

# 138. APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA BUSCA DE RESISTÊNCIA ESTÁVEL A BRUSONE EM ARROZ IRRIGADO

Marta Cristina Corsi de Filippi<sup>1</sup>, V. L. Silva-Lobo<sup>1</sup>; A. S. Prabhu<sup>1</sup>

## INTRODUÇÃO

O arroz, *Oryza sativa*, alimenta hoje cerca de três bilhões de pessoas, ou metade da população global e fornece 20% de calorias e 13% de proteínas consumidas no mundo (FAO, 2004). A população consumidora de arroz continua crescendo tendo em vista principalmente o aumento da população nos países asiáticos e africanos. De acordo com as estimativas de Khush e Jena (2008), a produção desse cereal deve aumentar em 30% até 2030. Para enfrentarmos esse desafio necessitamos de um potencial produtivo maior e mais estável. Apesar do potencial de produção ser de 10 toneladas/ha, a produção média mundial tem sido 5 toneladas/ha. Essa lacuna entre o potencial produtivo e a produção real deve-se aos estresses bióticos e abióticos que atingem as lavouras de arroz. Entre os estresses bióticos que ameaçam a produção de arroz destaca-se a brusone (KHUSH, JENA, 2008), doença causada pelo ascomiceto *Magnaporthe oryzae*.

## A BRUSONE NO MUNDO

A brusone ocorre em todas as áreas produtoras de arroz e os danos causados por ela chegam em até 100%, dependendo da cultivar utilizada, da época de plantio e das condições climáticas (PRABHU et al., 2002). Na China, durante os últimos 30 anos ocorreram três epidemias causadas pela brusone provocando perdas na casa de milhões de toneladas de arroz. Entre 1982-85 a média da área afetada com brusone foi de 3,8 milhões de ha. Entre 1992-94 a perda foi de aproximadamente 1,1 milhões de toneladas (SUN et al., 1999) e entre 2001-05 foi registrado que 5,7 milhões de ha de campos de arroz foram afetados com brusone. No Japão, as condições climáticas durante a safra de produção do arroz são consideradas altamente propícias para o desenvolvimento e dispersão da doença. Mesmo com a utilização de cultivares geneticamente melhoradas à quebra de resistência à brusone acontecem com frequência, e devido a perdas causadas por essa epidemia já foi necessário a importação de quantias consideráveis de arroz pelo governo japonês. Na Indonésia, planta-se em média 1,1 milhões de hectares de arroz aeróbico, e as cultivares melhoradas geneticamente tem mostrado a quebra de resistência em dois ou três anos de plantio, e as perdas já chegaram em até 100% (SOBRIZAL, ANGGIANI, 2007). Os campos de arroz da Coreia do Sul e da Índia também estão sujeitos a perdas consideráveis causadas pela ocorrência de brusone.

No Brasil, as primeiras constatações de ocorrência de brusone foram em 1912, no estado de São Paulo, e em 1918 no estado do Rio Grande do Sul. Entre as décadas de 40 e 50 foram divulgados na Revista Arrozadeira com a descrição dos sintomas e medidas empíricas para controle, e logo em seguida, foram registradas a ocorrência na Bahia, Pará, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (PRABHU E FILIPPI, 2006). Atualmente, distribuição das doenças de arroz nas regiões produtoras do Brasil varia conforme as condições climáticas. A região tropical, que responde por 60,90 % da área plantada com arroz, apresenta temperatura ideal para o rápido desenvolvimento da brusone. Na região subtropical, que corresponde a 31,8% da área plantada, essa doença é menos agressiva, devido às temperaturas amenas que impedem o rápido desenvolvimento desta epidemia. Contudo, de acordo com prognósticos do Painel Intergovernamental para Mudanças Climáticas, a região sul do Brasil deverá ter um aquecimento de no mínimo 1° C, suficiente para mudar o cenário, tornando a ocorrência de brusone uma ameaça à produção de arroz naquela região. Apesar de termos conhecimento da ocorrência da doença ao longo dos anos, não temos registros, a nível nacional, quanto ao tamanho da área comercial afetada com brusone ao longo dos anos, ou por região, ou por perdas em produção. Recentemente, foi registrada a quebra de resistência em uma cultivar recém lançada, já no primeiro ano de plantio, afetando uma área maior que 5 mil ha (PRABHU et al., 2008), caracterizando uma epidemia.

