

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**ESTRUTURA POPULACIONAL E PARÂMETROS
EPIDEMIOLÓGICOS DE ISOLADOS DE**

Magnaporthe grisea (Barr)

LEANDRO NOGUEIRA RAMOS

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LEANDRO NOGUEIRA RAMOS

**ESTRUTURA POPULACIONAL E PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS DE
ISOLADOS DE *Magnaporthe grisea* (Barr)**

Dissertação apresentada ao Departameto de Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

Orientador

Prof. Adalberto Corrêa Café Filho

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL – BRASIL

2009

Dissertação de Leandro Nogueira Ramos, intitulada ESTRUTURA POPULACIONAL E PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS DE ISOLADOS DE *Magnaporthe grisea* (Barr), apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia junto ao Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, em 23 de março de 2009, sob a orientação do Prof. Dr. Adalberto Corrêa Café Filho, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Adalberto Corrêa Café Filho
Universidade de Brasília

Dr. Márcio Elias Ferreira
Embrapa CENARGEN

Dr. Paulo Hideo Nakano Rangel
Embrapa Arroz e Feijão

Suplente:

Prof. Dr. Carlos Hidemi Uesugi – Universidade de Brasília

A minha mãe, *Maria Clara* e ao meu pai *Luiz Lorenzetti*,
pelas lágrimas nos momentos de imensurável saudade

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília – UnB, pela oportunidade de realização do curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CENARGEN, a qual participou com a infra-estrutura no desenvolvimento científico da presente pesquisa.

Ao Dr. Márcio Elias Ferreira e ao Prof. Dr. Adalberto Corrêa Café Filho, pelo aprendizado, orientação, amizade e incentivo durante o desenvolvimento do curso.

Ao Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos e ao Dr. Paulo Hideo Nakano Rangel, pela amizade e atenção sempre concedida.

Aos colegas de curso de pós-graduação Cris, Sílvia, Anelise, Terumi, Jackeline, Gisele, Patrícia, Bruno, Reinaldo, Magno, Paulo, Sebastião, Léo Lopes, Léo Albuquerque e Léo Braúna, pela amizade e apoio.

Ao meu 1º amigo em Brasília Rafael Brugger da Bouza, parceiro em bons momentos de estudo e convívio.

Aos colegas de bancada do CENARGEN Bruna, Túlio, Andrea, Thaisa, Regisley, Marco Aurélio, Liamar e Justino pelos momentos descontraídos em especial pelo grande auxílio nos experimentos.

A todos os amigos que convivi no Laboratório de Genética Vegetal do CENARGEN.

Aos funcionários do CENARGEN Neide, Marcão, Sandra, Iracema, e da UnB Arenildo, César, Arlindo, pela colaboração.

Aos mestres do curso de Fitopatologia da UnB pelos ensinamentos.

Aos meus irmãos Lívia e Luizinho pelo carinho, incentivo e amor que sempre me demonstraram.

Em especial a minha namorada Keize por todos os momentos que passamos juntos, pelo amor, carinho, dedicação e a tudo que me ajuda diariamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	2
GENERAL ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 O genero <i>Oryza</i>.....	9
2.2 Importância econômica da cultura do arroz.....	10
2.3 A brusone do arroz.....	12
2.3.1 Taxonomia do patógeno	13
2.3.2 Epidemiologia.....	14
2.3.3 Ciclo da doença	18
2.3.4 Controle da doença	20
2.4 Marcadores microsatélites	22
2.5 Diversidade genética de fitopatógenos.....	23
3 FLUXOGRAMA	26
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 1: QUEBRA DE RESISTÊNCIA GENÉTICA E DETERMINAÇÃO DE COMPONENTES MONOCÍCLICOS DA BRUSONE DO ARROZ, CAUSADA POR <i>Magnaporthe grisea</i> (Barr).....	39
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 Isolados monospóricos de <i>Manaporthe grisea</i>	43
2.2 Cultivo e armazenamento dos isolados.....	44
2.3 Desenvolvimento micelial de isolados monospóricos de <i>Magnaporthe grisea in vitro</i>...	45
2.4 Determinação de componentes monocíclicos em cultivares com diferentes níveis de resistência	46
2.4.1 Semeadura das cultivares.....	46
2.4.4 Avaliações Epidemiológicas.....	48
2.5 Análises estatísticas	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

3.1 Desenvolvimento micelial de isolados monospóricos de <i>Magnaporthe grisea in vitro</i>...	50
3.2 Determinação de componentes monocíclicos em cultivares com diferentes níveis de resistência	53
3.2.1 Período de Incubação e Latência	54
3.2.3 Severidade e ASCPD nas folhas arroz.....	59
3.2.4 Correlações entre crescimento <i>in vitro</i> e componentes monocíclicos da brusone...	63
4 CONCLUSÕES	65
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
CAPITULO 2: VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÃO DE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE <i>Magnaporthe grisea</i> (Barr) COLETADOS NO CENTRO-NORTE DO BRASIL	73
RESUMO	73
ABSTRACT	74
1 INTRODUÇÃO	75
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.2 Produção de micélio para extração de DNA	78
2.3 Genotipagem de Isolados de <i>Magnaporthe grisea</i> com Marcadores Microsatélites....	79
2.4 Análises estatísticas	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1 Análise de diversidade genética e eficiência de marcadores microsatélites na discriminação de isolados de <i>Magnaporthe grisea</i>	84
3.2 Estrutura genética de população isolados de <i>Magnaporthe grisea</i>	90
4 CONCLUSÕES	100
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	106

ESTRUTURA POPULACIONAL E PARÂMETROS
EPIDEMIOLÓGICOS DE ISOLADOS DE
Magnaporthe grisea (Barr)

RESUMO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais cereais cultivados no Brasil, desempenhando um papel social e econômico de grande importância para as mais diversas regiões do país. Esse cereal é conduzido no Brasil sob dois principais sistemas de cultivo, o irrigado, tipicamente utilizado nos estados da região Sul do país e o de sequeiro, tradicional na abertura de novas áreas e nas regiões Centro, Norte e Nordeste do Brasil. Para cada sistema de cultivo são utilizados grupos de cultivares adaptadas a condições específicas, principalmente quanto ao fornecimento de água. (sem parágrafo) A brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. cuja fase teleomórfica corresponde a *Magnaporthe grisea* (Barr), é um dos principais fatores limitantes para a cultura do arroz no Brasil e no mundo. O controle é feito, principalmente, pelo uso de cultivares resistentes e fungidas. No entanto, o controle químico através de fungicidas específicos, além de elevar o custo de produção do cereal, causa vários danos ao meio ambiente, e deve ser utilizado integrado a outras técnicas de manejo.

Programas de melhoramento genético de arroz são conduzidos no país por diferentes instituições, gerando, a cada ano, novas cultivares de arroz com resistência vertical a brusone. A estreita base genética dos programas de melhoramento tem contribuído para a quebra de resistência das novas cultivares lançadas por estes programas em apenas 1 ou 2 anos após o lançamento, especialmente no Estado do Tocantins. Quebras de resistência em período tão curto apontam para a necessidade busca de fontes de resistência duráveis à brusone, especialmente nas regiões tropicais de cultivo de arroz, onde a variabilidade genética do patógeno é alta.

Para tanto, é de suma importância o conhecimento sobre as populações do patógeno e de suas interações com as plantas hospedeiras. O conhecimento mais aprofundado das características das populações de *Magnaporthe grisea* da região Centro-Norte do Brasil é condição fundamental na orientação dos programas de melhoramento do hospedeiro. O patossistema arroz/brusone é estudado há muito tempo em várias partes do mundo. Porém, no Brasil ainda foi pouco explorado, havendo necessidade de pesquisas em regiões com alto potencial produtivo, como os Estados do Pará, Rondônia, Acre, Tocantins e Maranhão, especialmente em virtude da expansão da fronteira agrícola do arroz de sequeiro.

Objetivou-se, a partir do presente trabalho, identificar a estabilidade da cultivar Oryzica Llanos 5 (modelo de cultivar com resistência durável, oriunda da Colômbia) quando inoculada

com isolados de *M. grisea* coletados na região Centro-Norte do Brasil, mediante avaliações de parâmetros epidemiológicos como período de incubação, latência, severidade e agressividade da doença. Além disso, objetivou-se detectar, a partir de estudos moleculares, a variabilidade genética e a estrutura populacional de isolados coletados no Tocantins, Goiás e Pará.

No capítulo 1 desta dissertação descreve-se a ocorrência de isolados de *M. grisea*, coletados nos estados do Centro-Norte do Brasil, capazes de quebrar a resistência genética na cultivar Oryzica Llanos 5, padrão de resistência à doença, e examinam-se possíveis interações entre a virulência a esta cultivar e alguns parâmetros monocíclicos das epidemias de brusone. Para tanto, foram avaliados 35 isolados monospóricos de *M. grisea* obtidos nos municípios de Lagoa da Confusão, Dueré, Formoso do Araguaia (Tocantins), Luiz Alves do Araguaia (Goiás) e Paragominas (Pará). Objetivando-se a quantificação do desenvolvimento micelial dos isolados *in vitro*, calculou-se, a cada 3 dias, a área da colônia, a partir da qual obteve-se a área sob a curva de crescimento micelial (ASCCM) para cada um dos isolados. Os parâmetros epidemiológicos (período de incubação, período de latência, severidade da doença e área sob a curva de progresso da doença – ASCPD), foram determinados em casa de vegetação, para todos os 35 isolados em três variedades de arroz (Caloro e Fanny – suscetíveis; Oryzica Llanos 5 – resistente). As plantas foram avaliadas a cada três dias através de análise visual baseada em uma escala de notas de sete classes (0, 1, 3, 4, 5, 7 e 9). No estudo *in vitro*, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) da ASCCM entre os isolados, independente do local de coleta. Nos experimentos de casa de vegetação, o período de incubação nas cultivares suscetíveis variou entre 1,00 dia (isolado F-2) e 5,75 dias (isolado LA-2) em ‘Caloro’; e entre 1,00 dia (isolado F-2) e 6,25 dias (isolado LA-2) em ‘Fanny’. Quando os isolados monospóricos foram inoculados na cultivar resistente Oryzica Llanos 5, observou-se que 34% dos isolados estudados apresentaram quebra de resistência (F-1, F-2, F-5, F-9, F-10, LC-1, LC-2, LC-4, D-2, P-2 e P-6). Os isolados que quebraram resistência apresentaram os menores períodos de incubação (ex. isolado D-1, 2,0 dias), enquanto que os isolados que não quebraram resistência apresentaram os maiores períodos de incubação (ex. isolado LA-2, 6,25 dias). Isolados que quebraram resistência apresentaram também o menor período de latência. Observou-se forte correlação positiva entre a severidade da doença aos 6, 9 e 12 DAI e a ASCPD, e uma significativa correlação negativa entre período de incubação ou de latência e a ASCPD. As ASCPDs nas cultivares suscetíveis foram maiores que no padrão de resistência. É importante ressaltar a quebra de resistência genética da cultivar Oryzica Llanos 5, até o momento considerada como padrão de resistência,

por isolados de *M. grisea* coletados no Centro-Norte do Brasil. O resultado desses estudos demonstra claramente a alta diversidade genética do patógeno nesta região.

No capítulo 2, objetivou-se identificar a diversidade genética e a estrutura de população de isolados monospóricos coletados em lavouras comerciais de arroz nos Estados de Tocantins, Goiás e Pará. Para tanto, conduziram-se ensaios na Embrapa-CENARGEN, onde foram avaliados 140 isolados monospóricos de *M. grisea* obtidos nos municípios de Lagoa da Confusão, Dueré e Formoso do Araguaia (Tocantins), Luiz Alves do Araguaia (Goiás) e Paragominas (Pará). Neste estudo, 34 marcadores microssatélites marcados com fluorocromo foram utilizados para a genotipagem automática em sequenciador de DNA. Quatorze marcadores microssatélites mostraram-se altamente eficientes para estimar a diversidade genética e detectar estruturação em população de isolados monospóricos de *M. grisea*. Alguns deles apresentaram um conteúdo informativo elevado, facilitando a genotipagem em escala e propiciando alta eficiência na análise de polimorfismo de DNA. A média do número de alelos por loco foi 6,35, variando de 2 alelos para os marcadores ms 109 - 110, ms 115 - 116, ms 61 - 62 a 16 alelos para o marcador PG 27. Os índices de diversidade genética (DG), conteúdo polimórfico informativo (PIC) e probabilidade de identidade (PI), confirmaram a eficiência destes marcadores. A população de isolados de *M. grisea* do Centro Norte do Brasil apresentou subestruturação em três sub-populações (K=3). Os isolados de Goiás (Luiz Alves) em sua maioria foram observados no Grupo 1, os isolados de Tocantins (Formoso, Dueré e Lagoa da Confusão) em sua maioria foram observados no Grupo 2 e os isolados do Pará (Paragominas) foram observados no Grupo 3. Os isolados do Pará são os mais distantes geneticamente em relação aos isolados de Goiás e Tocantins. A alta diversidade genética observada na metapopulação de *M. grisea* do Centro-Norte brasileiro, assim como a evidência de estruturação, sugerem a necessidade de monitoramento específico e emprego de estratégias adequadas pelos programas de melhoramento genético para as sub-populações detectadas.

GENERAL ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the main cereals cultivated in Brazil, carrying an important social and economical role in several geographical regions. Rice is cultivated in Brazil in two main cropping systems, irrigated, typical of the Southern region and dry land ('sequeiro'), traditionally used for opening new areas in the Center, Northern and Northeastern parts of Brazil. For each cultivation system, a group of cultivars, especially adapted to each condition, are used. Rice blast, caused by the fungus *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. teleomorph *Magnaporthe grisea* (Barr), is one of the main limiting factors to rice production in Brazil and elsewhere. Control is mainly by a combination of resistant cultivars and fungicides. However, the use of fungicides increases production costs and may be damaging to the environment, and should be used integrated with other disease management techniques.

Several rice breeding programs are conducted in Brazil by a number of different research institutions, every year offering new rice cultivars with vertical resistance to blast to growers. Unfortunately, the narrow genetic basis of the breeding programs has contributed to resistance breakdown of these new rice cultivars just 1 or 2 years after release, as has been observed in the State of Tocantins. Resistance breakdown in such a short period of time points towards the need to find and select durable sources of resistance, especially in the tropical regions, where genetic variability of the pathogen is seemingly very high.

However, before beginning the search of sources of host resistance, knowledge of the pathogen population variability is very important, as well as of its interactions with its plant host. Deeper knowledge of the populations of *Magnaporthe grisea* from Central-North Brazil is a fundamental condition for the orientation of rice breeding programs. The rice blast pathosystem has been studied for some time in other geographic regions, but is still hardly explored in Brazil. Therefore, there is a pressing need to conduct prospective diversity research of the pathogen in regions with high yielding potential, such as the States of Pará, Rondônia, Acre, Tocantins and Maranhão, especially taking into account the expansion of dry land rice.

This study aimed to describe the stability of rice cultivar Oryzica Llanos 5 (standard of durable resistance, originated in Colômbia) when inoculated with *M. grisea* isolates of collected in the Center-Northern Brazil, by estimations of epidemiological parameters, such as period of incubation, latent period, severity and pathogen aggressiveness. In addition, the

genetic variability and the populational structure of *M. grisea* isolates collected in the States of Tocantins, Goiás and Pará were examined by molecular studies.

Chapter 1 describes the discovery of isolates of *M. grisea* from the States of Tocantins (TO), Goiás (GO) and Pará (PA), capable of breaking the resistance of cv. Oryzica Llanos 5, the standard of genetic resistance to rice blast, and examines possible interactions between virulence and some monocyclic components of rice blast epidemics. Towards that end, thirty-five monosporic isolates of *M. grisea* from the counties of Lagoa da Confusão, Dueré, Formoso do Araguaia (TO), Luiz Alves do Araguaia (GO) and Paragominas (PA) were studied. Radial mycelial growth was determined *in vitro*, every third day, and the area under the curve of mycelial growth (AUCMG) of each isolate was compared. Epidemiological parameters (period of incubation, latent period, disease severity and the area under disease progress curve – AUDPC) were estimated in the greenhouse, for each of the thirty-four isolates in three rice cultivars (‘Caloro’ and ‘Fanny’ – susceptible; ‘Oryzica Llanos 5’ – resistant). Plants were evaluated visually every third day, with the aid of a diagrammatic scale of seven classes (0, 1, 3, 4, 5, 7 and 9). In the *in vitro* study, the AUCMG was significantly different among isolates ($p \leq 0,05$), irrespective of geographical origin. Period of incubation in susceptible cultivars varied from 1.00 day (isolate F-2) to 5.75 days (isolate LA-2) on ‘Caloro’; and between 1.00 day (isolate F-2) to 6.25 days (isolate LA-2) on ‘Fanny’. When the monosporic isolates were inoculated on resistant cv. Oryzica Llanos 5, 34% broke its resistance (F-1, F-2, F-5, F-9, F-10, LC-1, LC-2, LC-4, D-2, P-2 e P-6). The isolates that broke Oryzica Llanos 5 resistance also had the shortest incubation periods (e.g. isolate D-1, 2.0 days), while the isolates that did not show resistance breakdown, generally had the longest incubation periods (e.g. isolate LA-2, 6.25 days). Isolates virulent on Oryzica Llanos also had the shortest latent periods. A significant and positive correlation was observed between disease severity at 6, 9 and 12 days after inoculation and the AUDPC, and a significant and negative correlation was generally observed between period of incubation or latent period and the AUDPC. The AUDPCs of susceptible cultivars were larger than in the resistant cultivar. The resistance breakdown of cv. Oryzica Llanos 5, so far the resistant standard, by isolates of *M. grisea* from the Brazilian Central-North region is reported here for the first time and is a clear indication of the high genetic diversity of the pathogen in this region, which therefore poses a great threat to rice production in Brazil.

In chapter 2, monosporic isolates collected at commercial rice farming at the states of Tocantins, Goiás and Pará were examined for genetic diversity and population structure. In

order to examine the diversity, essays were conducted at Embrapa-CENARGEN, where 140 *M. grisea* monosporic isolates obtained from the counties of Lagoa da Confusão, Dueré and Formoso do Araguaia (Tocantins), Luiz Alves do Araguaia (Goiás) and Paragominas (Pará) were evaluated. For this study, 34 microsatellite markers marked with fluorochrome were used for automatic genotyping in DNA sequencing. Fourteen microsatellites markers appeared highly efficient to estimate genetic diversity and to detect structuration in the *M. grisea* metapopulation from Central-North Brazil. Some of them had high informative content, facilitating genotyping in scale and DNA polymorphism analysis. The medium number of alleles per *loco* was 6.35, varying from 2 alleles by markers ms 109 – 110, ms 115 - 116, ms 61 – 62 to 16 alleles by marker PG 27. Genetic diversity index (GD), informative polymorphic content (IPC) and identity portability (IP), confirmed these markers efficiency. *M. grisea* metapopulation from Central-North Brazil was substructured in three sub-populations (K=3). Goiás (Luiz Alves) isolates were mostly observed in Group 1, Tocantins (Formoso, Dueré and Lagoa da Confusão) isolates were mainly observed in Group 2 and Pará (Paragominas) isolates were all observed in Group 3. Group 3 isolates (Pará) were the most genetically distant in relation to isolates of Goiás and Tocantins. The high genetic diversity observed in the *M. grisea* metapopulation, as well as the evidence of populational sub-structures, suggest the need of specific monitoring and the use of adequate strategies by genetic improvement programs to each of the sub-populations identified.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é um dos principais cereais cultivados no Brasil, desempenhando um papel social e econômico de grande importância para as mais diversas regiões do país. Esse cereal é conduzido no Brasil sob dois principais sistemas de cultivo, o irrigado, tipicamente utilizado nos estados da região Sul do país e o de sequeiro, tradicional na abertura de novas áreas e nas regiões Centro, Norte e Nordeste do Brasil. Para cada sistema de cultivo são utilizados grupos de cultivares adaptadas a condições específicas, principalmente quanto ao fornecimento de água.

A brusone, doença causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. cuja fase teleomórfica corresponde a *Magnaporthe grisea* (Barr), é um dos principais fatores limitantes para a cultura do arroz no Brasil e no mundo. Seu controle é feito, principalmente, pelo uso de cultivares resistentes e fungidas. O controle químico através de fungicidas específicos, além de elevar o custo de produção do cereal, causa vários danos ao meio ambiente, e deve ser utilizado integrado a outras técnicas de manejo.

Programas de melhoramento genético de arroz são conduzidos no país por diferentes instituições, gerando, a cada ano, novas cultivares de arroz com resistência vertical a brusone. A estreita base genética dos programas de melhoramento tem contribuído para a quebra de resistência das novas cultivares lançadas por estes programas em apenas 1 ou 2 anos após o lançamento, especialmente no Estado do Tocantins. Quebras de resistência em período tão curto apontam para a necessidade busca de fontes de resistência duráveis à brusone especialmente nas regiões tropicais de cultivo de arroz, onde a variabilidade genética do patógeno é alta.

Para tanto, é de suma importância o conhecimento sobre as populações do patógeno e de suas interações com as plantas hospederias. O conhecimento mais aprofundado das características das populações de *Magnaporthe grisea* da região Centro-Norte do Brasil é condição fundamental na orientação dos programas de melhoramento do hospedeiro. O patossistema arroz/brusone tem sido estudado há muito tempo em várias partes do mundo. Porém, no Brasil ainda foi pouco explorado, havendo necessidade de pesquisas em regiões com alto potencial produtivo, como o Estado do Pará, Rondônia, Acre, Tocantins e Maranhão, especialmente em virtude da expansão da fronteira agrícola do arroz de sequeiro.

Objetivou-se, a partir do presente trabalho, identificar a estabilidade da cultivar Oryzica Llanos 5 (modelo de cultivar com resistência durável, oriunda da Colômbia) quando inoculada com isolados de *M. grisea* coletados na região Centro-Norte do Brasil, mediante avaliações de parâmetros epidemiológicos como período de incubação, latência, severidade e agressividade da doença. Além disso, objetivou-se detectar, a partir de estudos moleculares, a variabilidade genética e a estrutura populacional de isolados coletados no Tocantins, Goiás e Pará.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O genero *Oryza*

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence à sub-família Ehrhartoideae (ou Oryzoideae) e família Poaceae (Barker *et al.*, 2001; Kellogg, 1998; Vaughan, *et al.*, 2005; Zhang & Clark, 2000). Descrito por Lineu em 1753, o gênero possui aproximadamente 23 espécies, subdivididas em quatro grandes complexos (*O. sativa*, *O. officinalis*, *O. ridleyi*, e *O. granulata*). O termo “complexo específico”, segundo Tateoka (1962), indica grupos de espécies para os quais há uma falta de bons caracteres para utilização de chave taxonômica, chegando ao ponto de haver, dentro deles, uma relativa arbitrariedade na utilização de um nível taxonômico de espécie ou sub-espécie (Vaughan *et al.*, 2005).

As espécies do gênero *Oryza* são subdivididas em quatro seções: *Oryza*, *Ridleyanae* Tateoka, *Granulata* Roschev. e *Brachyantha* B.R. Lu. A seção *Oryza* compreende os complexos *O. sativa* e *O. officinalis*, a seção *Ridleyanae* Tateoka compreende o *O. ridleyi* e a seção *Granulata* Roschev. é composta do complexo *O. granulata*. A seção *Brachyantha* B.R. Lu não é subdividida em complexos, e apresenta somente a espécie *O. brachyantha* Chev. (Vaughan *et al.*, 2003).

As duas únicas espécies cultivadas do gênero – *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima* - pertencem ao complexo *O. sativa*, que também inclui outras espécies diplóides não domesticadas de genoma AA, como *O. glumaepatula*, espécie endêmica do continente Americano. A espécie *O. glaberrima*, originária da África, é cultivada no oeste africano,

enquanto *O. sativa*, de origem asiática, apresenta ampla distribuição mundial, sendo cultivada em todos os continentes (Khush, 1997).

Kato (1928) introduziu a classificação do arroz asiático em duas sub-espécies: *indica* e *japonica*. Mais tarde, em 1952, um terceiro grupo, *javanica*, que atualmente inclui-se no subgrupo *japonica tropical*, um sub-grupo da subespécie *japonica* (Matsuo, 1952; Glaszmann, 1987; Garris *et al.*, 2005). A separação das subespécies provavelmente ocorreu devido a barreiras geográficas e reprodutivas (Sweeney & Mccouch, 2007). Cultivares da subespécie *indica*, disseminadas no mundo inteiro, possuem alta capacidade de perfilhamento, colmos e folhas longas, ciclo curto, e o sistema de produção é tipicamente irrigado. A subespécie *indica* é originária dos vales do leste da Índia. Já as variedades *japonica*, originárias do sul da China, apresentam média capacidade de perfilhamento, colmos e folhas curtos, ciclo tardio. A subespécie *japonica* possui área cultivada menor do que a *indica*, especialmente em áreas temperadas, como o Japão. As variedades *japonica tropical* são produzidas em regime de irrigação natural, na estação chuvosa, sendo conhecidas como arroz de sequeiro ou de terras altas (Guimarães & Yokoyama, 2003).

2.2 Importância econômica da cultura do arroz

O arroz é uma cultura de importância econômica e social. A espécie se destaca pela adaptabilidade aos mais diversos ecossistemas e pela amplitude de área cultivada e produtividade, tanto no Brasil quanto no mundo. O arroz e seus sub-produtos são o principal alimento de aproximadamente metade da população mundial. Dados da FAO (2007) indicam uma área plantada de arroz no mundo de 156 milhões de ha, com uma produção estimada em 651 milhões de toneladas.

A China é o maior produtor de arroz (187 milhões de toneladas). Já a Índia possui a maior área plantada, com 44 milhões de ha ocupados, seguida da China. Em 2007, a produtividade média mundial foi estimada em 4.152 Kg/ha, ocorrendo grande variação em relação a este valor entre os principais países produtores (FAO, 2007).

No Brasil, a área plantada na safra 2007/2008 correspondeu, aproximadamente, a 2,9 milhões de ha, e a produção esteve na ordem de 11,9 milhões de toneladas (IBGE, 2009), o que

insere o país no grupo dos dez maiores produtores mundiais, ocupando a nona posição, sendo o único país não asiático da lista.

O arroz é um alimento básico na dieta dos brasileiros e fornece 12% do total das calorias ingeridas pela população no ano. O negócio direto do arroz no Brasil, independentemente do setor de insumos, máquinas, agroindústria e serviços, mobiliza cerca de R\$ 4,0 bilhões ao ano. Isto significa que somente o valor direto da produção no campo atinge 11% do valor da produção agrícola brasileira. A produtividade média de arroz no Brasil, que é de 4.100 Kg/ha, está próxima a média mundial (IBGE, 2009).

A subespécie *indica* é cultivada sob um sistema irrigado, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, responsáveis por 70% da produção nacional, apesar de apresentarem apenas cerca de 40% da área de cultivo. Nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, o cultivo da subespécie *japonica*, também conhecido como arroz de sequeiro, ou arroz de terras altas, é predominante.

No Brasil é plantado anualmente cerca de 2,8 milhões de hectares de arroz, entretanto a área cultivada de arroz de sequeiro tem sido superior à área cultivada com arroz irrigado. A produção de arroz de sequeiro (~ 2,75 milhões de toneladas, IBGE, 2008) corresponde à cerca de 30% da produção total brasileira. A produtividade das cultivares de sequeiro varia entre 1500 e 2000 kg/ha, no entanto, é em média, cerca de três vezes menor que a média das variedades de arroz irrigado (FAO, 2007; IBGE, 2008) e a suscetibilidade do arroz a brusone neste tipo de cultivo é maior que em sistema irrigado. Certamente, um dos fatores de maior interferência na produtividade de arroz, tanto de sequeiro quanto irrigado, são as epidemias de brusone, doença causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (Barr).

No arroz irrigado, o emprego controlado da água durante praticamente todo o ciclo nas áreas sistematizadas minimiza a intensidade do ataque do fungo. Em arroz de sequeiro, no entanto, a perda de produção em consequência da doença pode ser total, refletindo em menores médias nacionais de produção. Portanto, em um país onde a área plantada com arroz de sequeiro é tão significativa, como o Brasil, o desenvolvimento de variedades resistentes ao patógeno assume uma importância ainda maior (Araújo, 2008). Entretanto, o sucesso e a durabilidade de uma nova cultivar de arroz resistente a brusone dependem do conhecimento da estrutura da

população do patógeno com que a variedade vai interagir. Este conhecimento ainda é muito escasso, principalmente no Brasil.

