in Brazil. **Phytopathology**, Oxford, v. 104, n. 1, p. 95-107, 2014.

MANNING, V. A.; HAMILTON, S. M.; KARPLUS, P. A.; CIUFFETTI, L. M. The Arg-Gly-Asp-containing, solvent-exposed loop of Ptr ToxA is required for internalization. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 315-325, 2008.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.

MEKWATANAKARN, P.; KOSITRATANA, W.; PHROMRAKSA, T.; ZEIGLER, R. S. Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 939-943, 1999.

MONEY, N. P.; HOWARD, R. J. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 20, p. 217-227, 1996.

NCBI - National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy. Acesso em: jul. 2014.

NOTTÉGUEM, J. -L.; SILUÉ, D. Distribution of mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 82, p. 421-424. 1992.

OU, S. H. A look at worldwide rice blast disease control. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 439-445, 1980.

PARK, S. Y.; CHI, M. H.; MILGROOM, M. G.; KIM, H.; HAN, S. S.; KANG, S.; LEE, Y. H. Genetic stability of *Magnaporthe oryzae* during successive passages through rice plants and on artificial medium. **Plant Pathology**, Suwon, v. 26, p. 313-320, 2010.

PRABHU, A. S.; BEDENDO, I. P.; FILLIP, M. C. C. **Principais doenças do arroz no Brasil**. 3 ed. Goiânia: CNPAF/EMBRAPA. (Documentos 2). p. 43, 1995.

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.; SILVA, G. B.; SILVA LOBO, V. L.; MORAIS, O. P. An unprecedent outbreak of rice blast on a newly released cultivar BRS Colosso in Brazil. In: WANG, G. -L.; VALENT, B. **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. New York: Springer, 2009, p. 257-266.

PUNKARI, L.; HENRICI, A. A study of variation in a chromogenic asporogenous yeast. **Journal Bacteriology**, v. 26, n. 1, p. 125-138, 1933.

RAFIQI, M.; GAN, P. H. P.; RAVENSDALE, M.; LAWRENCE, G. J.; ELLIS, J. G.; JONES, D. A.; HARDHAM, A. R.; DODDS, P. N. Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 2017-2032, 2010.

RIBOT, C.; CÉSARI, S.; ABIDI, I.; CHALVON, V.; BOURNAUD, C.; VALLET, J.; LEBRUN, M. -H.; MOREL, J. -B.; KROJ, T. The *Magnaporthe oryzae* effector *AVR1-CO39* is translocated into rice cells independently of a fungal-derived machinery. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 74, n. 1, p. 1-12, 2013.

RONALD, P. C.; BEUTLER, B. Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. **Science**, Washington, v. 330, p. 1061-1064, 2010.

ROSCHEVICZ, R. J. A contribution to the knowledge of rice. **Bullentin of Applied Botany of Genetics and Plant Breeding**, Leningrad, v. 27, p. 119-133, 1931.

ROSSMAN, A. Y.; HOWARD, R. J.; VALENT, B. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. **Mycologia**, Bronx, v. 82, n. 4, p. 509-512, 1990.

SACCARDO, P. A. Fungorum extra-europaeorum. **Michelia**, v. 2, p. 136-149, 1880.

SAJI, S.; UMEHARA, Y.; ANTONIO, B. A.; YAMANE, H.; TANOUE, H.; BABA,T.; AOKI, H.; ISHIGE, N.; WU, J.; KOIKE, K.; MATSUMOTO, T.; SASAKI, T. A physical map with yeast artificial chromosome (YAC) clones covering 63% of the 12 rice chromosomes. **Genome**, Montreal, v. 44, n. 1, p. 32-37, 2001.

SALEH, D.; MILAZZO, J.; ADREIT, H.; THARREAU, D.; FOURNIER, E. Asexual reproduction induces a rapid and permanent loss of sexual reproduction capacity in the rice fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*: results of *in vitro* experimental evolution assays. **BioMed Central Evolutionary Biology**, London, v. 12, p. 42-57, 2012a.

SALEH, D.; XU, P.; SHEN, Y.; LI, C.; ADREIT, H.; MILAZZO, J. L.; RAVIGNÉ, V.; BAZIN, E.; NOTTÉGUEM, J. -L.; FOURNIER, E.; THARREAU, D. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. **Molecular Ecology**, Malden, v. 21, p. 1330-1344, 2012b.

SAWADA, K. Blast of rice plant and its relation to the infective crops and weeds, with the description of five species of Dactylaria. **Special Bulletin of the Taiwan Agricultural Experiment Station**, v. 16, p. 1-78, 1917.

SCHEUERMANN, K. K.; RAIMONDI, J. V.; MARSCHALEK, R.; ANDRADE, A.; WICKERT, E. *Magnaporthe oryzae* Genetic Diversity and Its Outcomes on the Search for Durable Resistance. In: CALISKAN, M. **The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity**, 2012. cap. 15, p. 331-356.

SILUÉ, D., NOTTÉGUEM, J. -L.; THORREAU, D. Evidence for a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 577-580, 1992.

SILUÉ, D.; NOTTÉGHEM, J. -L. Production of perithecia of *Magnaporthe grisea* on rice plants. **Mycological Research**, New York, v. 94, n. 8, p. 1151-1152, 1990.

SILVA, G. B. **Estrutura populacional de *Pyricularia grisea* (Cooke) Saac. em folha e panículas de arroz de terras altas.** 2004. 67 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SMITH, J. R.; LEONG, S. A. Mapping of a *Magnaporthe grisea* locus affecting rice (*Oryza sativa*) cultivar specificity. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 88, p. 901-908, 1994.