<sup>1</sup> Pesquisador, Fitopatologista, Embrapa Arroz e Feijão Rodovia GO-462, km 12 Zona Rural C.P. 179 . CEP 5375-000 Santo Antônio de Goiás, GO. Cristina@cnpaf.embrapa.br

A disponibilidade de cultivares resistentes à brusone é uma demanda eminente para o manejo integrado dessa doença. Porém, a variabilidade genética das populações do patógeno torna frágil e instável a resistência das cultivares geneticamente melhoradas.

## SINTOMAS E CICLO DA DOENÇA

O ciclo da doença inicia-se com a disseminação do inóculo primário, pelo vento, água ou semente infectada. Os conídios aderem-se à superfície da folha de arroz, germinam, formam o apressório, estrutura especializada que perfura a superfície foliar, permitindo a colonização do tecido foliar. A colonização de um hospedeiro suscetível leva a uma desorganização do metabolismo celular que resulta no sintoma típico da doença. As lesões desenvolvidas produzem novos conídios, dando início a um novo ciclo da doença.

A brusone pode ocorrer na planta do arroz desde o estágio de plântula até a fase de maturação da cultura. Os sintomas nas folhas iniciam-se com a formação de pequenas lesões necróticas, de coloração marrom, que evoluem, aumentando de tamanho, tornando-se elípticas, com margem marrom e centro cinza ou esbranquiçado. Em condições favoráveis, as lesões coalescem, causando morte das folhas e, muitas vezes, da planta inteira. Os sintomas nos nós e entrenós aparecem, geralmente, na fase de planta madura. A infecção no primeiro nó, abaixo da panícula, é referida como brusone do pescoço. Os sintomas observados nos entrenós são comuns somente nas cultivares suscetíveis de arroz de terras altas. A infecção na região dos nós é freqüentemente encontrada somente em cultivares suscetíveis de arroz irrigado.

No binômio *M. oryzae*- *O. sativa* a interação entre o patótipo (raça) e a cultivar de arroz é explicada pela teoria gene a gene (FLOR, 1971; SILUE et al., 1992). De acordo com esta teoria, a resistência é o resultado de uma interação incompatível entre o gene de avirulência do patógeno e o gene de resistência do hospedeiro. O gene de resistência na planta, ao ser elicitado desencadeia uma série de reações celulares responsáveis pela defesa, as quais se expressam em tempo necessário para produzir um fenótipo resistente (RIBEIRO DO VALE et al., 2001). Esse processo resulta na ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal, com a expressão subsequente de genes de defesa (GUZZO, 2004). Vários mecanismos de defesa da planta estão envolvidos na expressão da resistência, compreendidos pela resposta de hipersensibilidade (HR). Essa reação caracteriza-se pela morte celular localizada no sítio de penetração do patógeno, produção de oxigênio reativo, fortificação da parede celular, acúmulo de calose e lignina, aumento da atividade de enzimas como chalcona, isomerase e peroxidases, acúmulo de compostos antimicrobianos e fitoalexinas, indução de proteínas relacionadas a patogênese (PR) e a síntese de metabólitos secundários (SCHENCK et al., 2000; MÉTRAUX, 2007)

## CONSTITUIÇÃO DAS POPULAÇÕES DE *M. oryzae*

A população do patógeno é composta por indivíduos que apresentam um padrão de virulência, denominado de raças fisiológicas ou patótipos. Os patótipos são identificados, por convenção, através da inoculação de um isolado, oriundo da população em estudo, em uma série de oito cultivares diferenciadoras (AKTINS, 1965). A estrutura da população do patógeno refere-se à quantidade de variação genética e fenotípica entre e dentro de subpopulações, e é dividida no tempo e no espaço, podendo ser influenciada pela cultivar de origem, pelo local, tamanho da área plantada e isolamento de campo por cultivar (SILVA et al., 2007). As mudanças em freqüência de virulência, que resultam em quebra de resistência das cultivares, são comuns e largamente reconhecidas. Portanto, conhecer a freqüência de patótipos (raças fisiológicas) de uma população de *M. oryzae* é fundamental na identificação de genes de resistência à brusone. Para que a resistência de uma cultivar seja durável, esse genótipo deve conter genes efetivos contra os patótipos mais freqüentes que compõem a população e também aos patótipos até então presentes em uma freqüência muito baixa, conseqüentemente, torna-se necessário o conhecimento da composição genotípica e fenotípica da população do patógeno.

Compreender a variabilidade dos genes de avirulência dentro de uma população permite prever o aumento da frequência de um determinado patótipo. A caracterização molecular da estrutura da população de *M. oryzae* em lavouras de arroz, juntamente com a análise de virulência fenotípica, permite

detectar mudanças na frequência dos genes de avirulência, ou marcadores ligados a eles, elegendo assim os possíveis genes de resistência que devem ser incorporados às novas cultivares (KANG, LEE, 2000).