Em 2015, o mundo necessitará de uma produção adicional de arroz de 50 milhões de toneladas, o que equivale a aproximadamente nove por cento da atual produção mundial. Este é um desafio enorme para os programas de melhoramento, pois se a área cultivada atualmente for mantida nos próximos oito anos, a produtividade deve aumentar significativamente para atender a esta demanda. Para que este patamar seja alcançado, é necessário que os produtores utilizem novas tecnologias de produção para otimizar o cultivo do cereal, de variedades resistentes a doenças (especialmente a brusone) e que se adaptem a condições ambientais adversas, como tolerância à seca (IRRI, 2006).

2.3 A brusone do arroz

No século XVII, aproximadamente em 1637, ocorreram os primeiros registros de ocorrência de brusone na China (Ou, 1972). A partir daí, a doença foi relatada na grande maioria dos países que cultivam arroz, sendo considerada a mais importante doença da cultura (Ribeiro & Terres, 1987) devido a sua ampla distribuição geográfica e severidade (Ou, 1985). No Brasil, a brusone foi relatada pela primeira vez em 1912 no Estado de São Paulo (Prabhu & Filippi, 2006).

A doença ocorre já na fase vegetativa do arroz, atingindo suas folhas e o colmo e diminuindo a sua área fotossintetizante. Após a emissão das panículas, a doença ocorre tanto no pescoço quanto nas ramificações secundárias, sendo que o estrangulamento impede o fluxo de fotoassimilados e interfere drasticamente no enchimento de grãos. Conseqüentemente, influencia no desenvolvimento da planta, perfilhamento, produtividade e qualidade de grãos. Em epidemias muito severas, pode ocasionar perdas de até 100 % na produção.

A 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). A suscetibilidade de uma mesma cultivar pode variar com o local e o tempo. Conseqüentemente, estudos sobre a caracterização da população do patógeno podem auxiliar na previsão e prevenção da doença.

Atualmente, o Manejo Integrado da doença é indispensável no seu controle. O Manejo Integrado compreende um conjunto de medidas de controle, partindo do princípio da manutenção de uma baixa fonte de inóculo primário no campo, utilização de cultivares resistentes, controle químico da doença, boa nutrição das plantas, aplicação de formas corretas de irrigação, preparo do solo, utilização de sementes inspecionadas, alternância de cultivares, escalonamento de cultivo e adoção de densidade de plantio recomendada (Dias Neto, 2008).

2.3.1 Taxonomia do patógeno

O fungo agente causal da brusone é conhecido na sua fase anamórfica como *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., e na sua fase teleomórfica como *Magnaporthe grisea* (Barr.). O gênero *Pyricularia* foi esbelecido por Saccardo (1880) parasitando a gramínea *Digitaria sanguinalis* nos Estados Unidos e determinou *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. como espécie-tipo do gênero. Na Itália, Cavara (1891) descreveu o gênero *Pyricularia* causando “brusone” em arroz e denominou a espécie como *P. oryzae*. Kawakami (1901) mostrou que tanto *P. grisea* quanto *P. oryzae* se tratava da mesma espécie. Sawada (1917), através de testes de patogenicidade, estabeleceu duas espécies: *P. oryzae* infectando arroz, milho, cevada e trigo, e *P. grisea* infectando *Digitaria sanguinalis* e milho. Já Thomas (1940), demonstrou patogenicidade de *P. oryzae* isolado de arroz, causando doença em trigo, cevada, aveia, milho e milho, enquanto que o isolado de milho não infectou arroz. Asuyama (1963) afirma que segundo as regras de nomenclatura, *P. grisea* teria preferência sobre *P. oryzae*. Entretanto, uma volumosa literatura teria adotado *P. oryzae*, portanto deveria manter *P. oryzae*. O teleomorfo *Ceratospheeria grisea* foi descoberto por Hebert (1971), estudando isolado de *P. grisea* proveniente de *Digitaria sanguinalis*. Posteriormente, Barr (1977) transferiu a espécie para *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, sendo esta também forma perfeita de *P. oryzae*, conforme demonstrado por Kato & Yamagushi (1982).

Como foi descoberto o teleomorfo *M. grisea*, de acordo com o Comitê Internacional de Micologia deve-se referir-se ao fungo como o holomorfo, ou seja, o fungo tratado como único microorganismo sendo este *Magnaporthe grisea*.

P. grisea pertence à classe dos fungos Mitospóricos, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales, e família Moniliaceae (Menezes & Oliveira, 1993). Segundo Kirk *et al.* (2001), são conhecidos 1.800 gêneros e 9.000 espécies de Hyphomycetes de forma filamentosa, haplóides (n). As formas filamentosas se reproduzem assexuadamente (Bononi & Grandi, 1999). Saccardo (1880), estabeleceu o gênero *Pyricularia*

Os conídios de *P. grisea* são piriformes, obclavados, com a base circular e o ápice fino, levemente escuros ou hialinos, com pequeno hilo na base, a maioria possui um ou dois septos transversais; ligam-se ao conidióforo pelo seu lado mais dilatado e medem entre 17-23 µm de comprimento por 8-11 µm de largura. Existe uma variação considerável entre isolados de arroz quanto ao tamanho dos conídios, principalmente quanto ao comprimento. Os conídios maduros possuem tipicamente três células e apresentam um apêndice basal no ponto de conexão com o conidióforo (Prabhu & Filippi, 2006).

O teleomorfo *M. grisea* pertence à classe dos Ascomycetos e ordem Diaporthales. Os ascósporos são hialinos, fusiformes, com três septos e os ascos unitunicados. Não foi verificada, até o momento, a presença do teleomorfo na natureza (Prabhu & Filippi, 2006).

2.3.2 Epidemiologia

A brusone do arroz se destaca entre as doenças que infectam gramíneas, não somente pelo seu alto poder destrutivo, mas também pelo amplo espectro de fases da cultura que ataca. Durante o estágio inicial de desenvolvimento do hospedeiro, as lesões são formadas nas folhas. Após a diferenciação dos primórdios florais (emborrachamento), o patógeno geralmente infecta a panícula e/ou o pescoço. Por isso, o patossistema da brusone do arroz é dividido em dois subsistemas: o patossistema da folha e o patossistema da panícula (Teng *et al.*, 1991, citados por Garrido, 2001).

A brusone se desenvolve rapidamente quando existem condições adequadas. Todas as fases do ciclo da doença, desde a germinação dos conídios até o aparecimento de lesões, são influenciadas, em grande parte, pelos fatores climáticos. Nas doenças de parte aérea, dentre os fatores ambientais que podem afetar as relações patógeno-hospedeiro, a presença de água na

forma livre ou vapor, a temperatura, e conseqüentemente o tempo de molhamento foliar, são os mais importantes (Bergamin Filho *et al.*, 1995).

O ciclo primário da doença acontece quando uma cultivar de arroz suscetível é plantada em área de cultivo onde o inóculo está presente e há condições ambientais favoráveis. Conídios que permaneceram nos restos culturais infectados, sementes contaminadas da safra anterior e plantas daninhas também podem constituir o inóculo inicial.

A umidade (água no estado líquido ou gasoso), através do molhamento das folhas pelas chuvas ou pela deposição de orvalho, é o fator determinante e essencial à ocorrência das doenças, ao passo que a temperatura age como catalisador, retardando ou acelerando o processo infeccioso e de reprodução do patógeno (Bergamin Filho *et al.*, 1995).

As temperaturas entre 20°C e 25°C durante o dia (EMBRAPA, 2005), e noturnas variando de 17 a 21°C são ótimas para a infecção e esporulação do fungo e rápido desenvolvimento da doença (POTAFOS, 1995). Ou (1972) observou que as condições ambientais requeridas à infecção são temperaturas entre 21 e 27 °C e 10 a 14 horas de molhamento. Alves & Fernandes (2006) observaram que, quando a umidade relativa é elevada para 90% ou mais, a conidiogênese é favorecida.

A liberação de conídios é influenciada pela temperatura e normalmente ocorre na faixa de 15 a 35 °C. Em relação à germinação dos conídios, a temperatura deve ser entre 22 a 28 °C (Toledo & Escobar, 2002).

A luz também pode ter influência sobre o crescimento micelial e dos conídios. A alternância de luz tem um papel importante sobre a esporulação. Quanto menor for o número de horas diárias de sol, maiores serão as probabilidades do ataque de *M. grisea* (Prabhu & Filippi, 2006).

Ou (1985) descreve a doença policíclica em que uma lesão típica do patógeno é capaz de produzir de 2.000 a 6.000 conídios por dia, por aproximadamente 14 dias, em condições de laboratório.

A disseminação ocorre principalmente pela ação do vento (Ribeiro, 1985), especialmente em rajadas fortes que provocam o atrito entre as plantas, liberando os conídios (Picinini & Fernandes, 1995), que são facilmente liberados após sua formação. Chuvas brandas também favorecem a disseminação de conídios, mas com menor eficiência. Sob condições tropicais, os conídios podem ser dispersos comumente a 230 metros da fonte (Kingsolver, 1984; Teng, 1994).

Epidemias de brusone são conhecidas por serem influenciadas pelo manejo da cultura, especificamente no que tange à aplicação de nitrogênio, estresse de água e conteúdo de sílica. Portanto, o manejo da doença deve basear-se no potencial das práticas culturais adotadas influenciarem o desenvolvimento da epidemia. Assim, uma epidemia deve ser vista como o resultado de muitas relações da interação patógeno-hospedeiro (Garrido, 2001). A epidemia resulta em numerosas gerações por ciclo do hospedeiro, sendo que cada qual pode conferir uma vantagem evolucionária para uma subpopulação particular do patógeno na escala temporal e espacial de uma safra (Teng, 1994).

As 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 7 a 8 ciclos por estação de cultivo, enquanto nas regiões tropicais podem ocorrer 10 a 15 ciclos por estação (Teng, 1994).

A epidemiologia da doença é influenciada pela resistência da planta a ser infectada, sob as condições ambientais no momento da infecção e sob a pressão de inóculo inicial. Para avaliar a resistência parcial de uma cultivar à determinada doença, pode-se medir a quantidade de patógeno nele presente num dado momento, comparada à quantidade presente numa cultivar suscetível escolhida como controle. Porém, medir a quantidade de patógeno é normalmente impraticável em larga escala, já que este nem sempre é facilmente visualizado. Entretanto, podem ser avaliados os efeitos do patógeno sobre o hospedeiro, ou seja, as lesões causadas pelo patógeno (Parlevliet, 1993).

Numerosos estudos demonstraram que medir a quantidade de tecido afetado pelo patógeno proporciona uma estimativa acurada da severidade de infecção (Neervoort & Parlevliet, 1978; Johnson & Wilcoxson, 1979). Entretanto, devem ser avaliados vários componentes relacionados também à capacidade de colonização e adaptação do patógeno como

o período de latência, tamanho, número e crescimento de lesões, produção de esporos, a severidade de infecção e o progresso da moléstia (Thomé *et al.* 1999).

O período de latência refere-se ao período de tempo decorrido desde a inoculação das plantas (contato entre patógeno e hospedeiro) até que as primeiras lesões rompam a epiderme expondo as estruturas reprodutivas do patógeno. Um período de latência maior é consequência da maior resistência da planta à infecção e colonização pelo patógeno. Conseqüentemente, menor número de ciclos do patógeno será produzido sobre esta planta e menor será a severidade da doença no final do ciclo da cultura. Este componente tem sido amplamente utilizado devido à relativa facilidade e rapidez de determinação (Parlevliet *et al.*, 1980; Jacobs & Broers, 1989; Roumen, 1996).

A severidade da doença é frequentemente avaliada em termos de área do tecido hospedeiro ocupada pelas lesões causadas pelo patógeno e reflete o nível de resistência do hospedeiro devido às variações nos componentes acima citados. Atualmente, essas avaliações são feitas com o auxílio de escalas diagramáticas, como a elaborada por Peterson *et al.* (1948), onde estão representadas diferentes densidades de lesões e que auxiliam na estimativa visual da porcentagem de severidade.

A área sob a curva do progresso da doença (ASCPD) é útil para revelar pequenas diferenças de severidade e níveis de resistência, que se tornam significativos ao longo da escala temporal em função de processos interativos que ocorrem durante as epidemias. Vários autores, após a proposta inicial de Shaner & Finney (1979) e incluindo Singleton *et al.* (1982), Singh & Rao (1989), Das *et al.*(1992), Milach *et al.* (1996), Prabhu & Filippi (2001) e Chaves *et al.*(2004), tem utilizado este modelo. São feitas avaliações seqüenciais de severidade em intervalos regulares de tempo, os dados de severidade são plotados num gráfico em função do tempo e calcula-se a ASCPD. Em genótipos suscetíveis, a moléstia geralmente começa antes e desenvolve-se rapidamente, resultando numa maior ASCPD quando comparados com um genótipo com resistência parcial onde a moléstia começa mais tarde e/ou desenvolve-se mais lentamente.

2.3.3 Ciclo da doença

A adesão do conídio na superfície foliar é o início da patogênese (Anexo 2). Este é revestido por uma substância mucilaginosa que permite a aderência do conídio na folha, mesmo quando a mesma está molhada. O fungo acumula material extracelular adesivo em porções na extremidade do conídio e, uma vez em contato com uma superfície adequada, este é liberado (Prabhu & Filippi, 2006). Esse material adesivo estabelece uma firme ligação, porém não específica, com superfícies cobertas com cera. A composição química da substância adesiva ainda não foi determinada, mas acredita-se que exista o envolvimento de resíduos de glucose e manose (Hamer *et al.*, 1988; Howard & Valent, 1996). Fixados no hospedeiro, os conídios germinam. A germinação ocorre geralmente em água livre ou em condições de umidade que variam de 92 a 96% (Reis *et al.*, 1988). Os conídios emitem um tubo germinativo em torno de 30 a 120 minutos após o contato com a água normalmente a partir da célula basal ou da célula apical, raramente da célula mediana (Prabhu & Filippi, 2006).

Após a emissão completa do tubo germinativo, forma-se o apressório na sua extremidade distal. O apressório tem por função romper a superfície foliar do hospedeiro. O apressório é uma célula de infecção especializada, que durante sua maturação torna-se melanizado, exceto por um poro bem definido entre o apressório e o substrato (folha). Quando a pressão hidrostática aumenta dentro do apressório, alcançando valores acima de 8,0 MPa, um *peg* de penetração é formado a partir do poro e a cutícula da folha se rompe, permitindo a penetração da hifa no interior do tecido foliar (Howard *et al.*, 1991; Howard & Valent, 1996; Dean, 1997; Jong *et al.*, 1997; Money, 1997).

A camada de melanina que é depositada sobre a parede celular do apressório em formação é considerada essencial para o processo de penetração. Após a estrutura de penetração (*peg*) ter rompido a cutícula da planta, o micélio atravessa a parede celular da epiderme e forma a hifa de infecção. Esta, por sua vez, dá origem a hifas secundárias e subseqüentes dentro das células da epiderme e do mesófilo, resultando na colonização do tecido invadido e na formação das lesões (Prabhu & Filippi, 2006; Mendgen *et al.*, 1996). Em uma interação patógeno-hospedeiro compatível, estas lesões evoluem e a colonização intra e intercelular da folha produz lesões a partir das quais o fungo forma novos conídios e se dissemina para formação de novas lesões em outras folhas e/ou plantas (Ribot *et al.*, 2007).

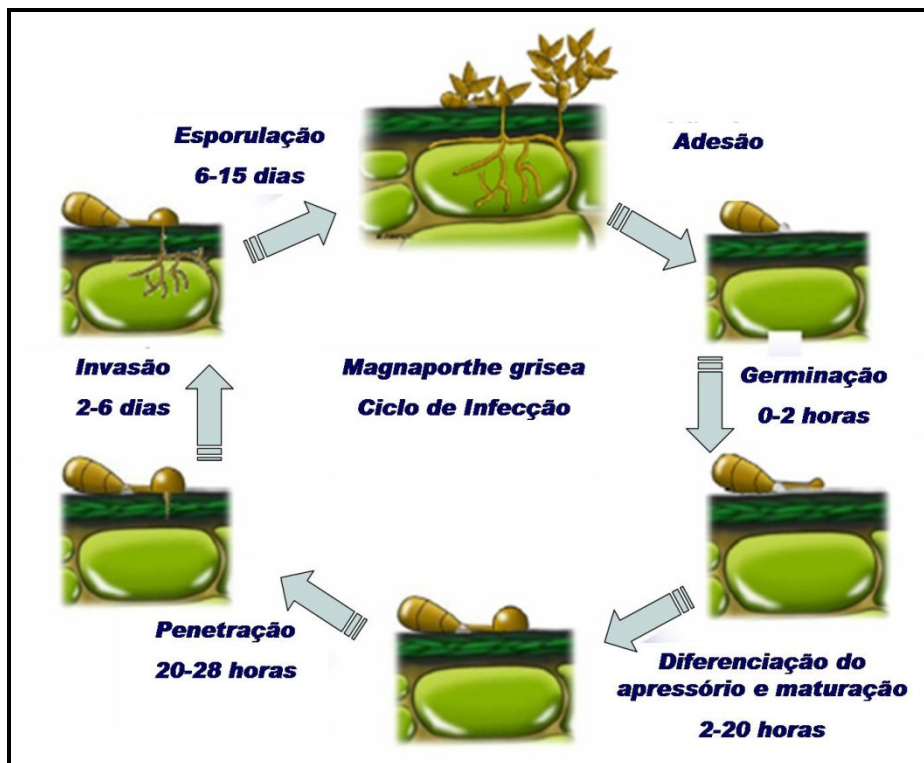


Figura 1. Etapas de infecção de *Magnaporthe grisea* desde a adesão do conídio na superfície foliar até a formação de novos propágulos. Adaptado de Ribot *et al.* (2007)

As lesões nas folhas de arroz são visíveis, em média, após 72 horas da inoculação. A brusone do arroz segue concomitantemente os modelos horário e anti-horário de infecção propostos por Bergamim Filho *et al.* (1996) (Figura 2), onde as lesões formadas durante seu desenvolvimento crescem e formam novas lesões simultaneamente ao crescimento de cada lesão pela incorporação de novos tecidos do hospedeiro.

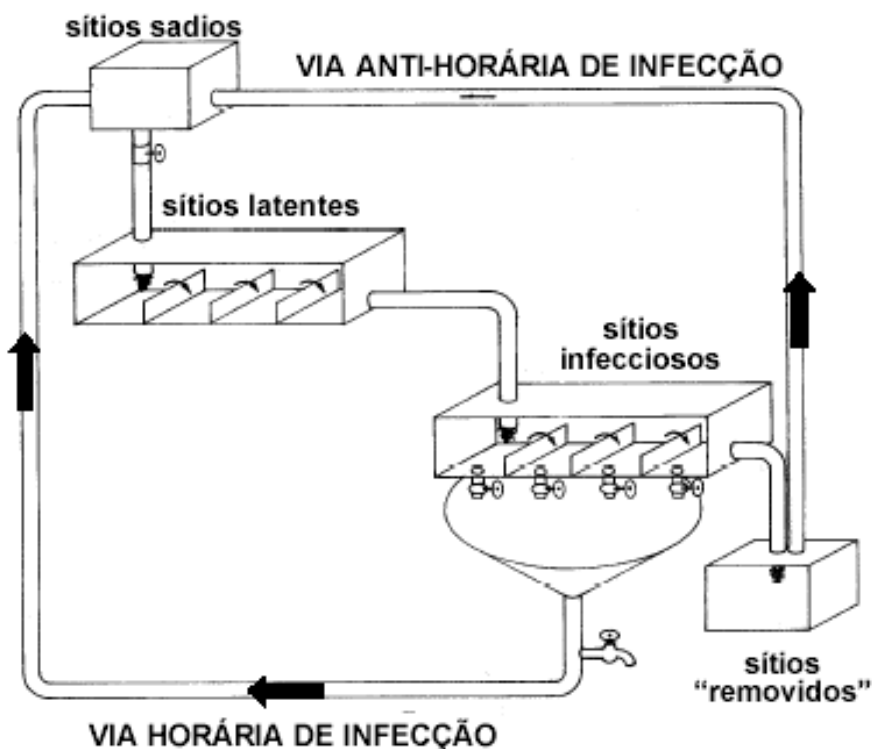


Figura 2. Modelo analógico de Bergamin Filho & Amorim (1996) para o patossistema arroz/brusone. Sítios saudios podem se tornar doentes pela via horária de infecção (novas lesões) e pela via anti-horária de infecção (crescimento da lesão).

Após cerca de 14 horas, quando a umidade do ar atinge cerca de 93%, os conídios são produzidos em abundância, liberados e dispersos pelo vento, fornecendo o inóculo para um ciclo de infecção subsequente. A intensidade da luz afeta negativamente a formação do tubo germinativo e a produção de conídios e, portanto, sua liberação e disseminação ocorrem geralmente durante a noite (Prabhu & Filippi, 2006).

2.3.4 Controle da doença

Várias práticas agrícolas podem apresentar efeitos parciais no controle da brusone do arroz. Estas práticas vêm sendo utilizadas em conjunto no manejo integrado da doença. As práticas culturais, como o preparo do solo, podem exercer grande influência sobre o controle da doença. A redução da quantidade de nitrogênio (N) aplicado à planta de arroz; a antecipação da semeadura e transplântio; o manejo da água de irrigação e o incremento do teor de sílica das

plantas através da utilização do silicato de cálcio são outras medidas que influenciam o índice de incidência e severidade de brusone no arroz. Estas medidas, porém, além de elevarem o custo para o produtor, em muitos casos tornam-se impraticáveis de serem adotadas por limitações logísticas.

O nitrogênio, além de essencial para a cultura, é significativo no aumento da produção de arroz. Entretanto, pode poluir o meio ambiente se não for utilizado de forma adequada, pois os níveis de absorção pela planta são baixos e o risco de contaminação do lençol freático é elevado. A utilização do nitrogênio em excesso aumenta a suscetibilidade ao patógeno nas folhas e na panícula. Por outro lado, sua deficiência pode predispor as plantas a outras doenças, como escaldadura das folhas caudada por *Monographella albescens* e queima das bainhas, causada por *Thanatephorus cucumeris* (Bedendo, 1997).

Outras medidas mais efetivas de controle são o controle químico e utilização de cultivares resistentes (Thurston, 1984, citado por Garrido, 2001). O controle químico da brusone abrange um vasto mercado de fungicidas e antibióticos e vem sendo utilizado por várias décadas, tanto no Brasil quanto em outros países. Entretanto, Notteghem *et al.* (1993) observaram resistência a fungicidas e antibióticos após inoculação com isolados de *M. grisea* na tentativa de controle. A utilização de cultivares resistentes é a forma mais adequada e ambientalmente correta de combater a brusone do arroz.

O modelo de interação gene-a-gene (Flor, 1971), onde para cada gene de resistência (*R*) do hospedeiro observa-se um gene de avirulência (*Avr*) do patógeno (Silué *et al.*, 1992; Bryan *et al.*, 2000) é observado no patossistema *Oryza sativa/Magnaporthe grisea*. O produto do gene *Avr* é reconhecido pelo produto do gene *R* da planta. A interação entre *M. grisea* e *O. sativa* é bastante estudada e há muito serve como modelo para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro (Valent, 1990). Os recentes avanços da genômica, com o sequenciamento completo do genoma estrutural de arroz (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) e do fungo (Dean *et al.*, 2005), tornam esta interação patógeno-hospedeiro o principal modelo para estudos de interação entre uma espécie de importância agrícola e um patógeno.

Nos últimos anos, grande progresso foi feito na compreensão dos mecanismos de infecção do pelo patógeno (Howard *et al.*, 1991; Dean, 1997; Sesma & Osbourn, 2004; Kankanala *et al.*, 2007), vários genes de resistência foram mapeados (Fukuoka & Okuno, 2001; Berruyer *et al.*,

2003; Jeon *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Ballini *et al.*, 2008), e alguns genes de avirulência no patógeno (Dioh *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2007) e de resistência no hospedeiro clonados (Wang *et al.*, 1999; Bryan *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). Mas é importante frisar que o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade (Jeon *et al.*, 2008) e de resistência, especialmente resistência durável (Ballini *et al.*, 2008), ainda são incipientes. Também são incipientes estudos de maior escala sobre a variabilidade das populações do patógeno em campo, especialmente no Brasil.

2.4 Marcadores microssatélites

Microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) são seqüências de nucleotídeos repetidas lado a lado, cuja unidade de repetição varia de um a seis pares de base (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989). São encontrados abundantemente no genoma em uma ampla diversidade de espécies de eucariotos e procariotos (Hearne *et al.*, 1992; Queller *et al.*, 1993; Jarne & Lagoda, 1996).

A expansão do microssatélite, em geral, segue o modelo de mutação aos passos, com o aumento ou diminuição de bases, decorrentes de erros no processo de replicação do DNA, que resultam do deslizamento da DNA polimerase (DNA *slippage*) (Levinson & Gutman, 1987; Schlotterer & Tautz, 1992). Este deslizamento é considerado como o principal mecanismo para que sejam gerados variantes em tamanho nos SSRs (Kruglyak *et al.*, 1998; Chambers & Macavoy, 2000).

Os alelos de um loco microssatélite diferem de tamanho em função do número de repetições das seqüências básicas (Queller *et al.*, 1993). Microssatélites com grande número de unidades de repetição tendem a ser mais polimórficos (Weber, 1990; Goldstein & Clark, 1995; Petit *et al.*, 2005), porém esta não é uma regra geral (Valdes *et al.*, 1993).

Os microssatélites podem ser classificados em três famílias: perfeitos (ex.: CACACACACACACA), imperfeitos (ex.: CACATTCACACATTCA) e compostos (ex.: CACACACAGAGAGAGA). Qualquer tipo de combinação entre estas famílias é possível

(Weber, 1990). Os dinucleotídeos CA e GA têm uma frequência maior em genomas de animais, já TC e AG são mais encontrados em plantas (Depeiges *et al.*, 1995; Jarne & Lagoda, 1996).

A amplificação de locos SSR é feita por PCR e os alelos de um loco são identificados por meio da migração relativa em gel de eletroforese. Os microssatélites caracterizam-se por serem codominantes, multialélicos, seletivamente neutros, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma (Queller *et al.*, 1993; Valdes *et al.*, 1993; Jarne & Lagoda, 1996). Como a detecção de polimorfismo em locos microssatélites é feita via PCR, a genotipagem é dependente de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados.

Microssatélites são usados extensamente para “fingerprinting” de DNA e estudos forenses (Hummel & Schultes, 2000), testes de paternidade, estudos de genética de população (Slatkin, 1995; Dakin & Avise, 2004), caracterização e conservação de recursos genéticos (Hoshino *et al.*, 2002) e construção de mapas genéticos (Chen *et al.*, 1997; Brondani *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2008).

2.5 Diversidade genética de fitopatógenos

Técnicas moleculares baseadas na análise do DNA têm sido aplicadas com êxito em diversas áreas da Micologia, possibilitando o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos (Teixeira *et al.*, 2004). A caracterização morfológica, embora essencial, é limitada algumas vezes devido ao número de caracteres passíveis de serem analisados (Fungaro, 2000). Características de esporos, como forma, número de células, presença ou ausência de septo, forma da parede. Junto a características de conidióforo e o comportamento em meio de cultura como pigmentação, textura, forma marginal e velocidade de crescimento micelial, produção de estruturas típicas, presença ou ausência de zonas concêntricas (Burgess *et al.*, 1995; Urban & Oliveira, 1999) são responsáveis pela diversidade genética entre espécies de fungos.

Entretanto, estes aspectos delimitadores são, de modo geral, instáveis e dependentes de vários aspectos, por exemplo, composição do meio utilizado, condições de incubação e a própria variação intra-específica do patógeno. Portanto, podem ser subjetivos, pouco conclusivos e podem induzir a erros de interpretação quanto à identificação das espécies em estudo, já que,

muitas vezes, colônias atípicas de um dos organismos podem assemelhar-se às colônias do outro.