SOBRIZAL, S.; ANGGIANI, S. Rice blast disease in Indonesia. In: JIRCAS (Japan International Research Center for Agricultural Sciences). **Working report,** Tsubuka, 2007. n. 53, p. 71-79.

SUZUKI, H. Origin of variation in *Pyricularia oryzae*. In: IRRI – International Rice Research institute. **The rice blast disease.** Baltimore: Johns Hopkins, 1965. p. 111-149.

TAKAN, J. P.; CHIPILI, J.; MUTHUMEENAKSHI, S.; TALBOT, N. J.; MANYASA, E. O.; BANDYOPADHYAY, R.; SERE, Y.; NUTSUGAH, S. K.; TALHINHAS, P.; HOSSAIN, M.; BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S. *Magnaporthe oryzae* Populations Adapted to Finger Millet and Rice Exhibit Distinctive Patterns of Genetic Diversity, Sexuality and Host Interaction. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 50, p. 145-158, 2012.

TALBOT, N. J. On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 177-202, 2003.

TALBOT, N. J. Plant-Pathogen Interactions. **Annual Plant Reviews**, 2009. v. 11, 264 p.

TENG P. S. The epidemiological basis for blast management. In.: ZEIGLER R. S.; LEON S. A.; TENG, P. S. Rice blast disease. CAB International, 1994. p. 409-433.

THARREAU, D.; FUDAL, I.; ANDRIANTSIMIALONA, D.; SANTOSO; UTAMI, D.; FOURNIER, E.; LEBRUN, M. -H.; NOTTÉGHEM, J. -L. World population Structure and Migration of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. In: WANG, G. -L.; VALENT, B. **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. New York: Springer, 2009, p. 209-215.

THOMAS, K. M. Detailed administration report of the government mycologist, Madras for the year 1938-59. Detailed administration Report of the Government Mycologist, Madras, 1939.

TOSA, Y.; OSUE, J.; ETO, Y.; OH, H. -S.; NAKAYASHIKI, H.; MAYAMA, S.; LEONG, S. A. Evolution of an avirulence gene, *AVR1-CO39*, concomitant with the evolution and differentiation of *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 11, p. 1148-1160, 2005.

TUCKER, S. L.; TALBOT, N. J. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 385-417, 2001.

URASHIMA, A. S.; IGARASHI, S.; KATO, H. Host range, mating type and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 1211-1216, 1993.

URASHIMA, A. S.; LEITE, S. F.; GALBIERI, R. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.275-279, 2007**.**

VALENT, B.; CRAWFORD, M. S.; WEAVER, C. G.; CHUMLEY, F. G. Genetic studies of pathogenicity and fertility of *Magnaporthe grisea*. **Iowa State Journal of Research**, Ames, v. 60, p. 569-594, 1986.

VALENT, B.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. **Genetics**, Baltimore, v. 127, p. 87-101, 1991.

VALENT, B.; KHANG, C. H. Recent advances in rice blast effector research. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p. 434-441, 2010.

VAUGHAN, D. A.; LU, B. -R; TOMOOKA, N. The evolving story of rice evolution. Review. **Plant Science**, Shannon, v. 174 p. 394-408, 2008.

WWF BRASIL. Manejo integrado de pragas. 2009. Disponível em: http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/reducao_de_impactos2/agricultura/agr_acoes_resultados/controlando_pragas_de_maneira_ambientalmente_correta/. Acesso em: jul. 2012.

XU, J. Estimating the Spontaneous Mutation Rate of Loss of Sex in the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, Baltimore, v. 162, p. 1157-1167, 2002.
YAEGASHI, H.; NISHIHARA, N. Production of the perfect stage in Pyricularia from cereals and grasses. **Annals of the Phytopathological Society**, Tokyo, v. 42, p. 511-515, 1976.

YAEGASHI, H.; YAMADA, M. Pathogenic race and mating type of *Pyricularia grisea* from Soviet Union, China, Nepal, Thailand, Indonesia and Colombia. **Annals of the Phytopathological Society**, Tokyo, v. 52, p. 225-234, 1986.

YODER, O. C.; WELTRING, K.; TURGEON, B. G.; GARBER, R. C.; VAN ETTEN, H. D. Technology for molecular cloning of fungal virulence genes. In: BAILEY, J. A. **Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions**. Long Ashton, Bristol, United Kingdom, 1986. v. 1, p. 371-384.

ZEIGLER, R. S. Recombination in *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p.249-275, 1998.

ZEIGLER, R. S.; SCOTT, R. P.; LEUNG, H.; BORDEOS, A. A.; KUMAR, J.; NELSON, R. J. Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 284-294, 1997.

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 *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 443-451, 1995.

ZEIGLER, R. S.; TOHME, J.; NELSON, R. J.; LEVY, M.; CORREA-VICTÓRIA, F. J. Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. In: **Rice blast disease**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 267–292.

ZHENG, Y.; ZHENG, W.; LIN, F.; ZHANG, Y.; YI, Y.; WANG, B.; LU, G.; WANG, Z.; WU, W. *AVR1-CO39* Is a Predominant Locus Governing the Broad Avirulence of *Magnaporthe oryzae* 2539 on Cultivated Rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, n. 1, p. 13–17, 2011.

ZHU, Q.; GE, S. Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus Oryza revealed by intron sequences of four nuclear genes. **New Phytologist**, Oxford, v. 167, p. 249-265, 2005.

ZHU, Y.; CHEN, H.; FAN, J.; WANG, Y.; LI, Y.; CHEN, J.; FAN, J.; YANG, S.; HU, 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, 2000.