A estrutura genética da população de *M. oryzae* tem sido estudada utilizando-se marcadores moleculares, os quais incluem RFLP, RAPD, Rep-PCR e microssatélites. Essas análises demonstraram que isolados que possuem um padrão semelhante de regiões genômicas amplificadas compõem agrupamentos genéticos, os quais podem ser determinados por índices de similaridade (CHADHA, GOPALAKRISHNA 2005, 2007). Ao se aplicar as técnicas descritas acima, espera-se obter, como característica unificadora de cada linhagem, um padrão de virulência específico, e assim monitorar a frequência dos genes de avirulência.

Apesar de Levy et al.(1993) terem estabelecido uma relação simples entre linhagens (identificadas pelo marcador MGR 586) e patótipos, estudos posteriores mostraram que há diversidade de virulência entre e dentro de linhagens (ZEIGLER et al., 1995). A análise de isolados de *M. oryzae*, coletados na cultivar Metica-1, utilizando rep-PCR com dois primers (*Pot-2*), revelou a ocorrência de seis grupos ou linhagens, as quais não mostraram uma relação entre a virulência dos isolados e o agrupamento genético (FILIPPI et al., 2002). Esses resultados indicam que a variabilidade destas populações, no que diz respeito a patogenicidade, não é devidamente monitorada ao se adotar os marcadores até então disponíveis. Mesmo assim, uma análise da estrutura gênica, de uma população de *M. oryzae*, utilizando-se o marcador MGR 586, mostrou que os isolados de CICA 8 e Metica-1 pertencem a duas linhagens distintas, BZ-A e BZ-19, respectivamente, indicando alta especialização dos isolados às cultivares suscetíveis no campo (FILIPPI et al., 1999), e que em situações como essa, a sonda MGR 586 permitiu agrupamentos altamente relacionados com a patogenicidade.

O genoma de *M. oryzae* é relativamente pequeno, variando de 40 a 50 Megabases, distribuídos em sete cromossomos e encontra-se totalmente seqüenciado (DEAN et al., 2005). Assim foram disponibilizadas novas fontes de marcadores microssatélites para serem usadas na construção de mapas genéticos. Adreit et al.(2007), utilizaram 18 microssatélites para estudos de população de *M. grisea*, os quais revelaram de 2 a 19 alelos por locus, mostrando grande polimorfismo entre as populações, variando tanto no número quanto na frequência dos alelos detectados. Brondani et al. (2000) e Garrido (2001) desenvolveram marcadores moleculares baseados na amplificação de regiões microssatélites de *M. oryzae* do arroz. De acordo com os autores, o polimorfismo gerado pelos marcadores microssatélites foi mais elucidativo do que os que foram baseados nas seqüências MGR 586 e *Pot-2*. Nesse sentido, outros autores também têm relacionado os marcadores microssatélites como uma alternativa bastante eficiente para caracterizar a variabilidade de *M. oryzae* (KAYE et al., 2003; LIM et al., 2004; CHADA et al., 2005). Considera-se, ainda, que a importância dos marcadores microssatélites se deve à sua natureza multialélica, transmissão codominante, fácil detecção por PCR, relativa abundância, extensiva cobertura do genoma e necessidade mínima de DNA para realização da análise genética (GARRIDO, 2001; ZANE et al., 2002), além de já ter sido demonstrado que, quando comparado com outras oito espécies de fungos taxonomicamente diferentes, o genoma de *M. oryzae* foi um dos mais abundantes em seqüências microssatélites (KARAOGLU et al., 2005).

## RESISTÊNCIA GENÉTICA À BRUSONE

Os estudos para a herança da resistência iniciaram-se em 1922 por Sasaki, seguido de Takahashi (1965) e Yamasaki e Kyiosawa (1966). Até 1966, os estudos foram conduzidos sem muita informação quanto a especialização do patógeno. Goto (1965) iniciou estudos mais sistemáticos ao estabelecer um sistema de diferenciação de raças fisiológicas dos patógeno no Japão e Aktins et al. (1965) selecionaram oito cultivares diferenciadoras internacionais estabelecendo um sistema de diferenciação de raças adotado internacionalmente. Nos estudos iniciais para identificação de genes de resistência destaca-se Kyiosawa e colegas que utilizando 7 cv. japonesas identificaram 13 genes de resistência (*Pia*, *Pii*, *Pik<sup>s</sup>*, *Pik*, *Piz*, *Pita*, *Pita<sup>2</sup>*, *Piz<sup>1</sup>*, *Pik<sup>p</sup>*, *Pik<sup>n</sup>*, *Pik<sup>m</sup>*, *Pib* e *Pit*). Nos últimos 25 anos muitos foram os avanços obtidos, os quais refletem a interação entre os estudos da herança dos genes de resistência, biologia do patógeno e utilização de ferramentas moleculares. Mackill e Bonman (1992) desenvolveram as linhas quase isogênicas da cultivar CO-39, C 101 LAC e C 101- A51, portadoras dos genes de resistência *Pi-1* e *Pi-2*, respectivamente. Estas isolinhas vêm sendo largamente utilizadas para introgressão de genes