Quando se trata de distinções intra-específicas, torna-se ainda mais difícil, em alguns casos até impossível distinguir variações dentro de uma espécie apenas com o auxílio de componentes morfológicos. O uso de marcadores moleculares na detecção, diagnóstico e determinação da diversidade genética de fitopatógenos deve-se, principalmente, à sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados gerados.

A análise de diversidade genética é considerada vantajosa para a sobrevivência de uma espécie. Esta contribui para a diversidade fenotípica e determina a forma como indivíduos da espécie interagem com o ambiente e com outros organismos (Pessoa Filho, 2008). Quanto maior a diversidade, maior a chance de que na população alguns indivíduos possuam alelos que contribuam para enfrentar mudanças ambientais como estresses bióticos ou abióticos (Able *et al.*, 2007).

Nei (1987) define distância genética como a diferença entre duas entidades que podem ser descritas pela variação alélica. Esta definição foi, posteriormente, mais elaborada por Nei (1987) e refinada por Beaumont *et al.* (1998) como “qualquer medida quantitativa da diferença genética, em nível de sequência ou frequência alélica, que é calculada entre indivíduos, populações ou espécies.”

As populações patogênicas estão, na maioria dos casos, em estado dinâmico. A dinâmica de populações refere-se às alterações no tamanho da população e constitui uma ramificação da ecologia quantitativa. Os estudos da dinâmica do patógeno são importantes para inferir sobre a taxa de aumento dessas populações (Prabhu & Filippi, 2006). O termo população significa uma comunidade de indivíduos com capacidade ou potencial de cruzamentos entre si (MacKenzie, 1980).

A estrutura genética refere-se à quantidade e distribuição da variação genética entre e dentro de populações (McDonald & Linde, 2002). O número de alelos por loco e a percentagem de locos polimórficos têm sido empregados como índices de diversidade em populações naturais, no sentido de caracterizar e comparar os níveis de variação nestas populações. A estrutura genética de uma população individual dentro de uma espécie depende da história

evolucionária da população e varia com o tempo e o espaço ou adapta-se em resposta às alterações nas condições ambientais. Os fatores que exercem influência sobre a evolução das populações são as mutações, o fluxo gênico, a deriva genética, a recombinação genética, a seleção exercida pelos genes de resistência do hospedeiro, dentre outras. A interação entre estes cinco parâmetros evolucionários determina a estrutura genética da população do patógeno.

Desta forma, fatores como tamanho da população e o modo de reprodução (assexual ou sexual), influenciam na distribuição da variação genética entre e dentro de populações. As estatísticas F fornecem os índices de fixação de alelos para o total das populações, média dentro e entre populações, com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência (Wright, 1965). Estas foram inicialmente desenvolvidas para o caso de um loco com dois alelos (Wright, 1965). Posteriormente, Nei (1977) adaptou esta metodologia para locos multialélicos, contrastando um alelo p contra outros alelos $(1-p)$, através dos conceitos de heterogossidade observada e esperada. Esta estatística admite que todos os desvios de panmixia sejam exclusivamente devidos aos efeitos da deriva genética e do sistema de reprodução. (Conte, 2004).

Assim conforme Wright (1965):

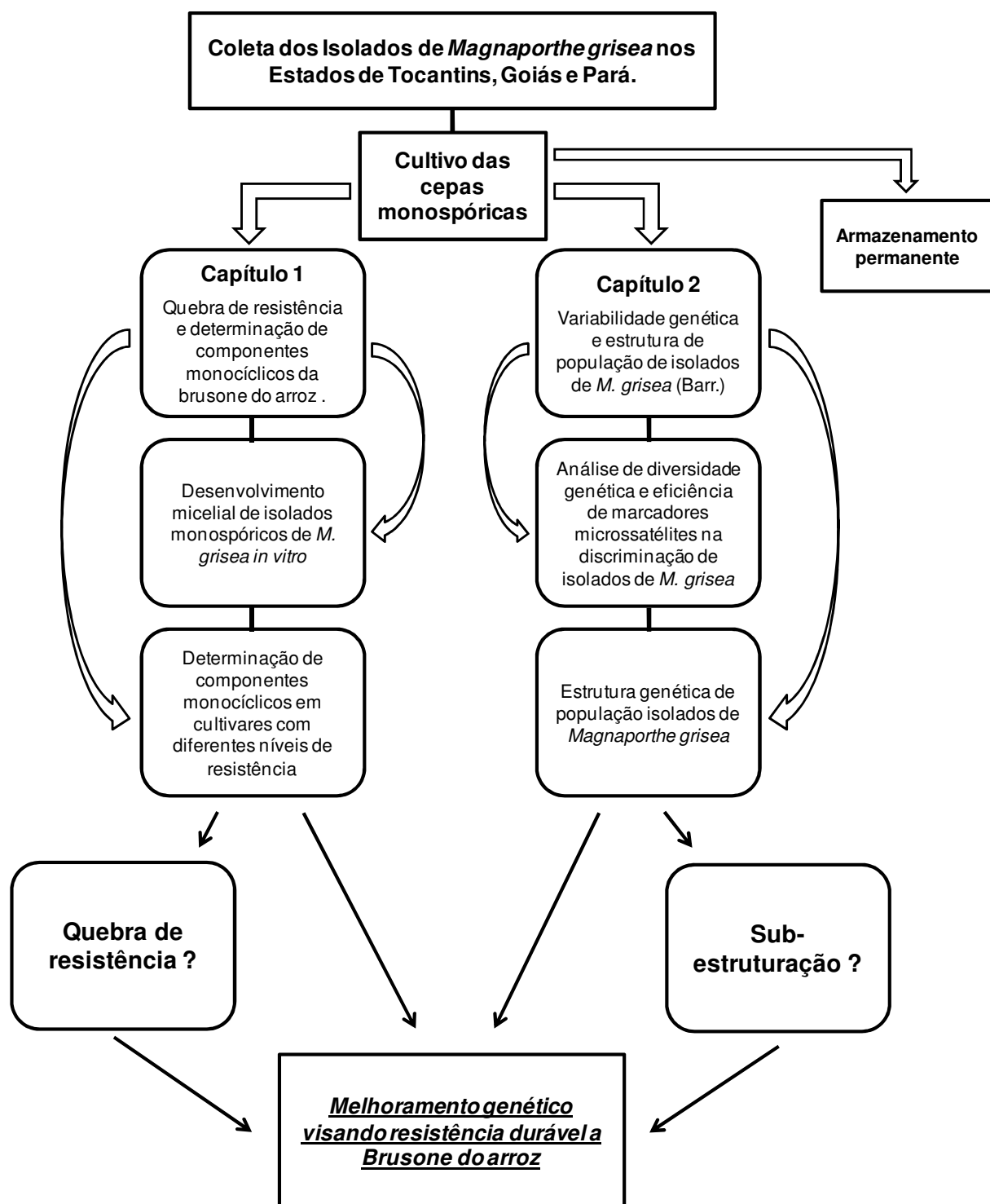
$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

onde,

F_{IT} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações, F_{IS} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional e F_{ST} = índice de fixação ou divergência genética entre populações.

Estudos sobre variabilidade do patógeno são necessários e de interesse para o melhoramento genético do arroz, orientando a seleção de linhagens com alto potencial produtivo e resistência durável a brusone. Observe-se que a resistência a brusone atualmente disponibilizada nas novas cultivares oferecidas aos produtores tem sido quebrada em pouco tempo. Nesse sentido, estudos da variabilidade do patógeno se fazem prioritários para as pesquisas com arroz, especialmente na região Centro-Norte do Brasil.

3 FLUXOGRAMA



4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Able, JA, Langridge, P, Milligan, AS (2007) Capturing diversity in the cereals: many options but little promiscuity. *Trends in Plant Science* 12(2):71-79.
- Alves KJP & Fernandes JMC (2006) Influência da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulação de *Magnaporthe grisea* em trigo. *Fitopatologia Brasileira* 31(6):579-584.
- Asuyama, H. 1963. Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *Piricularia oryzae*. In: Ou SH. *The Rice Blast Disease*. (Ed.) Baltimore MD John Hopkins Press. pp.9-22.
- Ballini E, Morel JB, Droc GT, Price A, Courtois B, Notteghem JL, Tharreau, D (2008) A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 21(7):859-68.
- Barker NP, Clark LG, Davis JE, Duvall MR, Guala GF, Hsiao C, Kellogg EA, Linder HP (2001) Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88(3):373-457.
- Barr ME (1977) *Magnaporthe*, *Telimenella* and *Hyponectria* (Physosporrellaceae). *Mycologia* 69:952-956
- Beaumont MA, Ibrahim KM, Boursot P (1998) Measuring genetic distance. In: Karpel, A. *et al.*, (Ed.) *Molecular tools of screening for biodiversity*. pp.315-325.
- Bedendo IP (1997) Doenças do arroz. In: KIMATI, H. *et al.* (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. São Paulo: Agronômica Ceres. pp.85-99.
- Bergamin Filho A, Kimati H, Amorin L (1995) *Manual de Fitopatologia*. Vol. 1: Princípios e Conceitos. 3ª ed. Agronômica Ceres, São Paulo-SP.
- Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH, Tharreau D (2003) Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the

Magnaporthe grisea avirulence gene ACE1. Theoretical and Applied Genetics 107(6):1139-1147.

Bononi VLR, Grandi RAP (1999) Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. São Paulo: Instituto Botânica.

Brondani RPV, Brondani C, Grattapaglia D (2002) Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. Molecular Genetics and Genomics 267(3):338-347.

Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, Mcadams S A, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. The Plant Cell 12:2033-2045.

Burgess T, Malajczuk N, Dell B (1995) Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. Mycological Research 99:1-13.

Cavara F (1891) Fungi Longobardiae exsiccati sive mycetum specimina in *Longobardia collecta*, exsiccata et speciebus novis vel criticis, iconibus illustrata. In: Padwick GW (Ed.) Pugillus I n° 49. pp. 18.

Chambers GK, Macavoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology 126(4):455-476.

Chaves MS, Martinelli JA, Federizzi LC (2004) Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: III - Correlação de componentes de resistência entre si e com a intensidade de doença no campo. Fitopatologia Brasileira 29(2):197-200.

Chen QH, Wang YC & Zheng XB (2006) Genetic analysis and molecular mapping of the avirulence gene PRE1, a gene for host-species specificity in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. Genome 49(8):873-881.

Chen QH, Wang YC, Li AN, Zhang ZG, Zheng XB (2007) Molecular mapping of two cultivar-specific avirulence genes in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Molecular Genetics and Genomics 277(2):139-148.

Chen S, Wang L, Que ZQ, Pan RQ, Pan QH (2005) Genetic and physical mapping of Pi37(t), a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St. No. 1. *Theoretical and Applied Genetics* 111(8):1563-1570.

Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Mccouch SR (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 95(4):553-567.

Conte R (2004) Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* (Mart.) submetidas a ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites. Tese de doutorado. São Paulo SP. Universidade de São Paulo.

Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93(5):504-509.

Das MK, Rajaram S, Kronstad WE, *et al.* (1992) Associations and genetics of three components of slow-rusting in leaf rust of wheat. *Euphytica* 68:99-109.

Dean RA (1997) Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 35:211-34.

Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeier C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434(7036):980-986.

Deng YW, Zhu XD, Shen Y, He ZH (2006) Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus Pigm(t) tightly linked to Pi2 and Pi9 in a broad-spectrum resistant Chinese variety. *Theoretical and Applied Genetics* 113(4):705-713.

Depeiges A, Goubely C, Lenoir A Cocherel, S Picard, G Raynal, M Grellet, F, Delseny M (1995) Identification of the most represented repeated motifs in arabidopsis-thaliana microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics* 91(1):160-168.

Dias Neto JJ (2008) Biologia e identificação de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* isolados de plantas de arroz cultivado na região central do Brasil. Dissertação de Mestrado. Campus Universitário de Gurupi, Gurupi-TO: Universidade Federal do Tocantins.

Dioh W, Tharreau D, Nottoghem JI, Orbach M, Lebrun MH (2000) Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. *Molecular Plant-microbe Interactions* 13(2):217-227.

EMBRAPA - Embrapa Clima Temperado (2005). Cultivo do arroz irrigado no Brasil: Sistemas de Produção. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz/autores.htm>> Acesso em: 08/01/2009.

FAO (2007). Faostat Database Results. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 05/01/2009.

Feng SJ, Wang L, Ma JH, Lin F, Pan QH (2007) Genetic and physical mapping of AvrPi7, a novel avirulence gene of *Magnaporthe oryzae* using physical position-ready markers. *Chinese Science Bulletin* 52(7):903-911.

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.

Fukuoka S, Okuno K (2001) QTL analysis and mapping of pi21, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Theoretical and Applied Genetics* 103(2-3):185-190.

Garrido LR (2001) 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*). Tese de Doutorado. Brasília, DF: Universidade de Brasília.

Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, Mccouch S (2005) Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169(3):1631-1638.

Glaszmann JC (1987) Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 74(1):21-30.

Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang RL, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchinson D, Martin C, Katagiri F, Lange B M, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J P, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S P, Colbert M, Sun W L, Chen L L, Cooper B, Park S, Wood T C, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y S, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller R M, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*). *Science* 296(5565):92-100.

Goldstein DB, Clark AG (1995) Microsatellite variation in north-american populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* 23(19):3882-3886.

Guimarães CL, Yokoyama LP (2003) Cultivo do Arroz de Terras Altas: Plantio. Sistemas de Produção, Embrapa Arroz e Feijão.

Hamer JE, Howard RJ, Chumley FG, Valent BA (1988) Mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239(4837):288-290.

Hearne CM, Ghosh, S, Todd JA (1992) Microsatellites for linkage analysis of genetic-traits. *Trends in Genetics* 8(8):288-294.

Hebert TT (1971) The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology* 61:83–87

Hoshino AA, Palmieri DA, Bravo JP, Pereira TEB, Lopes CR, Gimenes MA (2002) Marcador microssatélite na conservação do germoplasma vegetal. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 5(29):146-150.

Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(24):11281-11284.

Howard RJ, Valent B (1996) Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology* 50:491-512..

Hummel S, Schultes T (2000) From skeletons to fingerprints - STR typing of ancient DNA. *Ancient Biomolecules* 3:103-116.

IBGE (2009) Anuário Estatístico do Brasil

IRRI (2006) Bringing hope, improving lives: strategic plan, 2007-2015. Manila: IRRI. 2006.

Jacobs TH, Broers LHM (1989) The inheritance of host plant effect on latency period of wheat leaf rust in spring wheat. I: Estimation of gene action and number of effective factors in F1, F2 and backcross generations. *Euphytica* 44:197-206.

Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11(10):424-429.

Jeon J S, Chen D, Yi GH, Wang GL, Ronald, PC (2003) Genetic and physical mapping of Pi5(t), a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. *Molecular Genetics and Genomics* 269(.2):280-289.

Jeon J, Choi J, Park J, Lee YH (2008) Functional genomics in the rice blast fungus to unravel the fungal pathogenicity. *Journal of Zhejiang University-Science B* 9(10):747-752.

Johnson R, Wilcoxson RD (1979) Inheritance of slow rusting of barley infected with *Puccinia hordei* and selection of latent period and number of uredia. *Phytopathology* 69:145-151.

Jong JC, McCormack BJ, Smirnov N, Talbot NJ (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389(6648):244-244.

Kankanala, P.; Czymmek, K. & Valent, B (2007) Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* 19(2): 706-724.

Kato H, Yamaguchi T (1982) The perfect stage of *Pyricularia oryzae* from rice plants in culture. *Annual Phytopathology Society* 48:607-612.

Kato SHK, Hara S (1928) On the affinity of rice varieties as shown by the fertility of rice plants. *Central Agricultural Institute of Kyushu Imperial University* 2:241-276.

Kellogg, EA (1998) Relationships of cereal crops and other grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(5):2005-2010.

Khush GS Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology* 35(1):25-34.

Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (2001) Dictionary of the Fungi. 9 ed. CAB International,. 2001.

Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF (1998) Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(18):10774-10778.

Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing - a major mechanism for DNA-sequence evolution. Molecular Biology and Evolution 4(3):203-221.

Lin F, Chen S, Que Z, Wang L, Liu X, Pan Q (2007) The blast resistance gene Pi37 encodes a nucleotide binding site leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. Genetics 177(3):1871-80.

Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal of Human Genetics 44(3):397-401.

Liu XQ, Wang L, Chen S, Lin F, Pan QH (2005) Genetic and physical mapping of Pi36(t), a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. Molecular Genetics and Genomics 274(4):394-401.

Liu XQ, Yang QZ, Lin F, Hua LX, Wang CT, Wang L, Pan QH (2007) Identification and fine mapping of Pi39(t), a major gene conferring the broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae*. Molecular Genetics and Genomics 278(4):403-410.

Mackenzie DR (1980) The problem of variable pests. In: Maxwell FG, Jennings, PR. (Ed). Breeding plants resistant to insects. 183-213.

Matsuo T (1952) Genecological studies on cultivated rice. Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences 3:1-111.

McDonald BA, Lind C (2002) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. Euphytica, 124(2): 163-180.

- Mendgen H, Hahn M, Deising H (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 34:367-86.
- Menezes M, Oliveira SMA (1993) *Fungos Fitopatogênicos*. Recife: Imprensa Universitária, 1993.
- Milach SCK, Thomé GCH, Federizzi LC, *et al.* (1996) Characterization of partial resistance to oat crown rust through the area under the disease progress curve. In: V International oat conference & VII International Barley Genetics Symposium, 1996. Saskatoon, Canada. Proceedings... Saskatoon: University of Saskatchewan 2:752-754
- Money NP (1997) Mechanism linking cellular pigmentation and pathogenicity in rice blast disease. *Fungal Genetics and Biology* 22:151-152.
- Neervoort WJ, Parlevliet JE (1978) Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. V: Analysis of the components of partial resistance in eight barley cultivars. *Euphytica* 27:33-39.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*: Columbia University Press.
- Ou SH (1985) *Rice diseases*. Wallingford: CAB.
- Ou SH (1972) Studies on stable resistance to rice blast disease, In: *Rice breeding*, International Rice Research Institute, 227-237.
- Parlevliet JE (1993) What Is Durable Resistance, A General Outline. In: Jacobs TH, Parlevliet J.E. (eds.) *Durability of disease resistance*. Netherlands: Kluwer Academics pp. 23-39.
- Parlevliet JE, Lindhout WH, Van Ommeren A, *et al.* (1980) Level of partial resistance to leaf rust, *Puccinia hordei* in West-European barley and how to select for it. *Euphytica* 29:1-8.
- Pessoa Filho MACP (2008) Identificação de regiões genômicas associadas ao controle de tolerância à seca em variedades tradicionais de arroz de sequeiro (*Oryza sativa* spp. *japonica*). Tese de Doutorado. Brasília DF. Universidade de Brasília.

Peterson RF, Campbell AB, Hannah AE (1948) A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. Canadian Journal of Research Section 26:496-500.

Petit RJ, Deguilloux MF, Chat J, Grivet D, Garnier-Gere P, Vendramin GG (2005) Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity. Molecular Ecology 14(3):885-890.

POTAFOS. Doenças do arroz: Sintomatologia e controle. Arquivo do agrônomo N° 10 - setembro/95 Disponível em:

<[www.potafos.org/.../87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d5fbc829a2f54298832569f8004695c5/\\$FILE/Arroz18-22.pdf](http://www.potafos.org/.../87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d5fbc829a2f54298832569f8004695c5/$FILE/Arroz18-22.pdf)> Acesso em 09/12/2008.

Prabhu AS, Filippi MCC (2006) Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.

Qu SH, Liu GF, Zhou B, Bellizzi M, Zeng LR, Dai LY, Han B, Wang GL (2006) 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(3):1901-1914.

Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. Trends in Ecology & Evolution 8(8):285-&.

Reis EM, Fernandez JMC, Picinini EC (1988) Estratégias para o controle de doenças do trigo. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 7).

Ribeiro AS, Terres ALS (1987) Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae* e sua relação com cultivares resistentes à brusone. Pesquisa Agropecuária Brasileira 12:316-321.

Ribeiro AS (1985) Doenças. In: Fundação Cargill. Fundamentos para a cultura do arroz irrigado. Campinas.

Ribot C, Hirsch J, Balzergue S, Tharreau D, Notteghem JL, Lebrun MH, Morel JB (2008) Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Journal of Plant Physiology 165(1):114-124.

Roumen E (1996) Response to selection for high and low partial resistance to leaf blast in F2 populations of three rice crosses. Euphytica 89:243-248.

- Saccardo PA (1880) Fungorum extra-europaeorum Pugillus. *Michelia* 2:136–149.
- Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Ghesquiere A, Notteghem JL (2003) Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theoretical and Applied Genetics* 106(5):794-803.
- Sawada K (1917) Blast of rice plants and its relation to infective crops and weeds, with the description of five species of *Dactylaria*. Special Publication Tawan Agriculture Experimental Station. (16): 78 p.
- Schlotterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20(2):211-215.
- Sesma A, Osbourn, AE (2004) The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431(7008):582-586.
- Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056.
- Silué D, Notteghem JL, Tharreau D (1992) Evidence for a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* 82:577-580.
- Singh H, Rao MV (1989) Area under the disease progress curve: Its reliability as a measure of slow-rusting resistance. *Plant Breeding* 103:319-323.
- Singleton LL, Moore MB, Wilcoxson RD, *et al.* (1982) Evaluation of oat crown rust disease parameters and yield in moderately resistant cultivars. *Phytopathology* 72:568-540.
- Slatkin, M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139(1):457-462.
- Sweeney M, McCouch S (2007) The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany* 100(5):951-957.
- Tateoka T (1962) Taxonomic studies of *Oryza* I. *O. latifolia* complex. *The Botanical Magazine* 75:418-427.

- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences of a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463 – 6471.
- Teixeira H, Vieira MGGC, Machado JC (2004) Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. *Fitopatologia Brasileira* 29:651-655.
- Teng PS (1994) The epidemiological basis for blast management. In.:Zeigler RS, Leon SA, Teng PS (Eds). *Rice blast disease*. CAB International 409-433.
- Thomas KM (1940) Detailed administration report of the government mycologist, Madras for the year 1938-1940.
- Thome GCH, Milach SCK, Cruz RP, Federizzi LC (1999)Melhoramento para resistência parcial a moléstias fúngicas em cereais. *Ciencia Rural* 29(2):365-371.
- Toledo J, Escobar R (2002) *Pyricularia o bruzone del trigo*. CIAT. Santa Cruz, Bolívia. CIAT. 20p.
- Urban AF, Oliveira AS (1999) Caracterização morfológica em diferentes isolados de *Fusarium moniliforme* infectando sementes transgênicas de milho procedentes dos Estados Unidos. *Fitopatologia Brasileira* 24:339.
- Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1993) Allele frequencies at microsatellite loci - the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133(3):737-749.
- Valent B. (1990) Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*, 80:33-36.
- Vaughan DA, Morishima H, Kadowaki K (2003) Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology* 6(2):139-146.
- Vaughan DA. *et al.* (2005) On the phylogeny and biogeography of the genus *Oryza*. *Breeding Science* 55(2):113-122.
- Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999) The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant Journal* 19(1):55-64.

Weber JL (1990) Informativeness of human (DC-DA)N.(DG-DT)N polymorphisms. *Genomics* 7(4):524-530.

Weber JL, May, PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction. *American Journal of Human Genetics* 44(3):388-396.

Wright (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.

Yu J, Hu S N, Wang J, Wong GKS, Li SG, Liu B, Deng YJ, Dai L, Zhou Y, Zhang XQ, Cao M L, Liu J, Sun JD, Tang JB, Chen YJ, Huang XB, Lin W, Ye C, Tong W, Cong LJ, Geng JN, Han YJ, Li L, Li W, Hu GQ, Huang XG, Li WJ, Li J, Liu ZW, Liu JP, Qi QH, Liu JS, Li T, Wang XG, Lu H, Wu TT, Zhu M, Ni PX, Han H, Dong W, Ren XY, Feng XL, Cui P, Li XR, Wang H, Xu X, Zhai WX, Xu Z, Zhang JS, He SJ, Zhang JG, Xu JC, Zhang KL, Zheng XW, Dong JH, Zeng WY, Tao L, Ye J, Tan J, Ren XD, Chen X W, He J, Liu DF, Tian W, Tian CG, Xia HG, Bao QY, Li G, Gao H, Cao T, Zhao WM, Li P, Chen W, Wang XD, Zhang Y, Hu JF, Liu S, Yang J, Zhang GY, Xiong YQ, Li ZJ, Mao L, Zhou CS, Zhu Z, Chen RS, Hao BL, Zheng WM, Chen SY, Guo W, Li GJ, Liu SQ, Tao M, Zhu LH, Yuan LP, Yang HM (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *Science* 296(5565):79-92.

Zhang W, Clark LG (2000) Phylogeny and classification of the Bambusoideae (Poaceae). In: Jacobs SLW, Everett J. (Ed.). *Grasses: Systematics and Evolution*.

Zheng Y, Zhang G, Lin FC, Wang ZH, Jin GL, Yang L, Wang Y, Chen X, Xu ZH, Zhao XQ, Wang HK, Lu JP, Lu GD, Wu WR (2008) Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* 45(10):1340-1347.

CAPÍTULO 1: QUEBRA DE RESISTÊNCIA GENÉTICA E DETERMINAÇÃO DE COMPONENTES MONOCÍCLICOS DA BRUSONE DO ARROZ, CAUSADA POR *Magnaporthe grisea* (Barr.)

RESUMO

A brusone, causada por *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (anamorfo: *Pyricularia grisea* Sacc) é considerada uma das mais importantes doenças da cultura do arroz. Atualmente, uma das principais medidas de controle da brusone é o uso de cultivares com resistência vertical. Entretanto, este tipo de resistência, governada por um ou por poucos genes, pode ser facilmente quebrada por este patógeno, que caracteriza-se por uma elevada plasticidade genética quanto à virulência. Entretanto, a variabilidade genética dos isolados de *M. grisea* coletados no Brasil não foi ainda estudada em larga escala, especialmente no Centro-Norte do país. Objetivou-se com o presente trabalho verificar a ocorrência de isolados de *M. grisea*, coletados nos estados de TO, GO e PA, capazes de quebrar a resistência genética na cultivar Oryzica Llanos 5, padrão de resistência à doença, e verificar possíveis interações entre a virulência a esta cultivar e alguns parâmetros monocíclicos das epidemias de brusone. Para tanto, foram avaliados 35 isolados monospóricos de *M. grisea* obtidos nos municípios de Lagoa da Confusão, Dueré, Formoso do Araguaia (Tocantins), Luiz Alves do Araguaia (Goiás) e Paragominas (Pará). Objetivando-se a quantificação do desenvolvimento micelial dos isolados *in vitro*, calculou-se, a cada 3 dias, a área da colônia, a partir da qual obteve-se a área sob curva de crescimento micelial (ASCCM) para cada um dos isolados. Os parâmetros epidemiológicos (período de incubação, período de latência, severidade da doença e área sob a curva de progresso da doença – ASCPD), foram determinados em casa de vegetação, para todos os 35 isolados em três variedades de arroz (Caloro e Fanny – suscetíveis; Oryzica Llanos 5 – resistente). As plantas foram avaliadas a cada três dias através de análise visual baseada em uma escala de notas de sete classes (0, 1, 3, 4, 5, 7 e 9). No estudo *in vitro*, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) da ASCCM entre os isolados, independente do local de coleta. Nos experimentos de casa de vegetação, o período de incubação nas cultivares suscetíveis variou entre 1,00 dia (isolado F-2) e 5,75 dias (isolado LA-2) em ‘Caloro’; e entre 1,00 dia (isolado F-2) e 6,25 dias (isolado LA-2) em ‘Fanny’. Quando os isolados monospóricos foram inoculados na cultivar resistente Oryzica Llanos 5, observou-se que 34% dos isolados estudados apresentaram quebra de resistência (F-1, F-2, F-5, F-9, F-10, LC-1, LC-2, LC-4, D-2, P-2 e P-6). Os isolados que quebraram resistência apresentaram os menores períodos de incubação (ex. isolado D-1, 2,0 dias), enquanto que os isolados que não quebraram resistência apresentaram os maiores períodos de incubação (ex. isolado LA-2, 6,25 dias). Isolados que quebraram resistência apresentaram também o menor período de latência. Observou-se forte correlação positiva entre a severidade da doença aos 6, 9 e 12 DAI e a ASCPD e uma significativa correlação negativa entre período de incubação ou de latência e a ASCPD. As ASCPDs nas cultivares suscetíveis foram maiores que no padrão de resistência. É importante ressaltar a quebra de resistência genética da cultivar Oryzica Llanos 5, até o momento considerada como padrão de resistência, por isolados de *M. grisea* coletados no Centro-Norte do Brasil. Isto é um claro indicativo da alta diversidade genética do patógeno nesta região.

HOST RESISTANCE BREAKDOWN AND DETERMINATION OF MONOCYCLIC COMPONENTS OF RICE BLAST, CAUSED BY *Magnaporthe grisea* (Barr.)

ABSTRACT

Rice blast, caused by *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (anamorph *Pyricularia grisea* Sacc), is one of the most important rice diseases, and is managed mainly by a combination of fungicides and host vertical resistance. This type of resistance, however, is governed by one or few genes, and can be easily broken by this pathogen, which has been shown to be highly adaptable. In spite of this, the genetic variability of Brazilian *M. grisea* isolates has not been studied in large scale, especially in the Northern-Central region. This work aimed to verify the occurrence of isolates of *M. grisea* from the states of TO, GO and PA capable of breaking the resistance of cv. Oryzica Llanos 5, the standard of genetic resistance to rice blast, and to verify possible interactions between virulence and some monocyclic components of rice blast epidemics. Towards that end, thirty-five monosporic isolates of *M. grisea* from the counties of Lagoa da Confusão, Dueré, Formoso do Araguaia (State of Tocantins), Luiz Alves do Araguaia (State of Goiás) and Paragominas (State of Pará) were studied. Radial mycelial growth was determined *in vitro*, every third day, and the area under the curve of mycelial growth (AUCMG) of each isolate was compared. Epidemiological parameters (period of incubation, period of latency, disease severity and the area under disease progress curve – AUDPC) were estimated in the greenhouse, for each of the thirty-four isolates in three rice cultivars ('Caloro' and 'Fanny' – susceptible; 'Oryzica Llanos 5' – resistant). Plants were evaluated visually every third day, with the aid of a diagrammatic scale of seven classes (0, 1, 3, 4, 5, 7 and 9). In the *in vitro* study, the AUCMG was significantly different among isolates ($p \leq 0,05$) irrespective of geographical origin. Period of incubation in susceptible cultivars varied from 1.00 day (isolate F-2) to 5.75 days (isolate LA-2) on 'Caloro'; and between 1.00 day (isolate F-2) to 6.25 days (isolate LA-2) on 'Fanny'. When the monosporic isolates were inoculated on resistant cv. Oryzica Llanos 5, 34% broke its resistance (F-1, F-2, F-5, F-9, F-10, LC-1, LC-2, LC-4, D-2, P-2 e P-6). The isolates that broke Oryzica Llanos 5 resistance also had the shortest incubation periods (e.g. isolate D-1, 2.0 days), while the isolates that did not show resistance breakdown, generally had the longest incubation periods (e.g. isolate LA-2, 6.25 days). Isolates virulent on Oryzica Llanos also had the shortest latent periods. A significant and positive correlation was observed between disease severity at 6, 9 and 12 days after inoculation and the AUDPC, and a significant and negative correlation was generally observed between period of incubation or latent period and the AUDPC. The AUDPCs of susceptible cultivars were larger than in the resistant cultivar. The resistance breakdown of cv. Oryzica Llanos 5, so far the resistant standard, by isolates of *M. grisea* from the Brazilian Central-North region is reported here for the first time and is a clear indication of the high genetic diversity of the pathogen in this region, which therefore poses a great threat to rice production in Brazil.

1 INTRODUÇÃO

A brusone, causada pelo fungo de forma anamórfica *Pyricularia grisea* Sacc [teleomorfo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr], possui uma ampla gama de hospedeiros que causa doenças em mais de 50 espécies de gramíneas. Esta doença é considerada uma ameaça à segurança alimentar no mundo (Valent, 2004). É uma das mais importantes da cultura do arroz pela sua ampla distribuição geográfica e sua alta capacidade de causar danos em plantas (Nunes *et al.*, 2007), como redução na estatura, no número de perfilhos, no número de grãos por panícula e no peso de grãos (Bastiaans *et al.*, 1994). A brusone acarreta perdas na qualidade de grãos e decréscimo da produtividade em gramíneas (Rangel *et al.*, 1992) decorrentes da redução na taxa de fotossíntese e respiração (Bastiaans *et al.*, 1994). No Brasil, arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), triticale (X *Triticoecale* Wittmack), milheto (*Pennisetum glaucum*) e cevada (*Hordeum vulgare*), sofrem quedas significativas de produtividade devido ao ataque de *M. grisea* (Galbieri & Urashima, 2008; Alves. & Fernandes, 2006).

Atualmente, a principal medida de controle da brusone do arroz é o uso de cultivares com resistência vertical (Prabhu *et al.*, 1995). Entretanto, este tipo de resistência, governada por um ou por poucos genes, pode ser facilmente quebrada pelo patógeno (Van der Plank, 1963). Com o monocultivo de cultivares portadoras de resistência vertical em grandes áreas, a pressão de seleção sobre as populações de microrganismos fitopatogênicos aumenta substancialmente (Silva, 2008). Assim, ocorre o surgimento de novas raças fisiológicas, virulentas às cultivares anteriormente resistentes (Rangel, 2006).

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 patótipos do fungo de ocorrência rara. Ou (1980) afirma que a quebra freqüente da resistência nas cultivares comerciais é atribuída à alta variabilidade patogênica do fungo.

Prabhu & Filippi (2006) citam vários mecanismos responsáveis pela variabilidade genética de *M. grisea*, como heterocariose, recombinação parassexual, anormalidades em cromossomos (Giatong & Fredericksen, 1969) e aneuploidia (Row *et al.*, 1985). Essas anormalidades cromossômicas incluem deleções, translocações e rearranjos cromossômicos.

As cultivares Oryzica Llanos 5 e Fedearroz 50, lançadas comercialmente nos anos de 1989 e 1998, respectivamente, na Colômbia pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), são consideradas como portadoras de resistência durável ao patógeno. Por este motivo, vários autores, dentre eles, Levy *et al.* (1993), Zeigler *et al.* (1995), Seebold *et al.* (2000), Jia *et al.* (2003) e Lopez-Gerena (2006), vêm utilizando a cultivar Oryzica Llanos 5 como padrão de resistência à brusone do arroz.

Segundo Rangel (2006) e Santos *et al.* (2008), os programas de melhoramento genético de arroz não têm sido eficazes no desenvolvimento de cultivares com resistência estável a *P. grisea*. A quebra da resistência à brusone nas cultivares de arroz irrigado recentemente lançadas no Centro-Oeste e Norte do Brasil vem sendo verificada muito precocemente, geralmente após um a dois anos de cultivo. Alguns parâmetros epidemiológicos utilizados como referência para a quantificação de resistência varietal são a capacidade de colonização e adaptação do patógeno como período de latência, tamanho e número de lesões, produção de esporos, a severidade de infecção e o progresso da doença.

No patossistema arroz –*Magnaporthe grisea* ocorre especificidade gene-a-gene, explicada pela hipótese de Flor (1971). A especificidade está entre genes para resistência, considerada uma característica monogênica e dominante em arroz, e os genes de avirulência (*Avr*) em *M. grisea* (Kiyosowa, 1976, citado por Prabhu & Filippi, 2006). Quando a cultivar resistente (*R*) reconhece o produto elicitor do patógeno que possui o gene (*Avr*), a relação é incompatível. Sendo assim, a planta bloqueia a infecção do patógeno. A interação patógeno-hospedeiro na brusone do arroz é relativamente bem estudada, tendo sido sugerida como modelo para a fitopatologia (Valent, 1990).

Jia *et al.* (2000) demonstraram através de métodos moleculares que o gene *Avr-Pita* do patógeno corresponde ao gene de resistência *Pi-ta* do hospedeiro. Orbach *et al.*, (2000) clonaram o gene *Avr-Pita* e os locos de avirulência correspondentes nos mutantes de *Avr-Pita*. A análise dos mutantes *Avr-Pita* identificou a ocorrência de mutações pontuais, inserções ou deleções nas sequências do gene. Estas variações desativaram o gene de avirulência e evitaram seu reconhecimento pelo produto do gene de resistência *Pi-ta* da planta de arroz. Eles demonstraram que a instabilidade de *Avr-Pita* é devida à sua localização na região telomérica.

O presente trabalho teve por objetivo identificar isolados monospóricos de *M. grisea*, coletados em regiões Centro-Norte do Brasil, capazes de quebrar resistência genética na cultivar Oryzica Llanos 5, fonte de resistência durável, e estimar a influência da quebra de resistência em parâmetros epidemiológicos. Tais parâmetros são essenciais para o melhoramento genético do arroz, pois são raros os estudos sobre variabilidade epidemiológica de *M. grisea* no Brasil, especialmente na Região Centro-Norte brasileiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de determinação de parâmetros biológicos e epidemiológicos de isolados de *Magnaporthe grisea* coletados nos Estados do Tocantins, Goiás e Pará, foram conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), entre os meses de janeiro e dezembro do ano de 2008. Foram conduzidos experimentos em casa de vegetação climatizada e no Laboratório de Genética Vegetal.

2.1 Isolados monospóricos de *Manaporthe grisea*

Foram avaliados 35 isolados monospóricos de *M. grisea* que fazem parte de uma coleção micológica obtida nos anos agrícolas 2006/2007 e 2007/2008 em polos representativos de produção comercial de arroz irrigado e de sequeiro em diversas lavouras comerciais no Estado do Tocantins, nos Municípios de Lagoa da Confusão, Dueré, Formoso do Araguaia (Projeto Rio formoso), Luiz Alves do Araguaia no Estado de Goiás (projeto “Luiz Alves”) e em Paragominas no Estado do Pará. As plantas doentes foram provenientes de nove cultivares comerciais, sendo sete de arroz irrigado, Best 2000, Epagri 108, Epagri 109, Epagri 112, Epagri 114, KM 113 e Piracema, mais duas cultivares de arroz de terras altas, Curinga e Primavera (Tabela 1).

TABELA 1. Identificação dos 35 isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea* em seus respectivos municípios e cultivares onde foram coletados. UnB/Embrapa CENARGEN, Brasília, 2009.

Municípios									
Formoso, TO		Lagoa, TO		Dueré, TO		Luiz Alves, GO		Paragominas, PA	
Isol.	Cultivar	Isol.	Cultivar	Isol.	Cultivar	Isol.	Cultivar	Isol.	Cultivar
F-1	Epagri-114	LC-1	Epagri-109	D-1	Epagri-109	LA-1	Epagri-109	P-1	Primavera
F-1 B	Epagri-108	LC-2	Epagri-112	D-2	Epagri-112	LA-2	Epagri-109	P-2	Primavera
F-2	Epagri-108	LC-3	Best-2000	D-3	Epagri-112			P-3	Primavera
F-3	Epagri-108	LC-4	Best-2000	D-4	Curinga			P-4	Primavera
F-3 B	Epagri-108	LC-5	Best-2000	D-5	Epagri-109			P-5	Primavera
F-4	Epagri-112	LC-6	Km-117					P-6	Primavera
F-5	Epagri-109	LC-7	Epagri-109					P-7	Primavera
F-8	Diamante	LC-8	Best-2000					P-8	Primavera
F-9	Diamante							P-9	Primavera
F-10	Epagri-109								
F-11	Formoso								

Isol. = Isolados

2.2 Cultivo e armazenamento dos isolados

Os isolados de *M. grisea* chegaram ao laboratório através de cepas monospóricas em placas de Petri cultivadas em meio de cultura BDA (200 g de batata, 18 g de dextrose, 18 g de ágar e 1 L de água destilada), autoclavado (120 °C por 20 min) (Dias Neto, 2008). Posteriormente foram repicados (3 ou 4 placas por isolado) para novas placas de Petri contendo aproximadamente 50 mL de meio BDA e incubados em câmara de germinação tipo B.O.D durante 15 dias a 25 °C, na ausência de luz e umidade relativa entre 50 e 70 %. Objetivando o armazenamento por longo prazo, uma das placas de cada isolado monospóricico, após 15 dias de incubação, foi submetida a estresse físico onde a colônia micelial foi raspada com um bastão de aço estéril. Colocou-se, sobre o micélio, tiras de papel filtro estéreis com o intuito de induzir a esporulação entre as fibras do papel. Logo em seguida, os isolados foram acondicionados em

câmara de crescimento com temperatura ajustada para 25°C e as placas cobertas por um pano crepe para proteger o micélio de insetos e ácaros e sob luz fluorescente contínua por 48 horas para estimular esporulação abundante. Quando esporuladas, as tiras de papel filtro contendo conídios dos isolados monospóricos foram devidamente identificadas e armazenadas em tubos Falcon de 15 ml em temperatura de - 20 °C.

2.3 Desenvolvimento micelial de isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea* in vitro

Todos os 35 isolados monospóricos de *M. grisea* foram comparados quanto ao desenvolvimento micelial. As colônias foram obtidas através de repicagem de um disco de micélio de 8 mm de diâmetro por placa de Petri. Os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA (200 g de batata, 18 g de dextrose, 18 g de Ágar e 1 L de água destilada). Posteriormente, foram incubados em câmara de germinação tipo B.O.D durante 15 dias em temperatura de 25 °C, sem claridade e umidade relativa entre 50 e 70 % (Figura 3).

O ensaio foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com 4 repetições, sendo cada repetição constituída pela média aritmética de 3 parcelas, sendo cada parcela uma placa de Petri. As avaliações de desenvolvimento das colônias foram realizadas a cada 3 dias, sendo registrados os diâmetros longitudinal e transversal aos 3, 6, 9 e 12 dias de incubação medidos com paquímetro digital de fibra de carbono (EDA). A diferença da área radial pela área do disco de micélio inicial a cada 3 dias de incubação determinou a área da colônia em cada data de avaliação.

A partir destes dados foi calculada a área sob curva de crescimento micelial (ASCCM) para cada um dos tratamentos, através de integração trapezoidal, utilizando a equação:

$$ASCCM = \sum_{i=1}^n ([Y_{i+1} + Y_i] \times 0,5) [T_{i+1} - T_i]$$

Onde: Y_i = área radial de crescimento micelial na i -ésima observação, T_i = tempo (em dias) no momento da i -ésima observação e n = número total de observações (Shaner & Finney, 1977), adaptado para crescimento micelial.

2.4 Determinação de componentes monocíclicos em cultivares com diferentes níveis de resistência

Ensaio visando quantificar os parâmetros epidemiológicos Área Sob a Curva de Progresso da Doença (ASCPD), Período de Incubação e Latência (dias), Progresso Temporal da Brusone, e possível quebra de resistência genética em cultivar resistente à brusone do arroz (*Oryzica Llanos 5*), foram realizados entre os meses de setembro e dezembro de 2008.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados em fatorial (34x3), com 4 repetições, onde foram inoculados 35 isolados (fator A) em 3 variedades de arroz (fator B), sendo cada repetição uma bandeja contendo 3 variedades de arroz inoculadas com 1 isolado monospórico de *M. grisea*.

2.4.1 Semeadura das cultivares

Foram semeadas em bandejas plásticas, com dimensões de 30,5 x 20,5 x 6 cm, 3 cultivares de arroz sendo 2 suscetíveis (Caloro e Fanny) e 1 resistente à brusone (*Oryzica Llanos 5*), utilizando-se 12 sementes por linha. Foram utilizados para o plantio 2,2 litros de substrato comercial PLANTMAX®, autoclavado a 120°C por 30 minutos antes do plantio. As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada com temperatura ajustada para 25°C para crescimento das plântulas até o momento da inoculação, aos 25 dias. Não foi realizada adubação de plantio, pois o substrato utilizado apresentou teores adequados de nutrientes (Tabela 2), mostrando-se suficiente para manutenção dos processos fisiológicos das plantas sem o aparecimento de sintomas de deficiência nutricional. Aos quinze dias após a emergência foi realizada adubação de cobertura com 2g de Uréia (45% de Nitrogênio) por bandeja com a finalidade de predispor as plântulas à infecção de *M. grisea*. Este processo ocorreu de forma que a fonte de Nitrogênio granulada foi solubilizada e as bandejas foram irrigadas, favorecendo a distribuição nas plantas, sem contato com as folhas.

TABELA 2. Composição química do substrato de plantio PLANTMAX ® utilizado nos ensaios de determinação de componentes monocíclicos.

Ca	Mg	Al	H+Al	T (pH7)	t	SB	K	P	M.O.	pH
Cmol/dm ³					ppm			V %	CaCl ₂	
16,4	10,1	0,24	10,1	38,4	28,5	28,3	709,5	362	10,7	5,2

Ca=Cálcio trocável, Mg=Magnésio trocável, Al=Acidez trocável, H+Al= acidez potencial, T=Complexo de troca catiônica , t=Complexo de troca catiônica efetiva, SB=Soma de bases, K=Potássio, P=Fósforo, M.O.=Matéria orgânica e pH=Acidez ativa.

2.4.3 Produção de inóculo/inoculação

A multiplicação do inóculo se deu simultaneamente ao desenvolvimento das cultivares. Cada um dos isolados foi repicado sob condição asséptica para placas de Petri contendo meio BDA com o auxílio de um furador de 8 mm de diâmetro. Aos doze dias, os isolados monospóricos foram submetidos a estresse físico onde a colônia micelial foi raspada com um bastão de aço estéril. Em seguida, os isolados foram novamente acondicionados em câmara de crescimento com temperatura ajustada para 25°C e as placas cobertas por um pano crepe e sob luz fluorescente contínua por 48 horas para estimular esporulação abundante.

Após a esporulação, cada placa contendo o isolado monospórico foi lavada com 20 ml de água destilada estéril e foi realizada raspagem com o auxílio de um pincel de cerdas macias para desprendimento dos conídios. Após a lavagem, a solução foi filtrada em gaze e a concentração de conídios foi estimada em câmara de Neubauer. Para inoculação, a suspensão conidial foi ajustada para 3×10^5 conídios.ml⁻¹. Foram inoculados 20 ml da solução em cada bandeja através de pulverizador manual, sendo distribuídos de maneira homogênea entre todas as plantas 21 dias após a semeadura quando as plantas apresentaram cerca de 25 cm de altura.

Imediatamente após a inoculação, as bandejas foram acondicionadas em câmara úmida, com umidade relativa elevada a 95% proporcionada por umidificador em ambiente fechado e sem luminosidade. Após 24 horas, as bandejas foram retiradas da câmara úmida, permanecendo na casa de vegetação durante 12 dias para as avaliações.

2.4.4 Avaliações Epidemiológicas

O período de incubação e o de latência foi determinado por observações diárias (entre às 12 e 14 h). O período de incubação refere-se ao período entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas visíveis da interação patógeno-hospedeiro. O período de latência refere-se ao período de tempo decorrido desde a inoculação das plantas (contato entre patógeno e hospedeiro) até que as primeiras lesões rompam a epiderme expondo as estruturas reprodutivas do patógeno. Para estudo de progresso temporal da doença, a cada 3 dias, as plantas foram avaliadas através de análise visual das classes de desenvolvimento da brusone, aos 3, 6, 9 e 12 dias após inoculação, totalizando dezesseis avaliações, sendo 4 repetições e 4 avaliações por repetição. Cada linha contendo uma cultivar recebeu nota média de acordo com a escala de notas de seis graus proposta por Leung *et al.* (1988), modificada pela adição da nota 4 de uma escala padronizada de 1 a 9 do *Standard Evaluation System for Rice* (IRRI, 1988), (0, 1, 3, “4”, 5, 7 e 9) (Figura 5). A escala de sete graus utilizada permite diferenciar com clareza os tipos de infecção, sendo:

- 0 - Ausência total de lesões;
- 1 - Pequenas lesões do tipo cabeça de alfinete de cor marrom e que não se desenvolvem;
- 3 - Lesões pequenas, em sua maioria pouco alongadas, com pouco ou nenhuma esporulação;
- 4 - Poucas lesões típicas e esporulativas, com centro cinza caracterizado por algumas lesões abertas;
- 5 - Muitas lesões típicas e altamente esporulativas que podem estar isoladas ou coalescentes;
- 7- Lesões coalescentes e com mais de 50% da área foliar afetada;
- 9 - Muitas lesões que coalescem, causando murcha e morte das folhas.

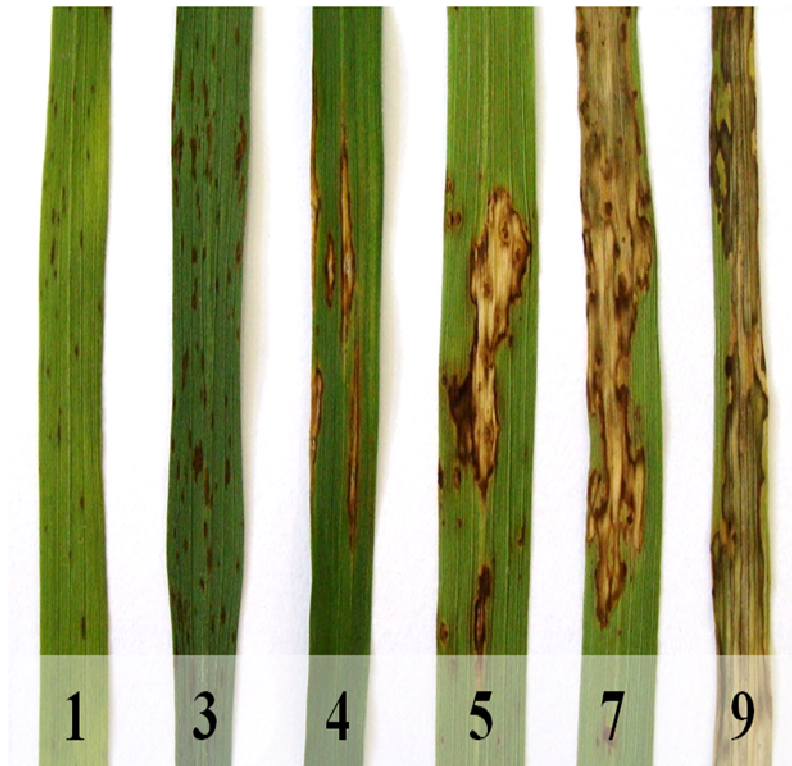


FIGURA 5. Escala de notas usada na análise do fenótipo da interação entre isolados de *M. grisea* e plantas de arroz. As notas 1 e 3 são dadas para reações de resistência e as notas 4, 5, 7 e 9 para reações crescentes de susceptibilidade entre o patógeno e o hospedeiro.

A reação da planta foi considerada como resistente (R) quando recebeu nota de severidade menor ou igual a 3 e suscetível (S) quando a nota foi igual ou superior a 4.

A partir destes dados foi calculada a ASCPD para cada um dos tratamentos, através de integração trapezoidal, utilizando a equação:

$$ASCPD = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i) \times 0,5] [T_{i+1} - T_i]$$

Onde: Y_i = nota de brusone nas folhas na i -ésima observação, T_i = tempo (em dias) no momento da i -ésima observação e n = número total de observações (Shaner & Finney, 1977). A curva de progresso da doença (r) também foi estimada através dos dados de severidade ao longo

do tempo, sendo r = nota de brusone foliar/dia. A severidade observada foi aquela observada no momento da última avaliação realizada.

2.5 Análises estatísticas

Os dados de crescimento micelial em placas de Petri, período de incubação e de latência, severidade de brusone nas folhas e área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000), e as estimativas da correlação foram obtidas através do programa ASSISTAT (Silva, 1999). As variações entre os tratamentos foram comparadas através do teste de Scott & Knott (1974) ao nível de 5% de probabilidade. Para as variáveis quantificadas, foram estimadas as correlações e suas significâncias avaliadas pelo teste T.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento micelial de isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea* *in vitro*

Os 35 isolados monospóricos de *M. grisea* oriundos dos Estados do Tocantins, Goiás e Pará, apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no desenvolvimento micelial *in vitro*. A ANOVA indica diferença significativa tanto para o crescimento micelial inicial (aos 3 dias após a repicagem - DAR), quanto para o intermediário (6 DAR e 9 DAR), final (12 DAR) e ASCCM (Tabela 4). A análise de crescimento micelial *in vitro* indicou que os isolados foram separados em 3 grupos de acordo com a ASCCM, um de lento crescimento *in vitro* (D-2, LC-5 e D-1), outro de médio crescimento micelial (PA-5, PA-3, D-2, PA-2, F-9, F1-B, F-11, D-3, F-10, F-1 e LA-1) e outro de rápido crescimento *in vitro* (PA-4, LC-4, F-4, F-8, F-2, F-5, LC-8, PA-7, PA-6, LC-1, LC-3, PA-1, F-3, PA-9, F-3B, D-4, LC-7, LC-6, PA-8, LA-2 e D-5). A origem geográfica dos isolados não foi correlacionada com seu crescimento micelial, pois isolados de regiões diferentes distribuíram-se em todos os grupos. Tanto aos 12 DAR, quanto na ASCCM, os isolados LC-5, D-1 e D-2 obtiveram as menores médias de crescimento micelial. Já o isolado LA-2, em todas as avaliações, esteve entre os 3 isolados que apresentaram maior crescimento, refletindo diretamente na ASCCM.

Para efeito de tratamento controle, os isolados F-1 e F-3, repicados da cultura monospórica original, foram comparados com os isolados (F-1 B e F-3 B), sendo estes os mesmos genótipos, porém com 3 repicagens sucessivas *in vitro*. Observou-se que, em algumas épocas de avaliação, houve diferença significativa do crescimento micelial entre os mesmos genótipos quando o número de repicagens foi diferente. Aos 3 DAR, os isolados F-1 B e F-3 B, obtiveram letra (a) no teste de médias Scott & Knott (1974), já os isolados F-1 e F-3, obtiveram letra (b) no teste de médias Scott & Knott (1974), portanto diferentes estatisticamente pelo teste F (Tabela 3).

Após o estresse ao qual foram submetidas às culturas monospóricas, com o objetivo de induzir esporulação para posterior inoculação em plantas, detectou-se que, tanto em placas de Petri referentes ao mesmo isolado quanto a isolados distintos, houve grande diferença na produção conidial. Os dados de crescimento micelial *in vitro*, inicial (3 DAR), intermediário (6 e 9 DAR) e final (12 DAR), assim como a observação de variabilidade na produção de conídios são indicativos de elevada variabilidade entre os isolados estudados, o que sugere elevada variabilidade das populações do Centro-Norte do Brasil.

Os aspectos morfológicos e culturais do patógeno em estudo são importantes. Repicagens excessivas podem provocar alterações fisiológicas, bioquímicas, genéticas e estruturais em fases de desenvolvimento tanto do patógeno quanto da doença causada por ele. Dias Neto (2008) verificou influência negativa do número de repicagens na produção de conídios de *M. grisea*. Diversos autores também detectaram problemas, como perda da viabilidade, mudanças fisiológicas e morfológicas, decréscimo e/ou perda da capacidade de esporulação, declínio e perda da patogenicidade (Bueno *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2006; Vechiato *et al.*, 2003; Ignoffo *et al.*, 1982). Camargo Junior (2004), trabalhando com *Glomerella cingulata*, verificou que a produção de peritécios em grandes aglomerados só aconteceu nas primeiras placas isoladas. Segundo o autor, após repicagens sucessivas do isolamento inicial, o fungo foi perdendo a capacidade de formação de estruturas reprodutivas tanto para os parentais como para as culturas monospóricas.

TABELA 3. Crescimento micelial (mm) aos 3, 6, 9 e 12 dias após a repicagem (DAR) em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e área sob a curva de crescimento micelial (ASCCM) de isolados monospóricos de *M. grisea*, coletados nos estados do Tocantins, Goiás e Pará. UnB/Embrapa CENARGEN, Brasília, 2009.