maiores e elucidação dos mecanismos moleculares na interação patógeno-hospedeiro. Yu et al (1991 e 1996) utilizando marcadores RFLP no genoma do arroz localizaram os genes de resistência Pi1 no cromossomo 1, Pi2 no cromossomo 6, Pi4 e Pita no cromossomo 12. Na Tabela 1 encontram-se relacionados os genes de resistência à brusone identificados.

Avanço nas técnicas moleculares somados ao término da seqüência do genoma do arroz permitiu pavimentar a metodologia para clonar e caracterizar sete genes maiores de resistência à brusone, que são : Pib (WANG et al., 1999), Pita (BRYAN et al., 2000), Pi9 (QU et al., 2006), Pi2 e Piz<sup>1</sup> (ZHOU et al., 2006), Pid2 (CHEN et al., 2006) e Pi36 (LIU et al., 2007). Com exceção de Pid2 todos os genes clonados pertencem à classe NBS-LRR. Essa classe de proteína codifica sítios de ligação nuclear (NBS) e cópias ricas em leucinas (LRR), indicando que o produto desses genes interaje com outras proteínas para a manifestação de defesa. Quatro deles codificam proteínas que ainda não foram identificadas em outras espécies senão o arroz, sugerindo que a planta de arroz possui um sistema único de defesa. Entre os genes citados acima destaca-se *Pib*, gene que confere resistência à maioria das patótipos de *M. oryzae* no Japão, e sua expressão é influenciada pelo ambiente, como temperatura, luz, água e tratamentos com moléculas químicas, como o ácido jasmônico, ácido salicílico, etileno e probendazole (WANG et al. 1999).

Tabela 1. Genes de resistência a brusone identificados em cultivares de arroz.

Genes de resistência identificados	
Genes	Referência
Pi1, Pi2, Pi3, Pi4, Pi5, Pi6, Pi7, Pi9, Pi10, Pi11	Causse et al. 1994, Wang et al., 1994
Pia, Pib, Pik, Pit, Pita, Pita <sup>2</sup> , Pi12, Pi17, Pi18, Pi19, Pi20, Pi23, Pi57, Pi62	Nagato e Yoshimura, 1998
Pii, Pi15	Pan et AL., 2003
Pi24, Pi25, Pi26, Pi27, Pi28, Pi29, Pi30, Pi31, Pi32	Sallaud et al.2003 e Yang et al., 2001
Pi36, Pi39	Liu et al.2007
Pi37	Chen et al. 2005
Pi38	Gowda et al. 2006
Pi40	Jeung et al. 2007

Uma vez identificados, os genes de resistência à brusone são facilmente introduzidos em plantas de arroz de diferentes backgrounds, utilizando-se métodos tradicionais de melhoramento. Contudo, a durabilidade insuficiente dos genes de resistência tem sido relatada ao longo dos anos (KYIOSAWA 1982; KOIZUMI 2007) como um problema persistente, principalmente em condições tropicais. As estratégias que tem sido sugeridas para prolongar a durabilidade da resistência são:

- 1) Multilinhas: sugerido por Borlaug (1959), quando buscava resistência em plantas de trigo a ferrugem. A durabilidade da resistência das multilinhas vai depender da velocidade com que ocorre a mudança da freqüência de raças, do número de genes de resistência componentes e da extensão da área plantada com a mistura (KHUSH, JENA , 2007)
- 2) Mistura de cultivares: uma estratégia que pode diminuir a velocidade de desenvolvimento da doença, porém pode afetar a uniformidade final do produto, principalmente sob condições tropicais;
- 3) Resistência qualitativa. A estratégia de acumular em um mesmo genótipo vários genes de resistência, com espectros de ação complementares, é chamada de piramidização de genes. Na prática, este processo é difícil, porque plantas portadoras de um gene podem mostrar reação resistente, impedindo a detecção da presença de outros genes. Marcadores moleculares consistentemente ligados aos genes a serem piramidizados facilitam o processo de seleção de plantas portadoras de múltiplos genes de resistência. Algumas experiências neste sentido já foram reportadas na literatura, e alguns marcadores