3 DAR*		6 DAR*		9 DAR*		12 DAR*		ASCCM	
Isolado	Área (mm ²)	Isolado	Área (mm ²)	Isolado	Área (mm ²)	Isolado	Área (mm ²)	Isolado	u.a.
D-2	189,7 a	D-1	720,3 a	LC-2	1949,4 a	LC-5	2877,5 a	D-1	13629,0 a
D-1	189,9 a	D-2	760,2 a	LC-5	2026,7 a	D-2	3162,8 a	LC-5	14028,3 a
F-1B	191,9 a	LC-5	857,9 a	D-1	2042,0 a	D-1	3181,3 a	D-2	14601,3 a
PA-2	207,2 a	LC-4	905,4 a	PA-5	2306,8 b	F-11	3730,6 b	LC-2	16394,6 b
D-3	212,5 a	F-9	938,93 a	PA-3	2331,7 b	F-4	3791,4 b	F-9	16543,7 b
F-3 B	224,0 a	PA-5	997,29 b	D-2	2335,4 b	F-9	3810,3 b	PA-3	16713,1 b
PA-3	227,8 a	F-1B	1030,8 b	PA-2	2406,2 b	IC-1	3834,9 b	PA-5	16744,5 b
PA-4	235,0 a	F-10	1040,6 b	F-9	2427,3 b	LA-1	3836,5 b	PA-2	16961,8 b
LC-4	237,6 a	D-3	1054,3 b	F-1B	2432,2 b	PA-5	3864,0 b	F-1B	17070,6 b
F-10	239,9 a	F-1	1056,9 b	F-11	2471,7 b	PA-3	3864,1 b	LC-4	17185,0 b
F-9	243,1 a	PA-2	1077,0 b	D-3	2473,5 b	LC-3	3923,8 b	D-3	17296,9 b
LC-8	270,0 a	PA-3	1079,3 b	F-10	2483,6 b	PA-2	3926,9 b	F-10	17304,2 b
F-2	272,1 a	D-4	1101,9 b	F-1	2514,3 b	F-2	3971,8 b	F-11	17612,3 b
PA-6	277,4 a	LA-1	1112,8 b	LA-1	2539,4 b	LC-4	3974,0 b	F-1	17642,5 b
F-8	285,0 b	LC-2	1116,5 b	PA-4	2577,3 c	F-1	3983,8 b	LA-1	17671,0 b
PA-1	286,7 b	F-8	1117,0 b	LC-4	2598,1 c	F-10	4007,8 b	F-2	18086,8 c
LC-7	290,1 b	F-2	1141,6 b	F-4	2598,4 c	LC-2	4043,0 b	F-8	18119,4 c
LC-6	295,1 b	PA-4	1196,4 c	F-8	2604,3 c	D-3	4050,6 b	F-4	18197,9 c
PA-9	309,1 b	PA-7	1201,1 c	F-2	2629,1 c	F-8	4066,5 b	PA-4	18292,8 c
PA-8	311,4 b	LC-8	1208,6 c	F-5	2638,8 c	F-1B	4070,3 b	PA-7	18711,6 c
PA-7	314,0 b	F-11	1211,6 c	LC-8	2648,1 c	D-4	4120,6 b	LC-3	18746,3 c
F-4	315,5 b	F-3	1214,4 c	PA-7	2650,0 c	F-3 B	4127,4 b	LC-1	18763,6 c
F-1	317,6 b	PA-9	1227,2 c	PA-6	2654,8 c	PA-1	4139,0 b	LC-8	18768,8 c
D-4	318,6 b	F-3 B	1248,3 c	LC-1	2669,4 c	PA-7	4143,1 b	D-4	19064,2 c
LA-1	319,7 b	LC-3	1248,7 c	LC-3	2679,2 c	PA-4	4177,5 b	F-3 B	19075,2 c
F-11	322,0 b	F-4	1256,2 c	PA-1	2721,1 c	F-3	4193,7 b	PA-6	19125,7 c
F-3	334,6 b	PA-6	1266,4 c	F-3	2774,4 c	D-5	4231,4 b	PA-1	19206,4 c
PA-5	345,3 b	LC-1	1271,2 c	PA-9	2806,9 c	PA-9	4237,1 b	F-3	19261,4 c
LC-5	352,6 b	LC-6	1285,9 c	F-3 B	2822,2 c	LC-8	4258,9 b	PA-9	19385,8 c
D-5	354,1 b	PA-1	1324,7 c	D-4	2873,8 c	PA-8	4316,9 b	F-5	19858,4 c
LC-3	358,9 b	PA-8	1348,8 c	LC-7	2948,7 c	LC-7	4330,3 b	LC-6	20268,0 c

LC-2	377,3 b	LC-7	1390,3 c	LC-6	2983,6 c	PA-6	4352,9 b	LC-7	20383,1 c
LA-2	384,1 b	F-5	1390,7 c	PA-8	3029,0 c	LC-6	4382,7 b	PA-8	20543,4 c
F-5	386,0 b	D-5	1416,4 c	LA-2	3064,7 c	F-5	4407,8 b	D-5	21081,8 c
LC-1	396,4 b	LA-2	1488,3 c	D-5	3140,9 c	LA-2	4479,3 b	LA-2	21530,6 c
Médias	291,2		1.151,5		2.594,2		3.996,3		18.110,6
C.V. (%)	21,9		13,6		12,2		8,8		9,5

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott & Knott (1974).

Ignoffo *et al*, (1982) atribuiu à perda da capacidade esporulativa e infectiva de fungos entomopatogênicos a repicagens sucessivas em meio de cultura. Vechiato *et al*, (2003), estudando *Diaporthe* spp, e *Diaporthe phaseolorum*, causador de queima da haste e da vagem e o cancro da haste da soja, respectivamente, atribuíram baixa virulência à perda de patogenicidade devido ao procedimento de repicagens sucessivas durante o período de manutenção do fungo em tubos contendo meio de BDA.

Embora os resultados destes estudos devam ser analisados com cautela, pois não foi realizada a homogeneização dos tratamentos (isolados monospóricos) em relação à quantidade de repicagens das culturas monospóricas originais, as evidências aqui coletadas demonstram variações no crescimento micelial indicativas de variabilidade genética entre os isolados.

3.2 Determinação de componentes monocíclicos em cultivares com diferentes níveis de resistência

Quando os isolados monospóricos foram inoculados com suspensão conidial ajustada para $3,10^5, \text{ml}^{-1}$ nas cultivares Caloro e Fanny, suscetíveis a brusone do arroz, todos se apresentaram virulentos (causaram doença), porém com níveis de agressividade diferentes, demonstrados por meio da análise de variância ($p \leq 0,05$), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott & Knott (Tabela 5). Todos os isolados foram patogênicos também na cultivar Oryzica Llanos 5, padrão de resistência durável e também separaram-se quanto à virulência e agressividade (*sensu* Andrivon, 1993) (algumas reações não foram compatíveis, portanto os isolados foram avirulentos e o hospedeiro resistente) ($p \leq 0,05$, Tabela 5).

3.2.1 Período de Incubação e Latência

Observaram-se diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na interação cultivar x isolado quanto ao período de incubação, o que indica que a virulência dos isolados variou de acordo com a cultivar em que foi inoculado. As cultivares controle (Caloro e Fanny) foram suscetíveis a todos os isolados testados. O período de incubação nas cultivares suscetíveis variou entre 1,00 dia (isolado F-2) e 5,75 dias (isolado LA-2) na cultivar Caloro; e entre 1,00 dia (isolado F-2) e 6,25 dias (isolado LA-2) na cultivar Fanny. A cultivar Oryzica Llanos 5 foi resistente à maior parte dos isolados, mas apresentou-se suscetível (quebra de resistência) a parte do isolados de *M. grisea* utilizados no estudo. Quando os isolados monospóricos foram inoculados na cultivar Oryzica Llanos 5, o isolado D-1 apresentou o menor período de incubação (2 dias) e o isolado LA-2 apresentou o maior período de incubação (6,25 dias) (Tabela 4).

TABELA 4, Período de Incubação (dias) de isolados monospóricos de *Magnaporthe griseae*, coletados nos estados do Tocantins, Goiás e Pará, UnB. Brasília, 2009.

Variedade Caloro*		Variedade Fanny*		Variedade Oryzica Llanos 5*	
Isolado	Incubação (dias)	Isolado	Incubação (dias)	Isolado	Incubação (dias)
F-2	1,00 a	F-2	1,00 a	D-1	2,00 a
LC-5	2,00 b	D-1	2,00 b	LC-4	3,00 b
D-4	2,70 c	F-5	2,75 c	D-2	3,00 b
F-1	2,50 c	F-9	2,75 c	LC-5	3,00 b
D-2	3,00 c	LC-1	3,00 c	D-3	3,00 b
F-5	3,00 c	LC-5	3,00 c	LC-2	3,00 b
LC-1	3,00 c	D-4	3,00 c	F-2	3,00 b
D-3	3,00 c	LC-2	3,00 c	F-1B	3,50 c
D-1	3,00 c	F-1	3,00 c	F-9	3,75 c
F-3	3,00 c	PA-2	3,00 c	LC-8	3,75 c
LC-2	3,00 c	PA-6	3,00 c	PA-8	3,75 c
LC-4	3,00 c	F-3	3,00 c	PA-9	3,75 c
F-1B	3,25 c	LC-4	3,00 c	PA-7	3,75 c
PA-9	3,25 c	D-2	3,00 c	LC-7	3,75 c
PA-8	3,25 c	LC-7	3,00 c	D-4	3,75 c

F-9	3,25 c	PA-5	3,25 c	F-4	4,00 c
PA-5	3,25 c	PA-8	3,25 c	LC-1	4,00 c
LC-6	3,25 c	F-3B	3,25 c	F-1	4,00 c
PA-4	3,25 c	LC-6	3,25 c	PA-5	4,75 d
F-3B	3,25 c	F-1B	3,25 c	F-3B	5,00 d
LC-7	3,50 c	PA-4	3,25 c	F-3	5,00 d
LA-1	3,50 c	PA-7	3,25 c	PA-3	5,00 d
PA-2	3,50 c	LC-8	3,50 d	F-8	5,00 d
PA-7	3,50 c	F-8	3,50 d	PA-1	5,00 d
PA-6	3,75 d	LA-1	3,50 d	PA-2	5,50 e
LC-8	3,75 d	PA-9	3,50 d	PA-6	5,50 e
PA-1	3,75 d	F-10	3,50 d	F-10	5,75 e
F-8	3,75 d	PA-1	3,75 e	LA-1	6,00 e
F-10	3,75 d	PA-3	4,00 e	PA-4	6,00 e
PA-3	4,00 d	F-4	4,00 e	D-5	6,00 e
F-4	4,00 d	F-10	4,00 e	LC-6	6,00 e
F-10	4,00 d	LC-3	4,00 e	F-5	6,00 e
LC-3	4,00 d	D-5	5,50 f	F-10	6,00 e
D-5	5,00 e	D-3	5,75 f	LC-3	6,00 e
LA-2	5,50 f	LA-2	6,25 g	LA-2	6,25 e
Média	3,37		3,40		4,47
C.V.(%)	10,32		10,32		10,32

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott & Knott (1974).

A cultivar *Oryzica* Llanos 5 apresentou lesões quando inoculada com todos os isolados testados,, muito embora os maiores períodos de incubação e latência, em média, tenham significado epidemiológico e provavelmente levam a menor severidade no campo. Entretanto, foi necessário um dia a mais para os isolados atingirem o período de incubação em comparação as cultivares suscetíveis (Tabela 4). O isolado F-2, especificamente quando inoculadoem *Oryza* Llanos 5, completou o período de incubação apenas aos 3 dias, sendo que, nas cultivares suscetíveis (Caloro e Fanny), um dia após a inoculação já causou sintomas de brusone nas folhas, concluindo o período de incubação.

Silva *et al.*, (2001), estudando o fungo *Uromyces appendiculatus*, causador da ferrugem do feijoeiro, também observaram diferenças no período de incubação de acordo com o nível de resistência da cultivar. Segundo os autores, nas cultivares suscetíveis observaram-se períodos de incubação mais curtos que as moderadamente resistentes.

Prabhu & Fillipi (2001), estudando graus de resistência a brusone em cultivares de arroz de terras altas, também observaram diferentes comportamentos entre as cultivares quanto a resistência. Segundo os autores, o grau de resistência das cultivares possivelmente seja dependente da frequência de isolados virulentos no campo. A obtenção de resistência durável a patógenos em cereais é dificultada pelo elevado número de raças virulentas dos mesmos. Este problema se agrava especialmente em espécies autógamas, geralmente cultivadas em vastas áreas como cultivares geneticamente uniformes, o que proporciona o surgimento e multiplicação de novas raças virulentas do patógeno (Thomé, 1999). Dias Neto (2008) relatou a ocorrência de mais de 50 raças fisiológicas de *M. grisea* na região Norte através de inoculações em cultivares diferenciadoras.

Quanto ao período de latência, 12 dos 35 isolados monospóricos em estudo, (F-1, F-2, F-5, F-9, F-10, LC-1, LC-2, LC-4, D-2, P-2 e P-6) apresentaram lesões esporulativas, correspondente às notas igual ou maiores que 4 da escala utilizada (Tabela 5). Essa reação indica quebra de resistência e a possibilidade de múltiplos ciclos no campo, pois lesões esporulativas permitem a geração de lesões subseqüentes através da formação de conídios. Além disso, verificou-se que os 11 isolados apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre si quanto ao período de latência, variando de 6,0 a 11,75 dias. O isolado F-2, além do menor período de incubação e de latência na variedade Oryzica Llanos 5, apresentou alto nível de agressividade, resultante do menor período de latência em todas as cultivares estudadas, independentemente do nível de resistência das mesmas. Após 2 dias, causou lesões esporulativas nas cultivares Caloro e Fanny. Quando inoculado na cultivar Oryzica Llanos 5, concluiu o período de latência em apenas 6 dias (Tabela 6). Os demais isolados que quebraram resistência da cultivar Oryzica Llanos 5 apresentaram período de latência entre 6 e 11,75 dias.

Em trabalho realizado com a ferrugem do feijoeiro, Silva *et al.*, (2001) também evidenciaram que o período de latência foi mais longo nas cultivares moderadamente resistentes do que nas cultivares suscetíveis. Segundo Shaner & Hess (1978), períodos de latência mais prolongados, lesões menores e menor produção de esporos são componentes que atrasam ou

reduzem a magnitude de vários estágios do ciclo reprodutivo do patógeno, tornando mais lento o progresso da doença em campo. Vários estudos mostraram a alta correlação destes componentes com a resistência parcial a doenças fúngicas em cereais (Ohm & Shaner, 1976; Andres & Wilcoxson, 1986).

Os resultados obtidos no presente estudo seguem a tendência tradicionalmente já proposta por diversos autores, incluindo Ohm & Shaner (1976), Szejmberg & Whal (1976), Parlevliet (1979) e Whal *et al.*, (1980), que relacionam a baixa frequência de infecção, período latente longo e baixa produção de esporos a cultivares com maior nível de resistência. Foi o que se observou na interação de Oryzica Llanos 5 e isolados de *M. grisea* da região Centro-Norte. Segundo Chaves *et al.*, (2004), no patossistema aveia/ferrugem, o período de latência foi um dos componentes de resistência que apresentaram maior correlação negativa com a intensidade de doença no campo. Tais valores apresentaram consistência ao longo dos 3 anos de avaliação. Assim, sugerem que o período de latência pode ter uma forte influência sobre a expressão da resistência quantitativa em campo.

O patossistema arroz/brusone segue o modelo anti-horário de infecção proposto por Bergamim Filho (1995) promovendo, além de novas lesões nas folhas, o aumento das lesões iniciais. Quando alterado o período de incubação e latência, os níveis de danos causados são amenizados de acordo com o aumento do tempo destas variáveis.

Para brusone, o período de latência também pode ser influenciado pelas variações climáticas. Em ecossistemas temperados, a epidemia de brusone pode ter de 7 a 8 ciclos por estação ou ano, enquanto que nas regiões tropicais podem ocorrer de 10 a 15 ciclos por estação de cultivo (Garrido, 2001).

TABELA 5. Período de latência (dias) de isolados monospóricos de *Magnaporthe griseae*, coletados nos estados do Tocantins, Goiás e Pará, UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

Variedade Caloro*		Variedade Fanny*		Variedade Oryzica Llanos 5**	
Isolado	Latência (dias)	Isolado	Latência (dias)	Isolado	Latência (dias)
F-2	2,00 a	F-2	2,00 a	LC-3	NFC
PA-6	5,00 b	PA-8	5,00 b	PA-7	NFC
PA-7	5,25 b	PA-6	5,00 b	PA-9	NFC
LC-3	5,25 b	LC-3	5,25 b	LA-2	NFC

PA-4	5,25 b	PA-4	5,25 b	PA-4	NFC
F-1	5,25 b	F-1B	5,25 b	PA-3	NFC
F-9	5,25 b	F-1	5,25 b	PA-1	NFC
PA-8	5,25 b	F-9	5,25 b	LA-1	NFC
LC-4	5,25 b	LC-4	5,25 b	LC-8	NFC
LA-1	5,50 b	PA-7	5,50 b	F-8	NFC
PA-2	5,50 b	PA-2	5,50 b	PA-8	NFC
PA-1	5,50 b	PA-9	5,50 b	PA-5	NFC
PA-9	5,50 b	PA-1	5,50 b	LC-7	NFC
LC-2	5,75 c	F-5	5,75 c	F-4	NFC
F-5	5,75 c	LC-2	5,75 c	D-1	NFC
LC-8	5,75 c	LC-8	5,75 c	F-3	NFC
F-3	5,75 c	F-3B	5,75 c	F-3B	NFC
LC-6	6,00 c	LC-1	6,00 c	D-5	NFC
F-10	6,00 c	LA-1	6,00 c	D-4	NFC
F-1B	6,00 c	F-10	6,00 c	LC-5	NFC
LC-1	6,00 c	F-3	6,00 c	D-3	NFC
PA-5	6,00 c	PA-5	6,00 c	LC-6	NFC
F-4	6,00 c	F-4	6,00 c	LC-2	6,00 a
D-4	6,00 c	PA-3	6,00 c	F-2	6,00 a
PA-3	6,00 c	D-4	6,00 c	F-1	6,00 a
F-3B	6,00 c	D-2	6,00 c	F-5	7,75 b
D-2	6,00 c	LC-7	6,25 c	PA-6	8,75 c
LC-5	6,25 c	LC-6	6,25 c	LC-1	9,00 c
LC-7	6,25 c	D-1	6,25 c	D-2	9,00 c
F-8	6,75 c	F-8	6,75 c	LC-4	9,00 c
D-1	7,75 d	LC-5	7,75 d	F-9	9,25 c
D-3	8,25 d	D-5	8,75 e	F-1B	10,75 d
D-5	9,00 e	D-3	9,00 e	PA-2	11,00 d
LA-2	9,25 e	LA-2	9,25 e	F-10	11,75 e
Média	5,95		5,94		8,69
C.V.(%)	8		8		3,7

NFC-Não formaram confídios.

** Significativo ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste F. * Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott & Knott, 1974.

Do total dos isolados estudados, 12 (34 % - LC-2, F-2, F-1, F-5, PA-6, LC-1, D-2, LC-4, F-9, F-1B, PA-2, F-10) quebraram a resistência da cultivar Oryzica Llanos 5. Analisando-se a origem geográfica de tais isolados, observou-se a ocorrência de pelo menos um isolado oriundo de cada uma das regiões de arroz amostradas no Centro-Norte do País (Goiás, Tocantins e Pará) com capacidade de quebrar a resistência de Oryzica Llanos 5. A única com exceção foi com relação a isolados de Luis Alves (GO), possivelmente pela pequena representabilidade de isolados desta região neste estudo (apenas dois isolados testados). Desta forma, constata-se a capacidade de quebra em curto prazo de resistência na cultivar Oryzica Llanos 5, caso seja usada

como fonte de resistência visando melhoramento de cultivares de arroz para a região Centro-Norte do país.

3.2.3 Severidade e ASCPD nas folhas arroz

A análise conjunta da interação de 35 isolados monospóricos com as cultivares Caloro e Fanny (suscetíveis) mostra que todos os isolados foram virulentos (*sensu* Andrivon, 1993), entretanto com níveis de agressividade diferenciados significativamente. Nestas cultivares, não houve predominância de isolados quanto a agressividade em relação à origem de coleta. A análise de variância dos dados em cada estágio e da área abaixo da curva de progresso da doença (ASCPD) mostrou que o efeito da interação cultivar x isolado foi significativo ($p \leq 0,05$) em relação à brusone nas folhas (Tabela 7), o que indica que a agressividade dos isolados dependeu da cultivar de arroz em que o isolado foi inoculado.

Em média, as ASCPD nas cultivares suscetíveis (Caloro – 40,48 e Fanny – 40,63) foram bem maiores que na cultivar *Oryzica Llanos 5* (14,97). Tal constatação demonstra que, apesar da quebra de resistência, a cultivar *Oryzica Llanos 5* apresenta um maior grau de resistência horizontal (*sensu* Van der Plank 1963), que Caloro e Fanny. Na cultivar Caloro, os isolados F-9 (57,0), PA-8 (54,75), PA-6 (52,50), PA-2 (52,50), PA-4 (52,25) e LA-1 (49,50) foram os responsáveis pelas maiores médias de ASCPD. Na cultivar Fanny, as maiores médias de ASCPD foram alcançadas pelos isolados PA-8 (56,25), PA-6 (56,25), F-9 (54,75), PA-6 (53,25), PA-2 (53,25), PA-1 (49,5). Já na cultivar *Oryzica Llanos 5*, a ASCPD dos isolados mais agressivos foram bem inferiores LC-2 (34,12), F-2 (33,00), F-1B (31,50), F-9 (31,12), F-1 (30,00), D-2 (28,5) (Tabela 6).

Revela-se grande sobreposição entre os isolados mais agressivos às cultivares Caloro e Fanny. No entanto, a sobreposição é quase nula entre os isolados agressivos às cultivares Caloro e Fanny e aqueles agressivos à cultivar *Oryzica Llanos 5*, o que foi indicado pela interação diferencial isolado x cultivar.

TABELA 6. Severidade de brusone nas folhas de 3 variedades de arroz, Caloro , Fanny e Oryzica Llanos 5; aos 3,6,9, 12 dias após a inoculação (DAI) e área sob a curva de progresso da doença (ASCPD), UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

ISOL,	Caloro*					ISOL,	Fanny*					ISOL,	Oryzica Llanos 5*				
	AACPD	3 DAI	6 DAI	9 DAI	12 DAI		AACPD	3 DAI	6 DAI	9 DAI	12 DAI		AACPD	3 DAI	6 DAI	9 DAI	12 DAI
D-5	22,125 a	1,000 a	1,414 a	2,236 a	2,396 a	LA-2	21,750 a	1,000 a	1,311 a	2,236 a	2,450 a	LA-2	6,75 a	1,00 a	1,311 a	1,414 a	1,414 a
LA-2	22,875 a	1,000 a	1,560 a	2,177 a	2,396 a	D-5	22,875 a	1,000 a	1,414 a	2,290 a	2,396 a	F-8	6,75 a	1,00 a	1,311 a	1,414 a	1,414 a
D-1	26,625 a	1,414 b	1,560 a	2,289 a	2,289 a	D-3	24,000 a	1,000 a	1,561 a	2,236 a	2,450 a	PA-3	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
D-3	28,875 a	1,414 b	1,560 a	2,396 b	2,396 a	LC-5	25,500 a	1,414 c	1,561 a	2,236 a	2,236 a	D-5	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
LC-7	32,625 b	1,207 a	2,031 b	2,384 b	2,396 a	LC-7	33,375 b	1,414 c	2,030 c	2,290 a	2,396 a	LC-3	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
F-3B	33,375 b	1,311 b	2,236 b	2,236 a	2,396 a	D-2	33,750 b	1,414 c	2,236 c	2,236 a	2,343 a	LA-1	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
LC-3	35,625 b	1,000 a	2,396 c	2,396 b	2,396 a	F-3	33,750 b	1,414 c	2,236 c	2,236 a	2,343 a	F-10	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
F-3	36,000 b	1,414 b	2,289 b	2,342 a	2,343 a	F-8	34,500 b	1,207 b	1,825 b	2,544 c	2,639 b	PA-1	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
D-4	36,375 b	1,560 b	2,236 b	2,289 a	2,396 a	F-3B	36,000 b	1,311 c	2,289 c	2,343 b	2,450 a	LC-6	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
F-8	36,750 b	1,103 a	2,118 b	2,544 b	2,639 b	D-4	36,375 b	1,414 c	2,236 c	2,396 b	2,396 a	F-3	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
D-2	36,750 b	1,414 b	2,236 b	2,396 b	2,449 a	PA-9	36,750 b	1,207 b	2,342 c	2,396 b	2,450 a	F-4	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
PA-5	37,500 b	1,311 b	2,236 b	2,449 b	2,544 b	PA-5	37,500 b	1,311 c	2,236 c	2,449 b	2,544 b	F-3B	7,50 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
F-5	38,250 b	1,414 b	2,289 b	2,449 b	2,449 a	D-1	37,500 b	1,414 c	2,030 c	2,544 c	2,544 b	PA-9	8,25 a	1,103 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
LC-2	38,250 b	1,414 b	2,289 b	2,449 b	2,449 a	PA-3	39,000 b	1,000 a	2,236 c	2,639 c	2,639 b	PA-8	8,25 a	1,103 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
LC-6	38,250 b	1,311 b	2,236 b	2,544 b	2,449 a	F-4	39,000 b	1,000 a	2,236 c	2,639 c	2,639 b	LC-8	8,25 a	1,103 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
LC-5	38,250 b	2,000 c	2,177 b	2,236 a	2,236 a	PA-8	40,500 c	1,311 c	2,342 c	2,544 c	2,544 b	LC-7	8,25 a	1,103 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
F-4	39,000 b	1,000 a	2,236 b	2,639 c	2,639 b	F-10	40,500 c	1,000 a	2,236 c	2,639 c	2,828 c	PA-5	8,25 a	1,103 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a
LC-1	39,750 b	1,414 b	2,236 b	2,544 b	2,544 b	LC-6	40,500 c	1,311 c	2,030 c	2,634 d	2,639 b	D-4	8,25 a	1,103 a	1,414 a	1,414 a	1,414 a

PA-3	40,500 b	1,000 a	2,236 b	2,734 c	2,639 b	LC-1	42,000 c	1,414 c	2,236 c	2,544 c	2,817 c	PA-4	9,75 a	1,103 a	1,561 a	1,414 a	1,414 a
F-10	40,500 b	1,000 a	2,236 b	2,639 c	2,817 c	LA-1	42,000 c	1,207 b	2,236 c	2,639 c	2,828 c	D-3	10,50 a	1,41 b	1,414 a	1,414 a	1,414 a
LC-4	42,000 c	1,414 b	2,396 c	2,554 b	2,544 b	LC-2	43,500 c	1,414 c	2,289 c	2,639 c	2,734 c	LC-5	10,50 a	1,41 b	1,414 a	1,414 a	1,414 a
F-11	42,000 c	1,103 a	2,231 b	2,639 c	2,912 c	F-11	43,500 c	1,207 b	2,396 d	2,544 c	2,912 c	PA-8	10,50 a	1,103 a	1,414 a	1,560 a	1,560 a
LC-8	42,750 c	1,103 a	2,289 b	2,544 b	3,079 d	LC-3	43,500 c	1,000 a	2,396 d	2,634 d	2,734 c	F-11	12,00 a	1,00 a	1,414 a	1,414 a	2,289 c
PA-8	44,250 c	1,207 a	2,396 c	2,639 c	2,817 c	F-1	45,000 c	1,414 c	2,289 c	2,634 d	2,734 c	PA-2	21,00 b	1,00 a	1,707 a	2,000 b	2,289 c
PA-9	45,000 c	1,311 b	2,342 b	2,734 c	2,734 c	LC-4	45,000 c	1,414 c	2,396 d	2,544 c	2,912 c	F-5	21,00 b	1,00 a	1,414 a	2,236 c	2,289 c
F-2	45,750 c	2,236 d	2,236 b	2,396 b	2,449 a	F-5	45,000 c	1,561 c	2,289 c	2,639 c	2,734 c	D-1	24,75 b	1,71 c	1,853 b	1,853 b	1,853 b
F-1	46,500 c	1,560 b	2,289 b	2,734 c	2,734 c	F-1B	47,250 c	1,311 c	2,342 c	2,817 d	2,828 c	PA-6	25,125 b	1,00 a	1,707 a	2,289 c	2,289 c
PA-1	46,500 c	1,103 a	2,342 b	2,828 d	2,912 c	LC-8	47,250 c	1,207 b	2,289 c	2,634 d	3,116 d	LC-4	25,50 b	1,41 b	1,561 a	2,236 c	2,289 c
F-1B	47,250 c	1,311 b	2,342 b	2,828 d	2,817 c	F-2	47,250 c	2,29 d	2,236 c	2,449 b	2,450 a	LC-1	27,00 b	1,00 a	2,000 b	2,236 c	2,236 c
LA-1	49,500 d	1,207 a	2,532 c	2,828 d	2,817 c	PA-4	48,000 c	1,311 c	2,491 d	2,634 d	2,817 c	D-2	28,50 c	1,41 b	1,853 b	2,236 c	2,236 c
PA-4	50,250 d	1,311 b	2,449 c	2,828 d	2,912 c	PA-1	49,500 d	1,103 b	2,532 d	2,817 d	2,912 c	F-1	30,00 c	1,00 a	2,236 c	2,236 c	2,236 c
PA-6	52,500 d	1,103 a	2,449 c	2,995 e	3,079 d	PA-2	53,250 d	1,414 c	2,634 d	2,817 d	2,912 c	F-9	31,125 c	1,103 a	2,177 c	2,289 c	2,289 c
PA-2	52,500 d	1,311 b	2,639 c	2,828 d	2,912 c	F-9	54,750 d	1,561 c	2,616 d	2,817 d	2,912 c	F-1 B	31,50 c	1,21 a	2,236 c	2,236 c	2,236 c
PA-8	54,750 d	1,311 b	2,449 c	2,995 e	3,079 d	PA-6	56,250 d	1,414 c	2,544 d	2,995 e	3,079 d	F-2	33,00 c	1,41 b	2,236 c	2,236 c	2,289 c
F-9	57,000 d	1,311 b	2,616 c	2,995 e	3,079 d	PA-8	56,250 d	1,311 c	2,544 d	2,995 e	3,116 d	LC-2	34,125 c	1,41 b	2,236 c	2,289 c	2,289 c
Média	40,478	1,303	2,223	2,564	2,632		40,639	1,306	2,204	2,552	2,671		14,968	1,123	1,591	1,687	1,725
C,V,(%)	13,65	12,38	8,94	5,75	5,41		13,65	12,38	8,94	5,75	5,41		13,65	12,38	8,94	5,75	5,41

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott & Knott (1974).
- Isolados (ISOL.)

No presente trabalho foi possível constatar a quebra de resistência genética da cultivar Oryzica Llanos 5, oriunda da Colômbia, até o momento considerada como padrão de resistência durável. De acordo com Lopez-Gerena (2006), a resistência conferida pela cultivar desde o seu lançamento em 1989, ainda permanece efetiva. Na Colômbia a interação desta cultivar foi avaliada com centenas de isolados do fungo, que foram incapazes de estabelecer reação compatível com ela. Em trabalho realizado por Correa-Victoria & Zeigler (1993) utilizando 202 isolados oriundos de seis linhagens do IRRI, os autores constataram resistência da cultivar Oryzica Llanos 5 a todos eles. O pedigree desta cultivar é derivado de 4 fontes distintas de resistência à brusone, através de métodos de melhoramento convencional (Correa-Victoria *et al.*, 2004). Na Colômbia, a cultivar Oryzica Llanos 5 mostrou amplo espectro de resistência nos testes *International Rice Blast Nursery* (IRBN) e alta estabilidade em lavouras comerciais e nas parcelas de plantio seqüenciais (Prabhu & Fillipi, 2006). Tal nível de resistência não foi observado no presente trabalho, realizado em condições controladas de casa de vegetação.

O grau de resistência das cultivares diminui com o tempo, não somente devido à mudança na composição das raças de uma população ou o aumento de frequência de uma raça compatível com o gene de resistência, mas também devido à alteração na agressividade de isolados pertencentes a uma mesma raça (Ahn *et al.*, 1996). Ahn (2000), avaliando diversas cultivares de arroz e isolados com interação compatível com cada uma delas, verificou um aumento significativo e gradativo em agressividade (porcentagem de área foliar afetada) do isolado C101 A51 (Pi-2). Dessa forma, constatou-se mudança na agressividade dentro da combinação raça-linhagem e o desenvolvimento de uma nova raça dentro da linhagem genética do patógeno.

A ASCPD é útil para revelar pequenas diferenças de agressividade do patógeno e níveis de resistência do hospedeiro. Em genótipos suscetíveis, a doença geralmente começa mais cedo e desenvolve-se rapidamente, resultando numa maior ASCPD quando comparados com um genótipo com resistência parcial onde a doença começa mais tarde e/ou desenvolve-se mais lentamente (Thomé *et al.*, 1999). Aos 9 DAI os mesmos níveis de significância demonstrados pela ANOVA ocorreram tanto para ASCPD quanto para severidade nos mesmos isolados. Dos 35 isolados testados, 12 quebraram resistência genética, demonstrando ser esta a melhor fase de avaliação da doença.

Segundo Chaves *et al.* (2004), a importância dos componentes de resistência para redução da doença no campo e, conseqüentemente, da ASCPD, pode variar dependendo do patossistema. Para

ferrugem da folha do trigo e da cevada, por exemplo, o período de latência é o componente mais importante. Já para ferrugem amarela do trigo, a frequência de infecção e a produção de esporos parecem ser os componentes mais importantes (Parlevliet, 1988). Assim, podem-se selecionar genótipos através da mensuração de um único componente de resistência, se este apresentar alta correlação com a ASCPD, conforme sugerido por Brake & Irwin (1992) e Thomé *et al*, (1997). Tal procedimento pode ser de grande utilidade para acelerar a seleção em programas de melhoramento.

3.2.4 Correlações entre crescimento *in vitro* e componentes monocíclicos da brusone

Houve forte correlação, altamente significativa e positiva entre a ASCPD e a severidade da doença aos 6, 9 e 12 DAI para as 3 cultivares. Aos 3 DAI observou-se correlação significativa apenas para as cultivares Fanny e Oryzica Llanos 5. Entretanto, a correlação mais forte foi observada aos 9 DAI, confirmando a melhor época de avaliação da doença em condições de casa de vegetação (Tabela 7). Prabhu & Filippi (2001) também constataram correlações positivas e altamente significativas entre severidade de brusone nas folhas e ASCPD.

TABELA 7. Coeficiente de correlação (R) entre as variáveis área sob a curva de progresso da doença (ASCPD), severidade da doença aos 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação (DAI) nas cultivares de arroz Caloro, Fanny e Oryzica Llanos 5. UnB/Embrapa CENARGEN, Brasília, 2009.

Varietades	Variáveis	3 DAI	6 DAI	9 DAI	12 DAI
Caloro	ASCPD	0,1187ns	0,8686**	0,8869**	0,8064**
Fanny	ASCPD	0,3547*	0,8914**	0,8893**	0,3388**
Oryzica Llanos 5	ASCPD	0,4720*	0,9257**	0,9661**	0,9130**

ns = não significativo, ** = significativo a 1% de probabilidade pelo Teste t, * = significativo a 5% de probabilidade pelo Teste t.

A época de avaliação é de suma importância para a determinação de resistência à doenças. Neste estudo percebe-se a diferença do comportamento de isolados monospóricos quanto ao estágio de desenvolvimento da doença. Alguns deles, quando inoculados nas cultivares altamente suscetíveis, os sintomas da doença apareceram mais cedo, demonstrando um período de incubação mais curto.

Comparando a análise de crescimento *in vitro* e os componentes monocíclicos dos isolados monospóricos de *M. grisea* em estudo, notam-se algumas correlações que demonstram a consistência dos parâmetros utilizados (Tabela 8). A adoção destes parâmetros em programas de melhoramento genético de arroz visando resistência a brusone é de suma importância, principalmente nos testes das cultivares usadas como fontes de resistência a brusone para determinada região. A elevada diversidade genética de isolados de *M. grisea* especialmente na região Centro-Norte do Brasil, intensifica a necessidade do conhecimento a fundo do comportamento dessas fontes de resistência perante ao ataque de brusone.

Tabela 8 . Coeficiente de correlação (R) entre as variáveis área abaixo da curva de crescimento micelial (ASCCM), área sob a curva de progresso da doença (ASCPD), período de incubação, período de latência nas cultivares de arroz Caloro, Fanny e Oryzica Llanos 5.

Variedades	Variáveis	Incubação	Latência	ASCCM
Caloro	ASCPD	-0,3143ns	0,4027*	-0,0986ns
	Incubação		-0,2324ns	0,4425**
	Latência			-0,2583ns
Fanny	ASCPD	-0,5474**	-0,7801**	-0,0234ns
	Incubação		-0,7889**	0,3728*
	Latência			0,1002ns
Oryzica Llanos 5	ASCPD	-0,4783*	-0,3512**	-0,4343**
	Incubação		0,1421ns	0,5300**
	Latência			0,0995ns

ns = não significativo, ** = significativo a 1% e * = significativo a 5% de probabilidade pelo Teste t.

Houve correlação significativa e positiva entre ASCCM e período de incubação, então o crescimento *in vitro* demonstrou-se um bom preditor deste parâmetro monocíclico (incubação), e conseqüentemente, da intensidade da doença em campo, para todos os cultivares. Quanto maior o ASCCM (melhor adaptação ao crescimento *in vitro*), no caso dos isolados (D-5, PA-1 e LA-2) menos eficiente o isolado é para causar doença (maiores períodos de incubação). Por outro lado quanto menor ASCCM (pior adaptação ao crescimento *in vitro*), no caso dos isolados (LA-5, F-1, D-1 e D-2), mais

eficiente o isolado é para causar doença (menores períodos de incubação). Esse fato revela que estudos *in vitro* de isolados de *M. grisea* possibilita a estimativa da intensidade de doença em áreas de cultivo de arroz.

A correlação entre ASCCM e período de latência, não foi significativa. Então o crescimento *in vitro* não é um bom previsor de como será este parâmetro monocíclico (latência), e conseqüentemente, da intensidade da epidemia em campo. Entretanto, a cultivar Oryzica Llanos 5, apresentou no grupo dos isolados que formaram conídios (i.e., aqueles com relação compatível com Oryzica Llanos 5, e que portanto puderam ter o período de latência medido) menores ASCCM em média, do que os isolados que não esporularam (incompatíveis).

Entre os componentes monocíclicos período de incubação e período de latência em correlação a área sob a curva de progresso da doença (ASCPD), tanto para cultivar Fanny quanto para Oryzica Llanos 5 foi significativa e negativa, ou seja, quanto mais curtos os períodos de incubação e latência, maiores os níveis de doença. Portanto estes componentes monocíclicos explicam parcialmente a epidemiologia da brusone nas folhas de arroz. Na cultivar Caloro não observou-se essa relação, outros fatores desconhecidos no momento podem ter obscurecido a relação entre períodos de incubação e latência com a ASCPD.

4 CONCLUSÕES

- Os isolados de *M. grisea* da região Centro-Norte do Brasil (Goiás, Tocantins e Pará) comportaram-se diferentemente quanto ao crescimento micelial *in vitro*, independente do local de coleta e estas diferenças podem, ser ao menos parcialmente devidas à variabilidade genética.
- Foi possível *constatar a* quebra de resistência genética da cultivar Oryzica Llanos 5 (34% dos 32 isolados estudados), até o momento considerada *como padrão* de resistência durável, subsidiado pelos parâmetros epidemiológicos: incubação, latência, severidade e agressividade.

- A quebra de resistência de *Oryza Llanos 5* em testes em casa de vegetação com isolados da região Centro-Norte do Brasil alerta para a potencial quebra de resistência no campo em novas cultivares oriundas dos programas de melhoramento. Os programas de melhoramento devem considerar este tipo de estudo para a seleção de fontes de resistência para regiões específicas do país.
- Há evidências de elevada variabilidade epidemiológica do patossistema arroz/brusone na região Centro-Norte do país.
- Aos 9 dias após a inoculação, é a melhor época de avaliação de brusone em condições de casa de vegetação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn SW (2000) Spatial and temporal stability of genetic resistance to Rice blast, In: Tharreau D, Lebb Brun NH, Talbot NJ, Notthehem JL (Ed.) Advantage in rice blast research 167-171.

Ahn SW, Makihara D, Imbe T, Chen DH, Barrios HC (1996) Populations dynamics of *Pyricularia grisea* in rice cultivares with partial resistance, *Phytopathology* 86(11):46, Alves K J P, Fernandes J M C (2006).

Andrison D (1993) Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* 83:889-890

Influência da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulação de *Magnaporthe grisea* em trigo, *Fitopatologia Brasileira* 31:579-584.

Andres MW, Wilcoxson RD (1986) Effect of pathogen races on the area under the disease progress curve in barley infected with *Puccinia hordei*, *Journal of Plant Disease and Protection* 93(6):632-637.

Bastiaans L, Rabbinge R, Zadoks J C (1994) Understanding and modeling leaf blast effects on crop physiology and yield, In: Zeigler RS, Leong SA, Teng PS (Ed.), *Rice blast disease*, Wallingford: CAB, pp, 357-380.

Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (1995) *Manual de Fitopatologia*, Vol, 1: Princípios e Conceitos, 3ª ed, Agronômica Ceres, São Paulo-SP.

Brake VM, Irwin JAG (1992) Partial resistance of oats to *Puccinia coronata* f, sp, *avenae*, *Australian Journal of Agricultural Research* 43:1217-1227.

Bueno CJ, Ambrosio MMQ, Souza NL (2006) Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, *Summa phytopathologica* 32(1):42-50.

Camargo Junior O (2004) A Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* f, sp, *phaseoli* por meio de marcadores RAPD. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras MG.

Chaves MS, Martinelli JÁ, Federizzi LC (2004) Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: III - Correlação de componentes de resistência entre si e com a intensidade de doença no campo. *Fitopatologia brasileira* 29(2):197-200.

Correa-Victoria FL, Zeigler RS (1993) Pathogenic variability in *Pyricularia oryzae* at a Rice blast “hot spot” breeding site in Eastern Colombia. *Plant Disease*. 77(10): 1029-1035.

Correa-Victoria FL, Tharreau D, Martinez C, Vales M, Escobar F, Prado G, Aricapa G (2004) Gene combinations for durable Rice blast resistance in Colombia, Disponível em:
http://www.ciat.cgiar.org/epmr_ciat/pdf/poster_16_empr07.pdf Acesso em: 21/01/2009

Dias Neto JJ (2008) Biologia e identificação de raças fisiológicas de *Magnaporthe grisea* isolados de plantas de arroz cultivado na região central do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Tocantins. Gurupi-TO.

Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4,0, In: 45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria, UFSCar, São Carlos, SP :255-258.

Filippi MC, Prabhu AS (2001) Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36(1):27-35.

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.

Galbieri R, Urashima AS (2008) Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual entre isolados de *Pyricularia grisea* de diferentes hospedeiros. *Summa Phytopathologica* 34(1):22-28.

Garrido LR (2001) 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*). Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília DF.

Giatong P, Frederiksen R A (1969) Pathogenic variability and cytology of monoconidial subcultures of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*. 59(8): 1152-1157.

Ignoffo CM, McIntosh AH, Garcia C, Kroha M, Jonson JM (1982) Effects of successive *in vitro* and *in vivo* passages on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Entomophaga* 27:371-378.

IRRI (1988) Standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute.

Jia Y, McAdams S A, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal* 19(15):4004-4014.

Jia Y, Bryan GT, Farrall L, Valent B (2003) Natural variation at the Pi-ta rice blast resistance locus. *Phytopathology* 23(11):1452-1459.

Leung H, Borromeo E S, Bernardo MA Notteghem JL (1988) Genetic-analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 78(9):1227-1233.

Levy M, Correa-Victoria FS, Zeigler RS, Xu S, Hamer, JE (1993) Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology* 83:1427-1433.

Lopez-Gerena J (2006) Mapping qtl controlling durable resistance to rice blast in the cultivar oryzica llanos 5. Tese de doutorado. Cali. Colombia Universidad Del Valle.

Meyer MC, Silva JC, Maia GL, Bueno CJ, Souza NL (2006) Mancha de mirotécio em algodoeiro causada por *Myrothecium roridu*. *Summa Phytopathologica* 32(4):390-393.

Notteghem JL (1993) Durable resistance to Rice blast disease, In: Jacobs TH, Parlevliet JE (Eds), *Durability of disease resistance*. London, Kluwer academic publishers pp. 125-134.

Nunes CDM, Carvalho FIF, Pierobom CR, Oliveira A (2007) Genética da resistência de cultivares de arroz à raça IA-1 de *Pyricularia grisea*. *Fitopatologia Brasileira* 32(1):64-69.

Ohm HW, Shaner GE (1976) Three components of slow leaf-rusting at different growth stages in wheat. *Phytopathology* 66:1356-1360.

Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *The Plant Cell* 12:2019-2032.

Ou SH (1980) Pathogen variability and host-resistance in rice blast disease. Annual Review of Phytopathology 18:167-187.

Parlevliet JE (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development., Annual Review Phytopathology 17:203-222.

Parlevliet JE, Van Ommeren A (1988) Accumulation of partial resistance in barley to barley leaf rust and powdery mildew through recurrent selection against susceptibility. Euphytica 37:261-274.

Pessoa Filho MACP (2008) Identificação re regiões genômicas associadas ao controle de tolerância à seca em variedades tradicionais de arroz de sequeiro (*Oryza sativa*). Tese de Doutorado.: Universidade de Brasília. Brasília DF

Picinini EC, Fernandes JMC (1995) Doenças de cereais de inverno: aspectos epidemiológicos e controle, Passo Fundo: CNPT/EMBRAPA.

POTAFOS, Doenças do arroz: Sintomatologia e controle, Arquivo do agrônomo N° 10 - setembro/95 Disponível em: <www.potafos.org/Arroz18-22.pdf> Acesso em 09/12/2008.

Prabhu AS, Bedendo IP, Filippi MC (1995) Principais doenças do arroz no Brasil, 3, ed, Goiania: EMBRAPA/CNPAP (Documentos, 2).

Prabhu AS, Filippi MCC (2006) Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.

Rangel PHN (2006) Mapeamento genético e piramidização de genes de resistência no desenvolvimento de multilinhas e cultivares compostas de arroz irrigado com resistência estável à brusone (*Magnaporthe grisea*), Relatório Técnico, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.

Rangel PHN, Zimmermann FJP, Neves PCF (1992) El CNPAF Investiga: decresce en Brasil el rendimiento del arroz de riego. Arroz en las Américas 13(1):2-4.

Ribeiro AS (1985) Doenças, In: Fundação Cargill. Fundamentos para a cultura do arroz irrigado. Campinas.

Ribot C, Hirsch J, Balzergue S, Tharreau D, Nottéghem JL, Lebrun MH, Morel JB (2008) Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Physiology* 165(1): 114-24.

Row KVSRK, AIST JR, CRILL JP (1985) Mitosis in the rice blast fungus and its possible implications for pathogenic variability. *Canadian Journal of Botany*.63(6): 1129-1134.

Santos GR, Silva LMA, Dias Neto JJ, Rangel PHN, Ferreira M E, Canjão E R, Cunha A C F, Castro Neto M D (2008) Esporulação de *Magnaporthe grisea* do arroz em culturas com diferentes idades. *Tropical Plant Pathology* 33:183.

Seebold RW, Datnoff L E, Correa-Victoria FJ, Kucharek TA, Snyder GH (2000) Effect of silicon and host resistance on blast. *Scald and Yield of Upland Rice. Plant Disease* 84(8): 871-876.

Shaner G, Hess FD (1978) Equations for integrating components of slow leaf-rusting in wheat. *Phytopathology* 68:1464-1469.

Silva F de AS (1996) The ASSISTAT Software: statistical assistance, In: international conference on computers in agriculture, 6, Cancun, 1996, Anais, Cancun: American Society of Agricultural Engineers :294-298.

Silva LMA (2008) Identificação de raças e análise de virulência de *Magnaporthe grisea* para composição de multilinhas e variedades compostas de arroz irrigado no Estado do Tocantins. Dissertação de Mestrado. Universidade do Tocantins. Gurupi TO.

Silva SR, Rios GP, Silva SC (2001) Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 26(4): 726-731.

Standard Evolution system for Rice (1988),, 3, Ed, Los Bãnos: International Rice Research Institute. 54p.

Sztejnberg A, Wahl I(1976) Mechanisms and stability of slow stem rusting resistance in *Avena sterilis*. *Phytopathology* 66:74-80.

Thome GCH, Milach SCK, Cruz RP, Federizzi LC (1999) Melhoramento para resistência parcial a moléstias fúngicas em cereais, *Cienc, Rural* 29(2):365-371.

Valent B (2004) Plant disease: Underground life for rice foe, *Nature* 431:516-517.

Van Der Plank J E (1963) Plant diseases: epidemics and control. New York: Academic.

Vechiato MH, Maringoni AC, Martins EMF, Kohara EY (2003) Caracterização de isolados de *Diaporthe* spp, e *Diaporthe phaseolorum* var, *meridionalis*, Arq, Inst, Biol, 70(2):159-167.

Wahl I, Wilcoxson RD, Rowell JB (1980) Slow rusting of wheat with stem rust detected in the glasshouse. Plant Disease 64:54-56.

Zeigler RS, Thome J, Levy M, Correa-Victoria FJ (1995) Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding, In: (Ed.), Rice blast disease, Wallingford: CAB International :267-292.

CAPITULO 2: VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÃO DE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE *Magnaporthe grisea* (Barr) COLETADOS NO CENTRO-NORTE DO BRASIL

RESUMO

A brusone em arroz é um dos maiores problemas da cultura, implicando em baixas produtividades, especialmente nas regiões Centro-Norte do Brasil. As populações patogênicas de *Pyricularia grisea* Sacc [teleomorfo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr], fungo causador da doença, estão em estado dinâmico. A análise da diversidade genética entre isolados de *M. grisea*, é um componente importante para o programa de melhoramento da cultura do arroz no Brasil, fornecendo informações acerca da diversidade genética existente em local específico, subsidiando o lançamento de cultivares com resistência genética a este patógeno. Objetivou-se com o presente trabalho identificar a diversidade genética e a estrutura de população de isolados monospóricos coletados em lavouras comerciais de arroz nos Estados de Tocantins, Goiás e Pará. Para tanto, conduziram-se ensaios na Embrapa-CENARGEN, onde foram avaliados 140 isolados monospóricos de *M. grisea* obtidos nos municípios de Lagoa da Confusão, Dueré e Formoso do Araguaia (Tocantins), Luiz Alves do Araguaia (Goiás) e Paragominas (Pará). Neste estudo, 34 marcadores microssatélites marcados com fluorocromo foram utilizados para a genotipagem automática em sequenciador de DNA. Quatorze marcadores microssatélites mostraram-se altamente eficientes para estimar a diversidade genética e detectar estruturação em população de isolados monospóricos de *M. grisea*. Alguns deles apresentam um conteúdo informativo elevado, facilitando a genotipagem em escala e propiciando alta eficiência na análise de polimorfismo de DNA. A média do número de alelos por loco foi 6,35, variando de 2 alelos para os marcadores ms 109 - 110, ms 115 - 116, ms 61 - 62 a 16 alelos para o marcador PG 27. Os índices de diversidade genética (DG), conteúdo polimórfico informativo (PIC) e probabilidade de identidade (PI), confirmaram a eficiência destes marcadores. A população de isolados de *M. grisea* apresentou subestruturação em três sub-populações (K=3). Os isolados de Goiás (Luiz Alves) em sua maioria são observados no Grupo 1, os isolados de Tocantins (Formoso, Dueré e Lagoa da Confusão) em sua maioria são observados no Grupo 2 e os isolados do Pará (Paragominas) são observados no Grupo 3. Os isolados do Pará são os mais distantes geneticamente em relação aos isolados de Goiás e Tocantins. A alta diversidade genética observada na população de isolados, assim como a evidência de estruturação sugerem a necessidade de monitoramento específico e emprego de estratégias adequadas pelos programas de melhoramento genético para as sub-populações detectadas.

***Magnaporthe grisea* (Barr) MONOSPORIC ISOLATES COLECTED AT BRAZIL'S NORTH-CENTER REGION GENETIC VARIABILITY AND POPULATION STRUCTURE**

ABSTRACT

Blast rice is one of the biggest problems of rice culture, implying in low productivity, especially at Brazil's North-Center region. *Pyricularia grisea* Sacc [teleomorph *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr] pathogenic populations, the fungus that causes the disease, are in dynamic state. Genetic diversity analyses within *M. grisea* isolates is an important component to Brazil's rice culture improvement program, giving information about existing genetic diversity at a specific location, subsidizing varieties with genetic resistance to this pathogen release. The present work had the objective to identify monosporic isolates collected at commercial rice farming at the states of Tocantins, Goiás and Pará genetic diversity and population structure. To do so, essays were conducted at Embrapa-CENARGEN, where 140 *M. grisea* monosporic isolates obtained from the cities of Lagoa da Confusão, Dueré and Formoso do Araguaia (Tocantins), Luiz Alves do Araguaia (Goiás) and Paragominas (Pará) were evaluated. For this study, 34 microsatelites markers marked with fluorochrome were utilized to automatic genotyping in DNA sequence. Fourteen microsatelites markers appeared highly efficient to estimate genetic diversity and to detect structuration in *M. grisea* monosporic isolates population. Some of them showed a high informative content, making easy scale genotyping and giving DNA polymorphism analysis high efficiency. The medium number of allele per *loco* was 6,35, varying from 2 allele to markers ms 109 – 110, ms 115 - 116, ms 61 – 62 to 16 allele to marker PG 27. Genetic diversity index (GD), informative polimorfic content (IPC) and identity portability (IP), confirmed these markers efficiency. *M. grisea* isolates population showed substructuration in three sub-populations (K=3). Goiás (Luiz Alves) isolates in your majority are observed at Group 1, Tocantins (Formoso, Dueré and Lagoa da Confusão) isolates in your majority are observed at Group 2 and Pará (Paragominas) isolates are observed at Group 3. Pará isolates are the most genetic distant in relation to Goiás and tocanins isolates. High genetic diversity observed in isolates population, as well as the structuration evidence suggest the need of specific monitoring and the use of adequate strategies by genetic improvement programs to detected sub-population.

1 INTRODUÇÃO

A brusone do arroz, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* Sacc [teleomorfo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr], é a principal doença desta cultura, ocorrendo em quase todas as regiões produtoras de arroz do mundo (Ou, 1985). Sob condições ótimas, o patógeno pode causar epidemias severas e, conseqüentemente, perdas econômicas significativas. A melhor forma de controle da doença é através do uso de cultivares resistentes, pela introdução de genes de resistência em linhagens avançadas dos programas de melhoramento genético.

A dinâmica de mudanças na composição das raças do patógeno em populações naturais tem frequentemente resultado na redução do tempo de utilização das cultivares melhoradas para resistência à brusone do arroz (Garrido, 2001). O melhoramento genético das cultivares de arroz tem por objetivo obter resistência durável através do uso de fontes de resistência diversas (Ahn, 1994). Para isto, é importante o conhecimento da diversidade genética e da composição da estrutura de populações do patógeno, concomitante ao monitoramento de novas raças de *M. grisea*. No estado do Tocantins, na região Norte do Brasil, a quebra de resistência à brusone tem ocorrido em apenas dois a três anos após o lançamento de uma nova variedade (Rangel *et al.*, 2006; Silva *et al.* 2008a). A diversidade racial de isolados de *M. grisea* nesta região é tão elevada que mesmo variedades consideradas como fonte de resistência durável ao patógeno, como Oryzica Llanos 5, apresentam reação compatível com número considerável de isolados quando inoculadas com isolados da região (Capítulo 1). Por outro lado, no Estado do Pará, onde o clima e a vegetação são tipicamente Amazônicos, não há relatos de perdas significativas de produtividade devidas ao ataque de brusone (Altevir de Matos Lopes, Embrapa Amazônia Oriental, comunicação pessoal).