úteis para seleção assistida estão disponíveis publicamente (FJELLSTROM, 2004). Recentemente, seleção assistida por marcadores moleculares tem sido aplicada a cultivares adaptadas com sucesso. No Brasil, um exemplo da aplicação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência à brusone foi a seleção de fontes de resistência em bancos de germoplasma do IRGA (DISCONZI et al., 2001). Neste estudo, foram utilizados três marcadores microssatélites, RM254, RM21 e RM164, ligados aos genes de resistência à brusone *Pi1*, *Pi7* e *Pi10*, respectivamente.

- 4) Resistência quantitativa ou poligênica. Resistência governada por genes menores que somados constituem o efeito de resistência. Assim não exerce pressão de seleção sobre a população do patógeno, como ocorre com a resistência qualitativa. Porém existem algumas dificuldades para a incorporação de características pilogênicas, que nem sempre o conjunto gênico de interesse não é todo incorporado. Mas esta dificuldade pode ser superada utilizando-se seleção assistida por marcadores moleculares.

### SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADOR MOLECULAR

Os marcadores moleculares estão sendo largamente usados para identificar e mapear a posição de genes com efeitos maiores (LANAUD & LEBOT, 1997). A identificação de marcadores moleculares ligados a características de interesse é o primeiro passo no programa de melhoramento assistido por marcador e para clonagem de genes de resistência às doenças (YOSHIMA et al., 1995). Genes que conferem resistência qualitativa a doenças, do tipo binário (resistente/suscetível), podem ser mapeados utilizando uma técnica simples, chamada análise de bulk segregante (*bulk segregant analysis*). Neste método, as plantas segregantes são agrupadas em bulks resistentes ou suscetíveis. Marcadores cujas bandas forem contrastantes entre os dois grupos tendem a ser fortemente ligados ao gene de resistência. O arroz dispõe de amplo arsenal genômico para pesquisas moleculares, incluindo o seqüenciamento completo de representantes do grupo *indica* e *japonica*. Milhares de marcadores microssatélites já foram desenvolvidos para arroz, e os genes estão sendo rapidamente anotados, facilitando a identificação de genes candidatos para características específicas, inclusive resistência às doenças. A maioria das informações genômicas de arroz estão disponíveis em bases de dados abertos ([www.gramene.org](http://www.gramene.org)).

### IDENTIFICAÇÃO, INCORPORAÇÃO e EXPRESSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À BRUSONE EM ARROZ

A busca de resistência genética durável tornou-se um grande desafio para a sociedade científica mundial e a adoção de estratégias inovadoras de controle da brusone tornou-se uma meta. O lançamento seqüencial de cultivares com diferentes genes de resistência é uma estratégia fundamental para o manejo da brusone (PRABHU et al., 1999). Entretanto, não há uma rede de informações totalmente conectada quanto à dinâmica de patótipos, dentro de populações, em cada região produtora de arroz. Na tentativa de pavimentar esta rede e direcionarmos as informações para a obtenção de resistência estável a brusone planejamos:

**1-Constituir populações de *M. oryzae* oriundas de diferentes regiões produtoras de arroz do Brasil.** Uma amostragem de 500 isolados monospóricos anuais coletados de regiões produtoras de arroz, em todo o Brasil está em andamento para: a) identificar e determinar a freqüências dos principais patótipos que ocorrem em cada região amostrada; b) caracterizar a virulência destes isolados utilizando cultivares diferenciadoras nacionais e internacionais; c) constituir uma micoteca representativa e viável para fins de experimentação. A amostragem será composta de plantas de arroz com sintomas típicos de brusone, coletadas em áreas de produção de arroz geograficamente distintas, tanto em sistema de plantio de terras altas quanto em irrigado. A realização desta amostragem conta com a colaboração das instituições de pesquisa e ensino estaduais e federais, permitindo que cada atividade seja realizada simultânea e sistematicamente;

**2-Análise genotípica com marcadores microssatélites independentes.** Os isolados de *M. oryzae* serão caracterizados genotipicamente com 21 marcadores microssatélites independentes (não ligados), sendo três em cada cromossomo, de acordo com informações disponíveis em bases genômicas abertas ([www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/)). (ANDREIT et al., 2007; BRONDANI et al., 1998). O programa de ciclagem térmica será preparado conforme (GARRIDO, 2001). Em seguida as reações serão submetidas a eletroforese em gel de acrilamida desnaturante 4%, acompanhadas de padrões de tamanho com intervalos de 25 pares de bases; As informações quanto aos agrupamentos genéticos e fenotípicos serão comparados com o objetivo de compreender e prever a mudança da frequência dos genes de avirulência nas populações em estudo.

**3-Identificação de fontes de resistência à brusone em germoplasma brasileiro e exótico.** A Coleção Nuclear de Arroz (CNA) será submetida a uma série de inoculações com os patótipos mais frequentes determinados anteriormente. Assim serão identificadas, selecionadas e caracterizadas as possíveis fontes de resistência úteis, como doadoras de genes, para o programa de melhoramento de arroz. Espera-se identificar pelo menos dez fontes de resistência do grupo *indica* e dez do grupo *japonica*. Paralelamente serão identificados os isolados que detectam a presença de cada gene de resistência a ser estudado.

**4-Avaliação de fontes de resistência à brusone em condições de campo.** As fontes selecionadas serão avaliadas a campo com infestação natural, em todas as regiões onde foram executadas as coletas. Serão proporcionadas condições favoráveis à doença, com alta adubação nitrogenada e plantio adensado. A avaliação dos sintomas será feita de acordo com a severidade da doença. Além da brusone, serão avaliadas as características agrônomicas das fontes selecionadas, com vistas ao seu cruzamento com materiais elites.

**5-Identificação de marcadores associados aos genes e locos de resistência à brusone.** Uma busca será feita no sentido de identificar os genes de resistência à brusone já clonados ou finamente mapeados, para que sejam testados nos patossistemas brasileiros. No caso dos genes clonados, marcadores específicos serão desenhados para detecção de polimorfismo. No caso de locos mapeados, microssatélites proximamente ligados serão selecionados para investigação do loco candidato. As fontes de resistência selecionadas serão cruzadas com cultivares testadoras, altamente suscetíveis à brusone, utilizando um método baseado na análise de bulks segregantes (MICHELMORE, 1991). Serão utilizadas como testadoras para fontes do grupo *japonica*, e para fontes do grupo *indica*. Para cada cruzamento, 200 sementes F<sub>2</sub> serão obtidas. Estas sementes serão plantadas em vasos identificados, e serão inoculados sob condição controlada, aos 30 dias após a emergência, com patótipos compatíveis com o testador, e incompatíveis com a fonte de resistência. As amostras de DNA correspondentes aos bulks resistentes e suscetíveis serão analisadas com os marcadores selecionados anteriormente. Oito marcadores com temperatura de anelamento compatíveis serão testados por placa de PCR de 96 reações. A separação dos fragmentos amplificados será feita por eletroforese. No caso de genes de resistência dominantes, espera-se que os bulks R sejam heterozigotos para o marcador associado, e que os bulks S sejam homozigotos para a banda do genitor suscetível.

**6-Incorporação de genes de resistência à brusone em cultivares e populações de arroz.** As cultivares de arroz irrigado e terras altas adaptadas serão utilizadas como genitores recorrentes, recebendo genes de resistência de duas fontes de resistência (doador R<sub>A</sub> e doador R<sub>B</sub>) conforme incorporação por retrocruzamento. A seleção de plantas resistentes será realizada com o auxílio dos marcadores moleculares selecionados anteriormente. A metodologia descrita acima será adaptada para a inserção de genes de resistência à brusone também populações recorrentes sintéticas.

**7- Resistência induzida.** Uma nova abordagem ao uso da resistência às doenças tem sido viabilizada com a definição de rotas metabólicas e de mecanismos bioquímicos de sinalização entre plantas e patógenos. Esta estratégia inovadora é denominada de “resistência induzida às doenças”, por envolver a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas, em resposta ao tratamento com agentes bióticos e abióticos (KUHN et al., 2006). A perspectiva promissora do controle de doenças

utilizando-se os mecanismos de defesa inerentes às plantas tem estimulado linhas de pesquisas que visam o esclarecimento dos aspectos bioquímicos, citológicos e moleculares envolvidos na indução de resistência. Esses mecanismos estão envolvidos na fase de pré-infecção da doença e são ativados por produtos bióticos ou abióticos, não tóxicos ao meio ambiente.