Pouco se conhece sobre estrutura de populações de *M. grisea* nas áreas de cultivo de arroz no Brasil. Tal estrutura reflete a história evolucionária do patógeno em regiões produtoras. A estrutura e a dinâmica de populações são determinadas por forças evolutivas como mutação, seleção, fluxo gênico, deriva genética e recombinação genética (McDonald, 1997; Zeigler, 1998).

Marcadores microsatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) são encontrados abundantemente no genoma de uma ampla diversidade de espécies de eucariotos e procariotos (Ferreira e Grattapaglia, 1996). São altamente informativos e proporcionam um meio acurado de detectar a variação genética em organismos onde o DNA possa ser extraído (Powell *et al.*, 1996). Estes

marcadores têm sido empregados com sucesso para “fingerprinting” de DNA em estudos de genética de populações, na genotipagem de indivíduos para discriminação de genótipos (Brondani *et al.*, 2000; Cregan *et al.*, 1994; Russel *et al.*, 1997), caracterização e conservação de recursos genéticos (Hoshino *et al.*, 2002) e construção de mapas genéticos (Chen *et al.*, 1997; Brondani *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2008). Entre as aplicações de maior impacto social destes marcadores incluem-se as investigações forenses (Hummel & Schultes, 2000) e os testes de paternidade.

O objetivo do presente trabalho foi o estudo da diversidade genética e estrutura de populações de isolados de *M. grisea* coletados em lavouras comerciais das principais regiões produtoras de arroz do Centro-Norte do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados de *Magnaporthe grisea*

Os estudos de variabilidade e estrutura genética de populações de isolados de *M. grisea* foram conduzidos no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN, Brasília, DF), entre os meses de setembro e dezembro do ano de 2008. Os isolados foram coletados em cinco municípios de três estados (Goiás, Tocantins e Pará) (Dias Neto, 2008).

Inicialmente foram avaliados 140 isolados monospóricos de *M. grisea* quanto a capacidade de cultivo *in vitro* e qualidade de DNA para análise molecular (Tabela1). A coleta, cultivo e armazenamento dos isolados foi realizada conforme metodologia descrita no Capítulo 1.

TABELA 1. Identificação e origem dos isolados monospóricos de *M. grisea* coletados nos Estados do Tocantins (municípios de Formoso, Lagoa da Confusão e Dueré), Goiás (município de Luiz Alves) e Pará (município de Paragominas). UnB. Brasília, 2009.

TO	TO	TO	GO	PA
Formoso	Lagoa da Confusão	Dueré	Luiz Alves	Paragominas
1	*4	55	39	*700
*2	5	154	*99	705
*3	6	214	107	710
22	7	365	127	715
24	8	*430	148	720
*34	9	*434	152	725
38	11	437	164	*730
57	12	439	168	*735
60	*14	446	173	*740
92	15	458	*186	745
161	19	*466	188	750
218	*20	*467	*190	760
319	23	468	586	770
380	46	477	587	775
389	72	480	628	
391	*73	485	629	
397	93	494	630	
401	209	516	*631	
409	251	*527	632	
411	302	532	633	
412	*359	*536	*634	
413	374	541	635	
416	376	546	636	
417	393	553	642	
418	403	574	*644	
431	422			
436	445			

530	453
564	456
584	459
588	462
611	487
616	511
617	540
618	545
800	560
*810	566
	575
	*805
<hr/>	
Total 37	39
	25
	25
	14
<hr/>	

* Isolados que não foram analisados após o filtro dos dados de genotipagem.

2.2 Produção de micélio para extração de DNA

Os 140 isolados de *M. grisea* foram cultivados em meio de cultura BDA (200 g de batata, 18 g de dextrose, 18 g de Ágar e 1 L de água destilada), autoclavado a 120 °C por 20 min. Posteriormente, foram incubados em câmara de germinação tipo B.O.D durante 15 dias em temperatura de 25 °C, na ausência de luz e umidade relativa entre 50 e 70 %.

Em seguida, o micélio foi transferido para 50 ml de meio de cultura líquido (5 g de extrato de levedura, 2g de KH₂PO₄, 20 g de D-glucose, 3 g de KNO₃, 0,5 g de MgSO₄ e água destilada q.s.q 1 L) (Chen *et al.*, 2006), contido em Erlenmeyers de 250 ml, incubados durante 7 dias a temperatura ambiente e agitação 150 rpm. Após este período, efetuou-se a filtragem do meio de cultura em papel filtro, lavagem do micélio com TE gelado e armazenamento do micélio no gelo em tubos Falcon de 15 ml identificados de acordo com a amostra. O micélio foi então armazenado a - 20 °C até a sua utilização.

O micélio fúngico foi macerado em cadinhos de porcelana contendo nitrogênio líquido até formar um pó de granulometria extremamente fina. O DNA foi extraído através de um método rápido

de extração com CTAB, conforme descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). A concentração do DNA foi estimada em eletroforese de gel de agarose 1% utilizando-se DNA λ (Invitrogen) como padrão para quantificação. O DNA foi diluído em tampão TE para uma concentração final de 2 ng/ μ L.

2.3 Genotipagem de Isolados de *Magnaporthe grisea* com Marcadores Microsatélites

Para análise da estrutura genética das populações de *M. grisea*, coletadas nos Estados de Tocantins, Goiás e Pará, foram inicialmente testados um total de 34 marcadores microsatélites descritos na literatura (Garrido, 2001; Kaye *et al.*, 2003) (Tabela 2). A análise do produto de PCR de cada um dos marcadores em 140 isolados monospóricos foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio. Estes dados foram utilizados para selecionar os marcadores mais informativos, bem como para avaliar os isolados com DNA em quantidade e qualidade suficientes para a análise. Foram selecionados apenas os isolados que possuíam 80% de alelos identificados com o conjunto de marcadores testados. De maneira análoga, foram considerados para análise apenas os marcadores que possuíam 80% ou mais de genótipos no conjunto de isolados testados. A bateria de isolados e marcadores microsatélites em conformidade com estes parâmetros foi empregada no estudo de diversidade genética e estrutura populacional de *M. grisea*.

TABELA 2. Identificação dos marcadores microsatélites utilizados no estudo diversidade e estrutura de população de isolados de *M. grisea*. UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

Painél	Loco	Fluorocromo	COR	Tamanho Esperado	Cromossomo	MOTIF
1	ms 81 - 82	6-FAM	azul	190	4	ACT/TGA 12
	PG 35	NED	amarelo	205	-	CT 17/AT 2
2	*ms 99 - 100	6-FAM	azul	208	5	ACC/TGG 20
	MGM 1	TET	verde	-	-	
3	*ms 47 - 48	6-FAM	azul	197	4	TA/AT 15

	PG-21	NED	amarelo	207	-	CT 21
	*ms 109 - 110	TET	verde	176	1	TC/AC 12
	*ms 93 e 94	6-FAM	azul	211	2	ATC/TAC 12,5
4	PG-15	NED	amarelo	189	-	GA 46
	*ms 125 - 126	TET	verde	213	7	CAA/GTT 32
	ms 83 - 84	6-FAM	azul	181	2	TCA/AGT 13
5	PG-42	NED	amarelo	196	2	GA 25
	PG-4	TET	verde	230	4	GA 43
	*ms 87 - 88	6-FAM	azul	203	1	TGC/ACG 12
6	PG-27	NED	amarelo	198	-	GA 12
	MGM-21	TET	verde	-	-	-
	*ms 107 - 108	6-FAM	azul	500	2	GA/CT 10
7	PG-20	NED	amarelo	199	-	GA 48
	PG-3	TET	verde	128	-	GA 21
	*ms 41 - 42	6-FAM	azul	117	-	CT/GA 16
8	PG-14	NED	amarelo	198	-	GA 24
	*ms 115- 116	TET	verde	203	3	GA/CT 33
	*ms 61 - 62	6-FAM	azul	217	3	GA/CT 9
9	*PG-16	NED	amarelo	180	-	GA 26
	PG-5	TET	verde	164	-	CT 26

	*ms 63 - 64	6-FAM	azul	163	1	CT/GA 15
10	PG-19	NED	amarelo	202	-	CT 26
	*PG-6	TET	verde	154	-	GA 24
	ms 67 - 68	6-FAM	azul	200	7	CA/GT 17
11	PG-26	NED	amarelo	211	-	GA 9
	PG-9	TET	verde	171	-	GA 42/A 8 G
	ms 77 - 78	6-FAM	azul	200	3	CA/GT 17
12	PG-30	NED	amarelo	196	-	GA 22
	PG-12	TET	verde	110	-	CT 17

- Locos selecionados (ms) de Kaye (2003) e (PG e MGM) de Garrido (2001)

* Locos selecionados após filtragem de dados de genotipagem.

Os ensaios seguintes foram realizados empregando-se painéis multiplex (variando entre 2 ou 3 locos por painel) de marcadores na genotipagem de isolados do patógeno. As reações de amplificação foram conduzidas utilizando os seguintes reagentes: DNA 10 ng, tampão 1 X, DNTP 0,1 mM iniciador (direto + reverso) 0,5 μ M, Taq polimerase 1 U e água para um volume final de 22 μ L.

As reações de polimerase em cadeia foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, EUA). O programa de amplificação de produtos de PCR foi o seguinte: 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30", 56°C por 30", 72°C por 1 min, e uma extensão final de 72°C por 5 min. Cada painel incluiu locos com a mesma temperatura de anelamento (ex. 56° C). Os produtos de PCR foram diluídos em uma proporção 1:5, e 1 μ L do produto diluído foi adicionado a 9 μ L de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), 0,35 μ L do padrão de fragmentos de DNA de tamanho conhecido (Brondani & Grattapaglia, 2001), e 1,05 μ L de H₂O padrão Milli-Q.

A eletroforese capilar para a separação dos fragmentos amplificados em cada loco microssatélite foi realizada em seqüenciador automático ABI Prism 3700 (Applied Biosystems). A definição do tamanho dos produtos de PCR em cada loco foi realizada com o emprego dos programas GeneScan Analysis 3.7 e Genotyper 3.7 (Applied Biosystems). Em seguida os dados brutos de genotipagem foram arredondados pelo programa Allelobin (Idury & Cardon, 1997).

2.4 Análises estatísticas

Os dados de polimorfismo de DNA em regiões hipervariáveis do genoma de isolados de *M. grisea* coletados nos Estados de Tocantins, Goiás e Pará, foram submetidos a análises estatísticas para verificação da variabilidade genética e inferência da estrutura genética.

Análise de diversidade genética e eficiência de marcadores microssatélites na discriminação de isolados de Magnaporthe grisea – O nível de polimorfismo entre os isolados monospóricos de *M. grisea* nos locos de marcadores microssatélites selecionados para o estudo foi estimado pelo cálculo do número de diferentes alelos em cada loco, variação alélica observada, diversidade gênica (GD), valores de PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) e Probabilidade de Identidade (PI). Estimados pelas seguintes fórmulas,

- Diversidade gênica (GD):

$$GD = (1 - \sum p_i^2) / (2n - 1)$$

Onde, p_i é a frequência do i -ésimo alelo para cada loco e n o número de isolados monospóricos analisados (NEI, 1987).

- Conteúdo de informação de polimorfismo (PIC):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2$$

Onde, f_i é a frequência do i -ésimo alelo para uma dada marca, somado ao longo dos n alelos.

- Probabilidade de identidade (PI):

$$PI = \sum p_i^4 + \sum (2p_i p_j)^2$$

Onde, p_i é a frequência do i -ésimo alelo para cada loco.

Estrutura genética de população de *Magnaporthe grisea* - A estrutura genética da população de isolados de *M. grisea* foi inicialmente analisada sem a hipótese de um modelo *a priori* de estrutura, utilizando-se o programa Structure versão 2.2 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). Para isto, as análises foram realizadas utilizando-se um período de *burn-in* de 100,000 iterações, seguido de uma extensão de corrida de 100,000 iterações (Markov Chain Monte Carlo). Dez corridas independentes para cada *K* (o número de grupos ou sub-populações inferidas na estimativa do Structure) foram realizadas, com valores de *K* variando de 1 a 10 sub-populações. O critério de escolha do modelo que detectava o valor mais provável de *K* foi ΔK , uma quantificação *ad hoc* relacionada à mudança de segunda ordem do logaritmo de probabilidade dos dados em relação ao número de sub-populações inferidas pelo Structure (Evanno *et al.*, 2005). Um isolado foi incluído num grupo específico inferido pelo programa se pelo menos 70% do seu valor genômico, como medido por seu coeficiente de inclusão *Q* (*membership coefficient*), variando de 0 a 1), foi estimado como pertencente àquele grupo. Valores médios de F_{ST} para os grupos inferidos foram calculados com o programa Structure. Estimativas de frequência alélica foram calculadas no programa Power Marker posterior à análise de estrutura genética e definição de ΔK , e empregadas para estimar a distância genética entre as sub-populações eventualmente detectadas, utilizando-se o coeficiente de Chord (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967), conforme abaixo:

$$D_C = (2/\pi r) \sum_j^r \sqrt{2 \left(1 - \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij} y_{ij}} \right)}.$$

*Distância genética par-a-par entre isolados *Magnaporthe grisea** - Após a genotipagem dos isolados de *M. grisea* com marcadores microssatélites, foram estimadas as distâncias genéticas par-a-par entre cada um dos isolados de *M. grisea*. Os valores de distância genética foram baseados na razão entre a soma das proporções de alelos comuns entre dois isolados para todos os locos (Bowcock et al. 1994; Goldstein et al. 1995), e foram obtidas através do coeficiente *Shared Allele* baseado em frequências alélicas, através do programa PowerMarker versão 3.25 (Liu & Muse, 2005). A matriz diagonal de distâncias genéticas foi submetida à análise de agrupamento pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973) e um dendrograma de distâncias genéticas foi construído com o programa NTSYSpc versão 2.10z (Adams *et al.*, 2002). Para estabelecer a relação entre eventual estruturação detectada pelo program Structure e as distâncias genéticas entre pares de isolados, o dendrograma foi justaposto a um gráfico de barras desenhado no

programa Distruct (Rosenberg, 2004), alinhando os isolados de *M. grisea* de acordo as distâncias genéticas estimadas par-a-par e o coeficiente de inclusão Q de cada isolado em sub-populações identificadas pela análise de estrutura genética.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de diversidade genética e eficiência de marcadores microssatélites na discriminação de isolados de *Magnaporthe grisea*

A genotipagem dos 12 painéis multiplex composto por 34 marcadores microssatélites indicou ausência de amplificação dos alelos referentes aos locos MGM-1, MGM-21, PG-3 e PG-21. Considerou-se para análise somente os locos marcadores com >80 % de genótipos na amostra de isolados monospóricos, bem como os isolados com genótipos em >80 % dos locos microssatélites testados. Ou seja, foram rejeitados tanto os isolados monospóricos, quanto os locos que apresentaram > 20 % de dados faltantes. Considerou-se para análise, portanto, os genótipos de 114 isolados monospóricos de *M. grisea* em 14 locos microssatélites, sendo 11 deles originalmente desenvolvidos por Kaye *et al.* (2003), e três originalmente desenvolvidos por Garrido (2001) (Tabela 2).

A caracterização dos locos de marcadores microssatélites foi feita através das análises de frequência dos alelos, do número de alelos observados em cada loco, da Diversidade Gênica (DG) observada, do Conteúdo Polimórfico Informativo (PIC) e da Probabilidade de Identidade (Tabela 3).

Tabela 3. Características dos alelos amplificados em cada loco, índices de diversidade genética (DG), conteúdo polimórfico informativo (PIC) e probabilidade de identidade (PI). UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

Marcador	Alelo	Frequência	Nº de alelos	Varição alélica observada	DG	PIC	PI
ms 99-100	160	0,009	7	160-196	0,66	0,61	0,162
	163	0,028					
	184	0,49					
	187	0,25					
	190	0,09					

	193	0,173					
	196	0,38					
	162	0,531					
	164	0,343					
ms 47-48	184	0,021	5	162-190	0,59	0,52	0,240
	186	0,083					
	190	0,021					
	174	0,66					
ms 109-110	176	0,339	2	174-176	0,45	0,35	0,405
	173	0,018					
	179	0,018					
	200	0,018					
	203	0,009					
ms 93-94	206	0,018	10	173-224	0,45	0,43	0,326
	209	0,727					
	212	0,036					
	215	0,136					
	218	0,009					
	224	0,009					
	150	0,154					
	171	0,01					
	174	0,34					
	177	0,051					
ms 125-126	186	0,35	10	150-219	0,73	0,69	0,114
	189	0,031					
	192	0,031					
	198	0,01					
	210	0,01					
	219	0,01					
	173	0,143					
	179	0,277					
ms 87-88	182	0,527	5	173-221	0,62	0,57	0,200
	185	0,018					
	221	0,036					
	198	0,03					
	200	0,14					
PG-27	202	0,13	16	198-224	0,90	0,89	0,018
	204	0,04					
	206	0,08					
	208	0,18					

	210	0,01					
	214	0,06					
	216	0,03					
	218	0,06					
	220	0,07					
	222	0,04					
	224	0,07					
	226	0,02					
	232	0,02					
	234	0,02					
ms 107-108	323	0,009					
	325	0,815	3	323-327	0,31	0,26	0,524
	327	0,176					
ms 41-42	127	0,027					
	145	0,12					
	17	0,722	6	127-325	0,46	0,43	0,319
	153	0,046					
	159	0,018					
	325	0,064					
ms 61-62	116	0,009	2	212-214	0,38	0,31	0,459
	130	0,99					
PG-16	133	0,009					
	135	0,903	4	133-143	0,18	0,17	0,481
	137	0,019					
	143	0,067					
PG-6	137	0,032					
	145	0,011					
	149	0,076					
	151	0,076					
	153	0,119					
	155	0,065					
	157	0,043	13	137-173	0,88	0,87	0,027
	161	0,043					
	163	0,022					
	165	0,152					
	167	0,217					
	169	0,13					
	173	0,011					
ms 63-64	145	0,039	4	145-161	0,32	0,29	0,493
	147	0,814					

	159	0,137					
	161	0,009					
ms 115-116	116	0,009	4	116-130	0,02	0,02	0,962
	130	0,99					

Diversidade Genética multiloco = 0,89; Probabilidade de Identidade (PI) combinado = $6,9414^{-10}$

Os dados de genotipagem possibilitaram a identificação de 89 alelos únicos. A média do número de alelos por loco foi 6,35, variando entre dois alelos para os marcadores (ms 109-110, ms 115-116, ms 61-62) a 16 alelos para o marcador (PG-27). Grande parte dos marcadores microsatélites testados apresentou alto conteúdo informativo, com valores elevados de DG, PIC e baixos valores de PI. Por outro lado, os marcadores ms 107-108, ms 115-116, ms 63-64 e PG-16 pouco contribuíram para a detecção de polimorfismo entre os isolados monospóricos em estudo. Esse fato se deve não somente ao baixo número de alelos que os marcadores apresentaram na população (Tabela 3), mas à existência de apenas um ou poucos alelos com alta frequência, praticamente fixados na população (Figura 1). Os marcadores microsatélites mais informativos em geral apresentaram vários alelos na população, mas com distribuição de frequência relativamente uniforme entre os alelos. É o caso do loco PG-27 (Figura 1), com 16 alelos, cujas frequências variam de 0,01 a 0,18 %, com conteúdo polimórfico informativo (PIC) igual a 0,90, DG igual a 0,89 e PI de apenas 0,018.

A Diversidade genética (DG) multiloco, baseada na bateria de 14 locos microsatélites é 0,89. A eliminação da análise dos locos com baixo conteúdo informativo (ms 107-108, ms 115-116, ms 63-64 e PG-16) diminuiu a DG em valores mínimos. O mesmo ocorre em relação à probabilidade de identidade (PI), quando analisado em conjunto os 14 marcadores microsatélites apresentaram um valor combinado de $6,9414^{-10}$. Por outro lado, quando eliminou-se os 4 locos microsatélites menos informativos, o valor de PI combinado foi elevado para somente $8,1023^{-9}$, demonstrando um elevado conteúdo de informação de diversidade genética e probabilidade identidade utilizando-se apenas 10 marcadores microsatélites. Observa-se, portanto, que estes 4 locos pouco contribuem para a eficiência de estimativas de diversidade genética. Observa-se economia de tempo e recursos quando apenas os 10 locos microsatélites mais informativos são utilizados na genotipagem, em detrimento dos 14 inicialmente selecionados. Vale ressaltar, que no estudo de estrutura genética de populações (item 3.2) estes marcadores podem ser importantes. Isto porque os marcadores mais úteis para detecção de sub-populações e para localizar um indivíduo em uma sub-população ou outra são os marcadores que variam grandemente entre sub-populações, mas muito pouco dentro delas (Rosenberg *et al.*, 2001).

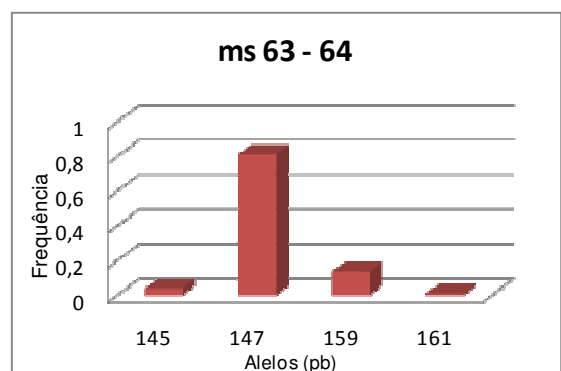
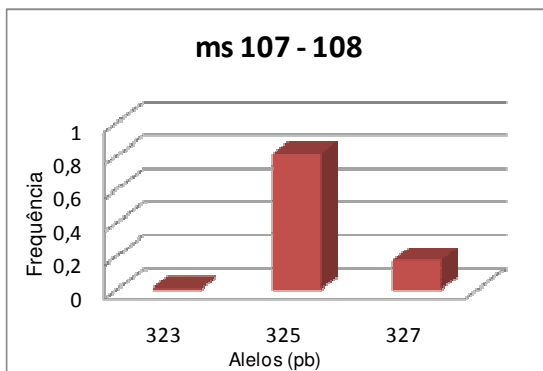
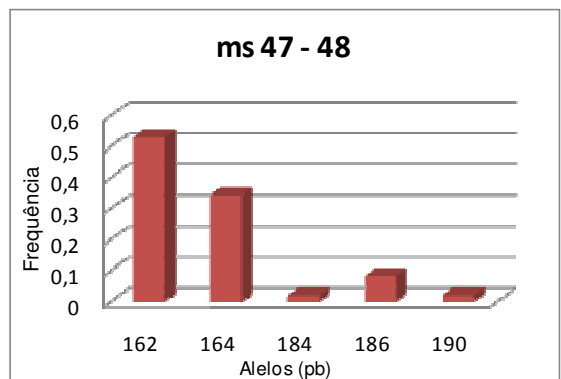
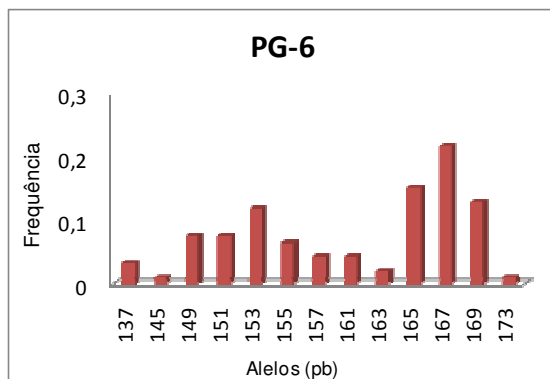
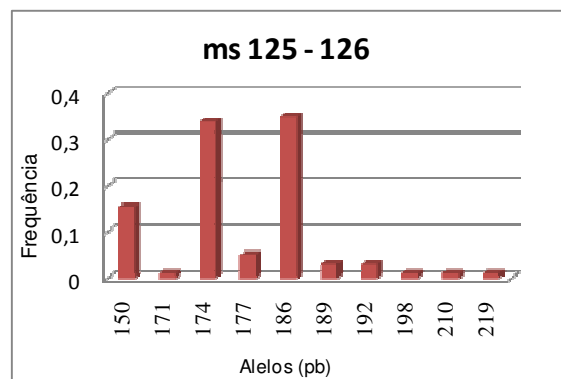
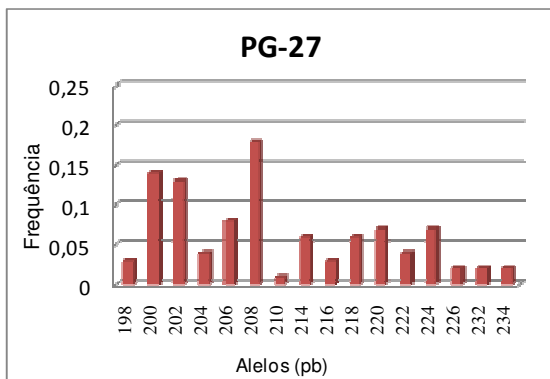
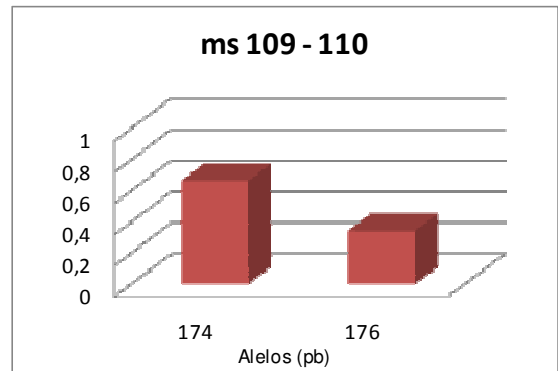
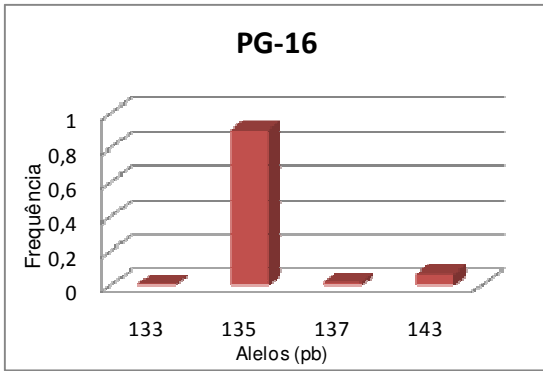


FIGURA 5. Histograma de barras de frequência alélica de 89 alelos distribuídos em 14 marcadores microssatélites utilizados, indicando diversidade genética de isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea*. UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009

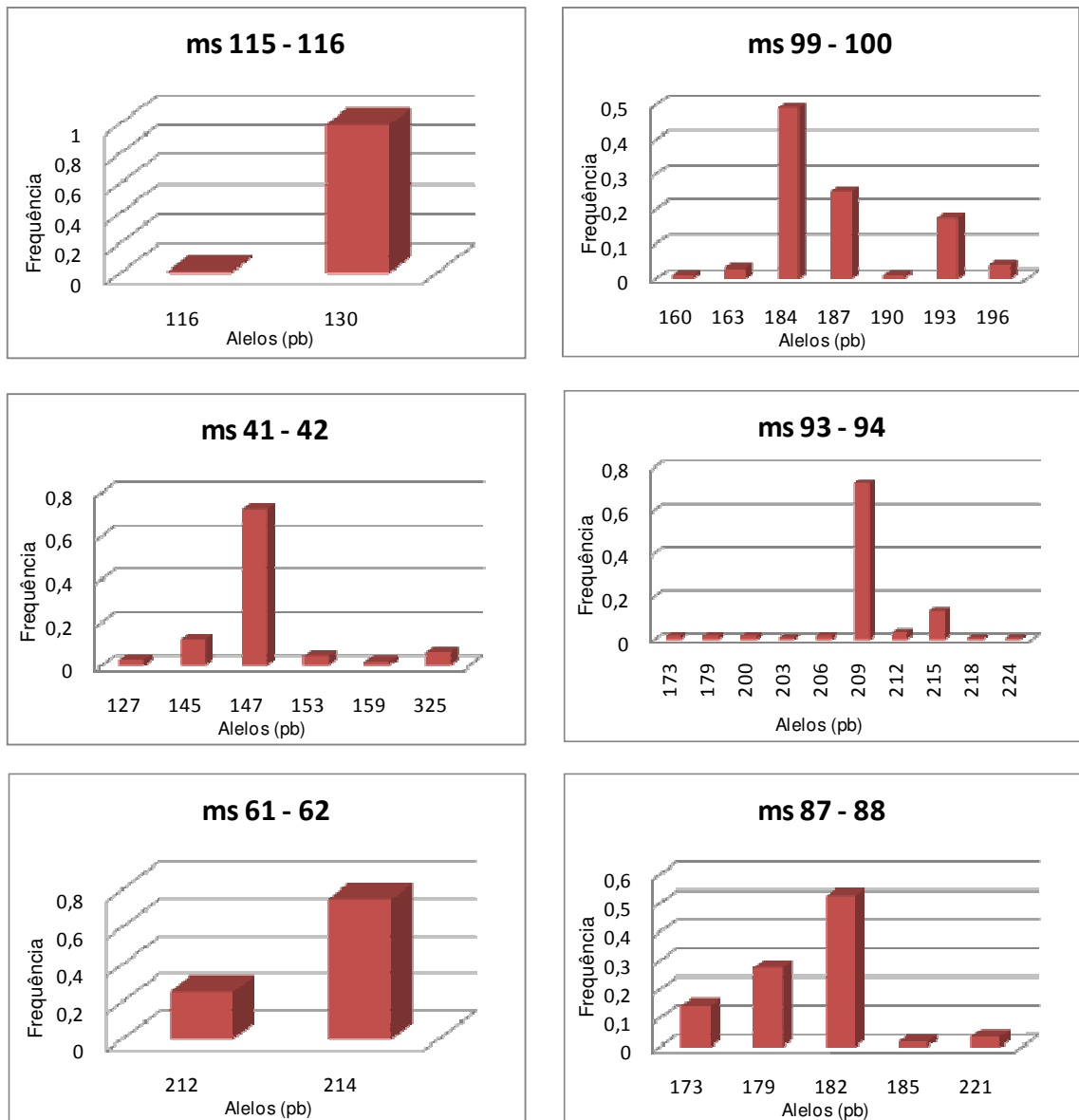


FIGURA 5. Histograma de barras de frequência alélica de 89 alelos distribuídos em 14 marcadores microssatélites utilizados, indicando diversidade genética de isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea*. UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009 (Continuação)

3.2 Estrutura genética de população isolados de *Magnaporthe grisea*

O programa Structure foi utilizado para inferir a estrutura populacional que poderia estar presente nos isolados de *M. grisea* coletados nos Estados de Tocantins, Goiás e Pará. Nenhum nível hierárquico foi testado *a priori* para supor o possível número de estratos da população do patógeno. Optou-se por verificar a existência de estruturação da população através de estimativas de ΔK . As estimativas de ΔK em diferentes estudos indicam que este parâmetro apresenta um valor preditivo eficiente do nível hierárquico de estruturação mais alto presente numa amostra populacional, apesar de problemas, como sua incapacidade de detectar a ausência de estruturação (quando $K = 1$) estejam presentes. Neste estudo, o valor mais alto de ΔK para os 114 isolados de *M. grisea* testados foi de $K = 3$, com valores para outros K 's próximos de zero (Figura 2). Isto indica que a meta-população de isolados de *M. grisea* coletados nos três estados (GO, TO, PA) apresenta uma estruturação em três grandes grupos.