A variabilidade acentuada das populações de *M. oryzae* permite o aumento da frequência de um determinado patótipo, o qual antes era inexpressivo. A indução da resistência compõe-se em uma estratégia promissora para o controle da brusone uma vez que oferece alternativas de controle as quais serão independentes da frequência de um determinado patótipo, dentro de uma população de *M. oryzae*. Assim, compreender a patogênese de *M. oryzae* e a expressão da resistência torna-se essencial por gerar conhecimentos, em nível celular, da interação arroz-*M. oryzae*, e obter indicativos precisos para interromper o evento da colonização, do hospedeiro, arroz, pelo patógeno *M. oryzae*. Como objetivo de estudar o processo de indução de resistência em plantas de arroz ferramentas moleculares e bioquímicas tem sido utilizadas para selecionar indutores bióticos e abióticos quantificar as atividades das enzimas (acúmulo e o aumento) relacionadas à resistência e comparar as rotas metabólicas da expressão da resistência, em plantas induzidas e não induzidas.

Ao percorrer os passos descritos esperamos coletar mais informações quanto à dinâmica das populações dos patótipos de *M. oryzae*, eger genes de resistência efetivos contra as populações do patógeno estudadas; detectar a presença de genes de resistência à brusone na coleção nuclear brasileira; validar a seleção assistida em populações de seleção recorrente; e piramidizar os genes de resistência a brusone eleitos e avançar os conhecimentos quanto a patogênese de *M. oryzae* e a expressão da resistência

## LITERATURA CONSULTADA

- ANDREIT, H.; SANTOSO, ANDRIANTSIMALONA, D.; UTAMIS D.W.; NOTTEGHEM, J.L.; LEBRUN, M.H. and THARREAU, D. Microsatellite markers for population studies of rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecular Ecology Notes**.2007
- 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 rice blast resistance gene Pita. **Plant Cell**. 12 2033-2046. 2000
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; GARRIDO, L. & FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers for genetic analysis of *Pyricularia grisea*. **Fitopatologia Brasileira**. 23:230, 1998.
- C.; NELSON, R. J. Rflp Mapping of Genes Conferring Complete and Partial Resistance
- CHADHA, S. AND GOPALAKRISHNA, T . Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea* **Current Science**, 690 vol. 93, no. 5, 10 September 2007.
- CHENM X. W., SHANG, J.J., CHEN, D.X., LEI, C.L., ZOU, Y., ZHAI, W.X., LIU, G.Z., XU, J.C., LING, Z.Z., CAO, G., MA, B.T., WANG, Y.P., ZHAO, X.F., LI, S.G., ZHU, L.H. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. **Plant J**. 46, 794-804.2006
- CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S.; LEVY, M. Virulence characteristics of genetic families of *Pyricularia grisea* in Colombia. In: ZEIGLER, R. S.; LEONG, S. A.; TENG, P. S. (Ed.). **Rice blast disease**. Wallingford: CAB International, p. 211-229. 1994
- FAO. 2004. FAO . Internet Communication. Concern about rice production practices. FAO News Room <http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/7538-en.html>
- FILIPPI, M. C., PRABHU, A. S., ARAUJO, L. G. and FARIA, J. C. Genetic diversity and virulence pattern in field populations of *Pyricularia grisea* from rice cultivar Metica-1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília 37. 2002.
- FJELLSTROM, R., CONAWAY-BORMANS, C. A., MCCLUNG, A. M., MARCHETTI, M. A., SHANK, A. R. AND PARK, W. D. Development of DNA Markers Suitable for Marker Assisted Selection of Three *Pi* Genes Conferring Resistance to Multiple *Pyricularia grisea* Pathotypes. **Crop Sci**. 44:1790–1798.2004
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **A . Rev. Phytopathology**.9:275-296.1971.
- GARRIDO, L. R. **Identificação, desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipervariáveis do genoma de *Magnaporthe grisea* na análise da estrutura de populações do patógeno infectando plantações de arroz (*Oryza sativa*)**. Brasília:UNB. 2001.193p.(tese de doutorado).

- GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236p. Piracicaba.. Tese (Doutorado em Energia Nuclear em Agricultura)-Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba
- KARAOGLU, H., MAN YING LEE,C. AND MEYER W. Survey of Simple Sequence Repeats in Completed Fungal Genomes **Mol. Biol. Evol.** 22(3):639–649. 2005
- KAYE, C., MILAZZO, J., ROZENFELD, S., LEBRUN, M.-H. AND THARREAU, D., The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. **Fung. Genet. Biol.**, , 40, 207–214. 2003
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy** 55, 265-344. 1995
- LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S.; XU, S.; HAMER, J. E. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1427-1433, Dec. 1993.
- LIU, X., LIN, F., WANG, L., PAN, Q. The silico mao-based cloning of Pi36, a rice coiled-coiled-nucleotide-binding site-leucine-rich repeat gene that confers race specific resistance to blast fungus. **Genetics**. 176, 2541-2549. 2007
- LIU, X., YANG, Q., LIN, F., HUAN, L., WANG, C., WANG, L., PAN, Q. Identification and fine mapping of Pi39 (*t*), a major gene conferring the broad spectrum resistance to *Magnaporthe grisea*. **Mol Genet Genomics**. 278, 403-410. 2007
- MANANDHAR, H.K., JORGENSEN,H.J.L., MATHUR, S.B.& SMEDEGAARD-PETERSEN,V. Induced resistance against rice blast. In: **Advances in rice blast research** THARREAU,D., LEBRUN,N.H., TALBOT,N.J., & NOTTEGHEM,J.L.eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000,p.93-104.
- MATSUMOTO, T.; et al. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, n.7052, 2005, p.793-800.
- METRAUX, J-P. Induced defenses in plants. P.7-24. **Anais da 3 reunião brasileira de indução de resistência em plantas a patógenos**. Rodrigues, F.A.; Romeiro, R. da Silva. 2007 339p. UFV. Viçosa-MG
- MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.9828-9832. 1991.
- MONOSI, B., WISSER, R.J., PENNIL, L., HULBERT, S.H. Full genome analysis of resistance gene homologues in rice. **Theor Appl Genet**. 109, 1434-1447. 2004
- PRABHU, A.S. ; FILIPPI, M C .**Brusone em arroz:controle genético, progresso e perspectivas**. 1 ed. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, v. 1, p. 83-128.
- QU, S., LIU, G., ZHOU, B., BELLIZZI, M., ZENG, L., DAÍ, L., HAN, B., WANG, G.L. *The broad spectrum blast resistance gene Pi9 encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice.* **Genetics**. 172, 1901-1914. 2006.
- RALPH A. DEAN et al. *The genome sequence of the rice blast fungus Magnaporthe grisea.* **Nature**. 434, 980-986. 2005
- SCHENCK, P. M.; KAZAN, K.; WILSON, O.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n.2, p. 11655-11660, 2000.
- SILUE, D., THARREAU, D., TALBOT, N. J., CLERGEOT, P. H., NOTTEGHEM, J. L., AND LEBRUN, M. H. Identification and characterization of a pfl-in a non-pathogenic mutant of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* which is unable to differentiate appressoria. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 53[4]: 239-251. 1998
- SILVA, G. B.; PRABHU A S.; FILIPPI, M. C.; ARAÚJO, L. G.; ZAMBOLIM, L. Caracterização da virulência de *Magnaporthe grisea* em cultivares diferenciadoras japonesas e linhas quase-isogênicas das cultivares IAC-25 e de CO-39 de arroz. **Summa phytopathol**. vol.33 no.4 Botucatu Oct./Dec. 2007
- SUN, G., CAI, R., DU, X., TAO, R. SUN, S. The directional selection and stabilizing selection from the interaction between rice variety and blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Acta Phthopathologica Sin**. 29, 45-49. 1999
- TAKAHASHI, Y. Studies on the mechanism of resistance of rice plants to *Piricularia oryzae*. II. Pathological changes microscopically observed in host cells in which fungus hyphae do not grow well. **Yamagata Univ. Agr. Sci. Bull.** 2:37-51. 1956
- to Blast in a Durably Resistant Rice Cultivar. **Genetics**, v.136, n.4, 1994, p.1421-1434.
- VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus *Magnaporthea grisea*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.29, p.443-467, 1991.
- VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.H.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, n. 3; p. 245-264, 1994.
- WANG, G. L.; MACKILL, D. J.; BONMAN, J. M.; MCCOUCH, S. R.; CHAMPOUX, M.



WANG, Z. X., YANO, M., YAMANOUCHI, U., WAMOTO, M., MONNA, L., HAYASAKA, H., KATAYOSE, Y., SASAKI, T. The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease genes. **Plant Journal** 19, 55-64.

YU, J.; et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). YU, J.; et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**, v.296, n.5565, 2002, p.79-92.

ZEIGLER, R. S.; COUC, 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**, St. Paul, v. 85, n. 4, p. 443-451, Apr. 1995.

ZHOU, B., QU, S., LIU, G., DOLAN, M., SASAKI, H., LU, G., BELLIZZI, M., WANG, G.L. The eighth amino-acid difference within three leucine-rich repeat between *Pi2* and *Piz1* resistance proteins determine the specificity to *Magnaporthea grisea*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 19, 1216-1228. 2006.