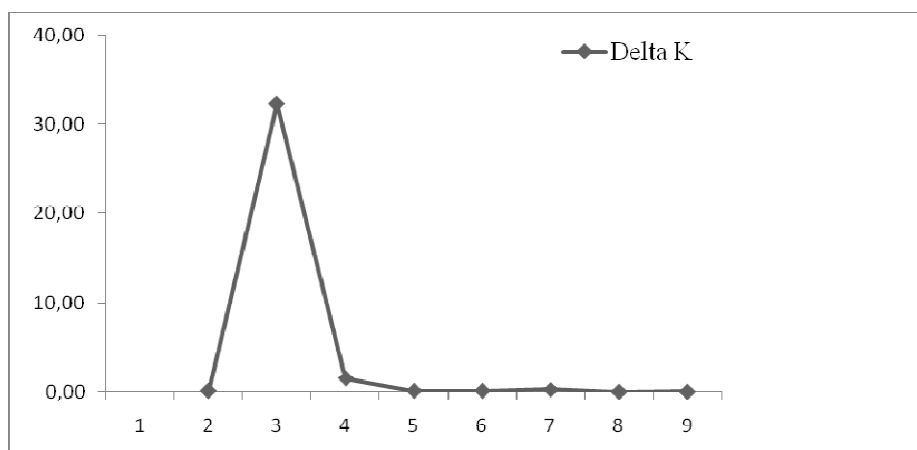


FIGURA 2. Valores de ΔK (eixo Y), com seu valor modal (eixo X) detectando um K de 3 grupos ($K = 3$). UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

As estimativas do coeficiente de inclusão Q de cada isolado em cada uma das três sub-populações detectadas permitem inferir a relação entre a estruturação observada e a distribuição dos isolados de acordo com a sua distribuição geográfica. Todos os isolados foram claramente inseridos em uma das três sub-populações quando foi definido um $K = 3$ (Figura 3). Os valores estimados de Q (ancestridade média estimada ou coeficiente de inclusão) para cada isolado são apresentados no triângulo. Cada isolado foi marcado com uma cor de acordo com o local da coleta (vermelho – Goiás; azul –

Tocantins; amarelo – Pará) e agrupados em relação a cada lado do triângulo pelas medidas estimadas dos vetores de ancestralia. Observa-se uma distribuição clara dos isolados nas três sub-populações.

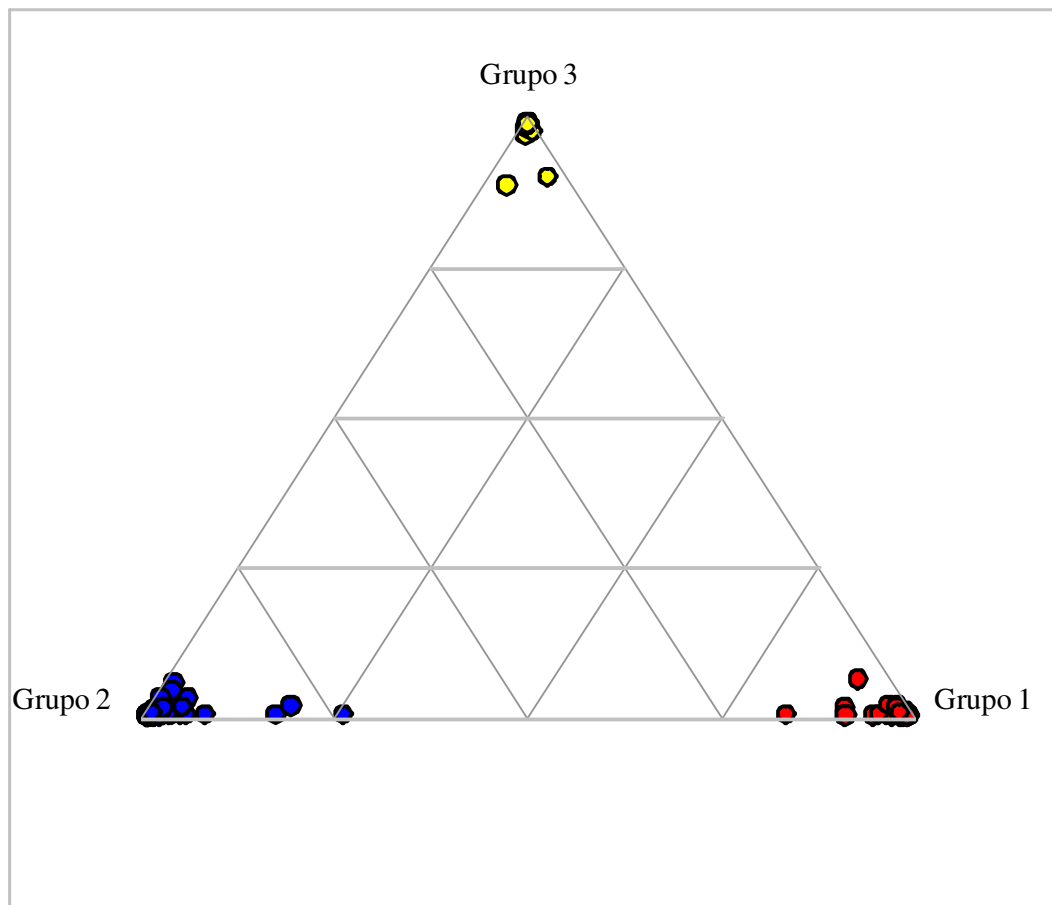


FIGURA 3. Valores estimados de Q (coeficiente de inclusão) para cada isolado representando os 3 grupos distintos. Grupo 1 (vermelho), maioria dos isolados coletados em Goiás, grupo 2 (azul), maioria dos isolados coletados em Tocantins e grupo 3 (amarelo), maioria dos isolados coletados no Pará. UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

Os valores médios do grau de diferenciação genética das sub-populações por efeito de deriva genética (F_{ST}) foram de 0,18 no Grupo 1; 0,50 no Grupo 2 e 0,31 no Grupo 3. O valor de F_{ST} para cada população representa a deriva genética inferida a partir de um ancestral comum de todas as populações. Todos os valores foram significativamente maiores que zero ($\alpha = 0,039$). Há, claramente,

uma subdivisão da população de isolados de *M. grisea* em três sub-populações, separados geograficamente.

Distância genética par-a-par entre isolados Magnaporthe grisea - Uma matriz diagonal de distâncias genéticas par-a-par entre os 114 isolados monospóricos de *M. grisea* foi submetida à análise de agrupamento pelo método de UPGMA (Sneath & Sokal, 1973). O dendrograma de distância genética (Figura 4) indica a existência de três grupos de isolados: 38 isolados constituíram o Grupo 1 (33,3 %), 60 isolados constituíram o Grupo 2 (52,7 %) e 16 isolados constituíram o Grupo 3 (14 %).

A origem geográfica (município) de cada isolado monospórico foi analisada em relação aos agrupamentos observados no dendrograma de distância genética. Os isolados originários de Goiás (município de Luiz Alves) são observados em sua maioria (>60%) no Grupo 1 da análise de distância genética (Tabela 4; Figura 4). Os isolados originários de Tocantins (municípios vizinhos de Luiz Alves, Lagoa da Confusão e Dueré) são observados em sua maioria (>85%) no Grupo 2, enquanto os isolados originários do Pará (município de Paragominas) são observados (100%) no Grupo 3 (Tabela 4; Figura 5).

TABELA 4. Proporção de isolados de diferentes regiões geográficas observados nas sub-populações detectadas. UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

Origem	Sub-Populações Detectadas			Nº de isolados
	1	2	3	
Luiz Alves – GO	0,63	0,15	0,21	19
Formoso do Araguaia – TO	0,30	0,64	0,06	33
Lagoa da Confusão – TO	0,39	0,61	0	33
Dueré – TO	0,16	0,84	0	19
Paragominas - PA	0	0	1	10

A maioria dos isolados coletados no município de Luís Alves no Estado de Goiás foi enquadrada no Grupo 1 (63 %). O Grupo 2 incluiu a maioria dos isolados coletados nos municípios do Estado do Tocantins (Formoso - 64 %, Lagoa - 61 % e Dueré - 84 %). Já o Grupo 3 incluiu apenas os isolados coletados em Paragominas, Estado do Pará (100%). O isolamento geográfico entre as diferentes sub-populações parece contribuir para a estruturação observada. A população de isolados

dos municípios do Estado do Tocantins cobrem um raio de aproximadamente 120 quilômetros (km) e está representada no Grupo 2. Ao sul, o município de Luís Alves está distante dos municípios do Tocantins a aproximadamente 350 km, mas grande parte dos isolados deste município pertencem ao Grupo 1. Já os isolados de *M. grisea* do município de Paragominas, a 1400 km de Luís Alves e 1.000 km dos municípios de Tocantins, formam um grupo à parte (Grupo 3), geneticamente distante dos Grupos 1 e 2. As estimativas de distância genética entre as três sub-populações pelo coeficiente de Chord (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) indicam que a maior distância ocorre entre o Grupo 1 e o Grupo 3 (0,66). A menor distância genética (0,40) ocorreu entre os Grupos 1 e 2. A distância genética entre os Grupos 2 e 3 foi 0,62.

A análise conjunta das distâncias genéticas par-a-par e dos valores estimados de Q (coeficiente de inclusão) para cada isolado (Figura 4) evidenciam a congruência entre a análise de estrutura populacional e de diversidade genética. Foi observado que os isolados alocados em uma sub-população de acordo com o coeficiente de inclusão (cores vermelha, azul e amarela) pertencem a grupos distintos, definidos por distância genética (Grupos 1, 2 e 3).

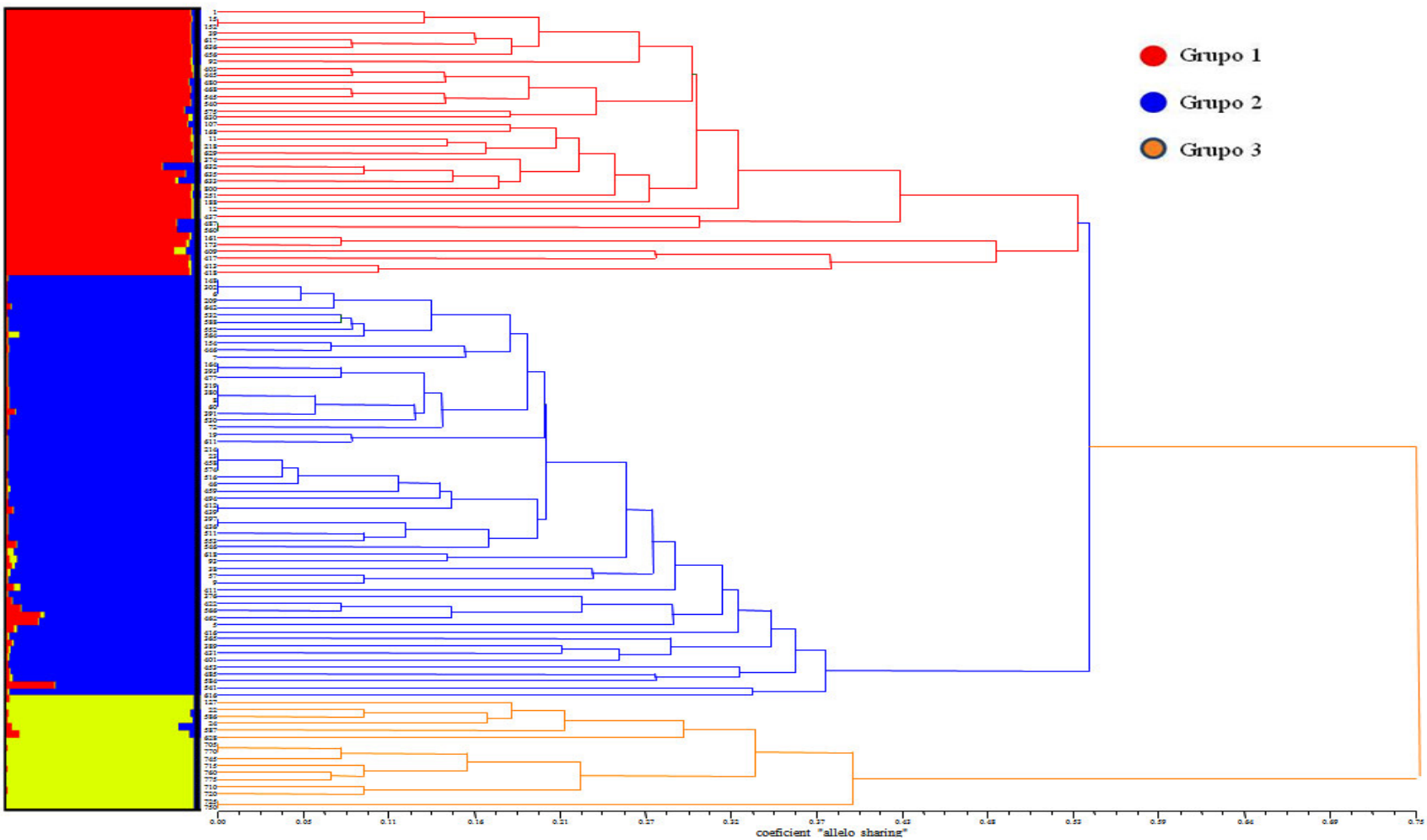


FIGURA 4. Gráfico de barras desenhado a partir do programa Distruct e dendrograma de distâncias genéticas entre 114 isolados de *Magnaporthe grisea*, indicando variabilidade genética e distância genética entre 3 grupos. UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009.

A análise de frequências alélicas dentro de cada sub-população indica que alguns locos marcadores apresentaram alta eficiência na diferenciação das populações. O loco microssatélite ms 109-110 apresenta alelo (174pb) com alta frequência (90 %) no Grupo 2 (azul). O loco PG-16 apresenta um alelo fixado (135 pb) no Grupo 1. Os locos ms 125-126, ms 87-88 e ms 115-116 apresentaram-se monomórficos dentro do Grupo 3 (amarelo), o mais distante geneticamente dos demais (Figura 5). Conforme mencionado, os marcadores mais úteis para detecção de sub-populações e para localizar um indivíduo em uma sub-população ou outra são os marcadores que variam grandemente entre sub-populações, mas muito pouco dentro delas (Rosenberg *et al.*, 2001).

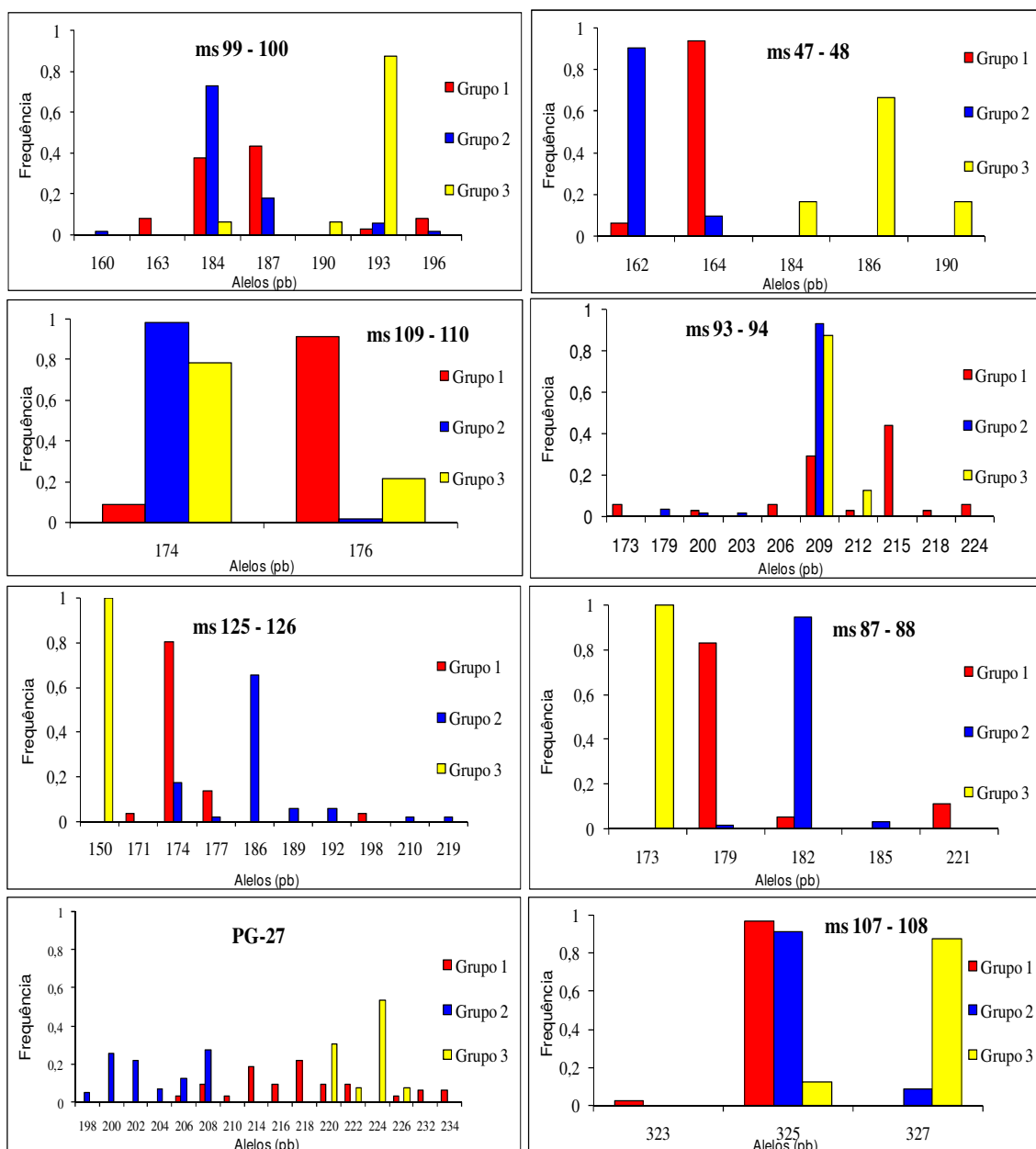


FIGURA 5. Histograma de barras de frequência alélica entre 3 grupos e 14 marcadores microssatélites utilizados para avaliar a variabilidade genética de isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea*. UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009

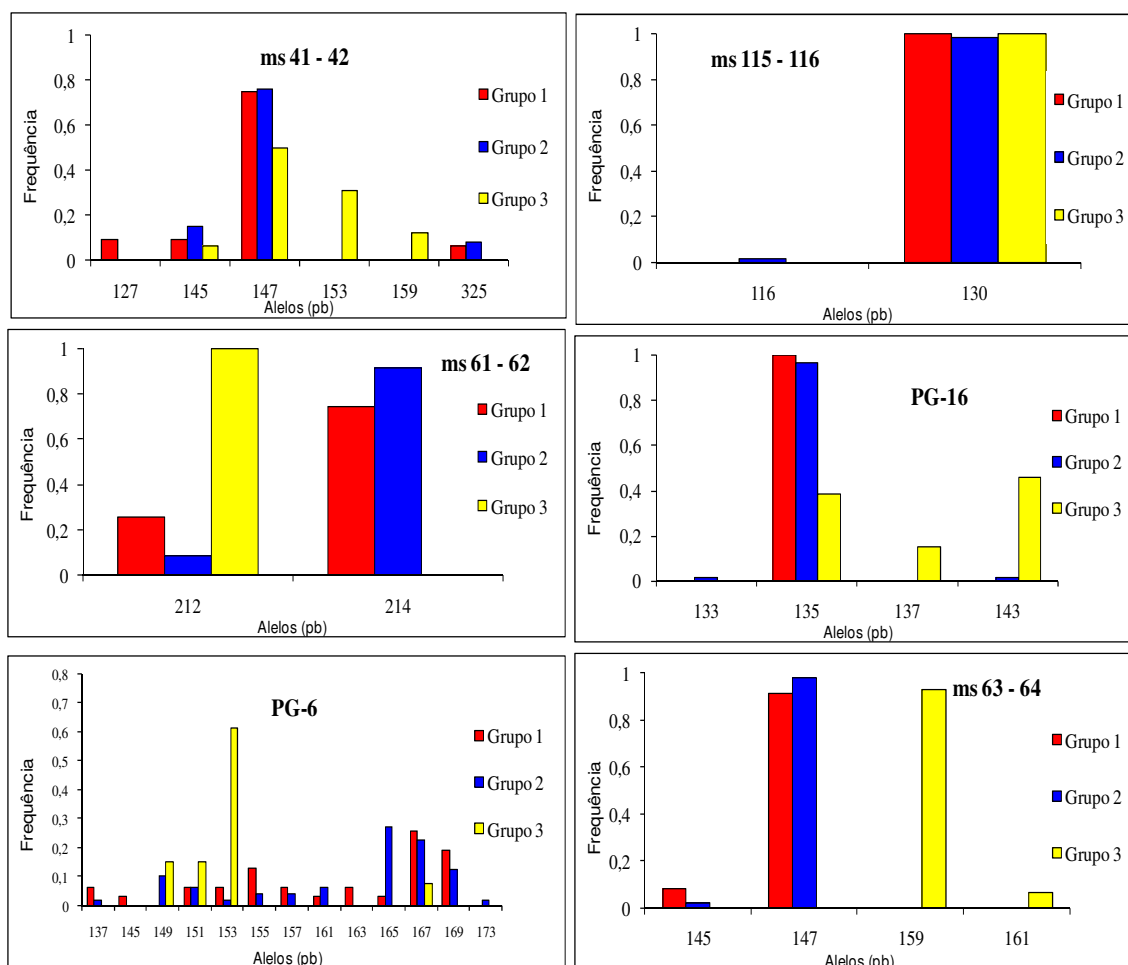


FIGURA 5. Histograma de barras de frequência alélica entre 3 grupos e 14 marcadores microssatélites utilizados para avaliar a variabilidade genética de isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea*. UnB/Embrapa CENARGEN. Brasília, 2009 (Continuação)

Aparentemente, em diferentes regiões produtoras de arroz, observam-se exemplos de alta e baixa diversidade genética do patógeno, assim como níveis variáveis de estruturação populacional. Conhecer tais padrões é importante para a definição de estratégias de melhoramento genético para resistência à brusone pelos programas de melhoramento. A diversidade genética de isolados de *M. grisea* oriundos da região Central do Brasil, especialmente do Estado do Tocantins, tem sido considerada alta em comparação com amostras de outras regiões do país, como a região Sul (Brondani *et al.*, 2000; Garrido, 2001). O presente estudo corrobora estas estimativas e apresenta evidências de sub-estruturação da população de isolados. Estudos de estrutura genética de populações empregando marcadores microssatélites do genoma do patógeno são, até o momento, muito incipientes (Brondani *et al.*, 2000; Garrido, 2001). Por outro lado, estudos de estrutura de população do patógeno baseados

em polimorfismo de fragmentos de restrição detectados com sonda MGR 586 têm sido usados para revelar padrões de sub-estruturação de populações do patógeno em diferentes países. A correlação entre sub-população e “linhagens” definidas nos estudos com a sonda MGR 586 não é conhecida.

Análises de estrutura de populações do *M. grisea* utilizando a sonda MGR 586 detectaram grupos distintos do patógeno ou linhagens *sensu* Levy *et al.* (1993), supostamente com propagação clonal, em diferentes regiões ou áreas de arroz. Estes grupos descritos e geneticamente relacionados são aparentemente provenientes de um ancestral comum (Hamer *et al.*, 1989; Levy *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Zeigler *et al.*, 1995; Fillipi *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 2000).

Entre os exemplos de diversidade genética e estruturação moderadas incluem-se a descrição de populações de *M. grisea* provenientes de dois locais de teste na China, separados por apenas 40 km, que foram consideradas geneticamente distintas com base em polimorfismo de fragmento de restrição (Chen *et al.*, 1995). A genotipagem de 79 isolados coletados de lavouras comerciais por mais de 30 anos no sul dos EUA utilizando a sonda MGR586 possibilitou agrupar os isolados em oito linhagens distintas (Levy *et al.*, 1991). Cada linhagem foi associada a um ou dois patótipos do patógeno, e a maioria delas foi específica. Em campos experimentais de Santa Rosa, na Colômbia, a análise de mais de 100 isolados, coletados de 15 cultivares, com a sonda MGR 586, possibilitou a detecção de seis linhagens distintas do patógeno. Os índices de similaridade dentro de cada linhagem variaram de 92 a 98% e, entre linhagens, de 37 a 85% (Levy *et al.*, 1993). A análise de 62 isolados coletados de lavouras de arroz na Coreia resultou em 16 linhagens, apresentando 80% de similaridade média (Han *et al.*, 1993).

Entre os exemplos de baixa diversidade genética e baixo nível de estruturação incluem-se os relatos de isolados pouco polimórficos coletados no Sul do Brasil (Brondani *et al.*, 2000). No Estado de Arkansas, EUA, polimorfismo de DNA detectado pela sonda MGR-586 possibilitou a identificação de apenas quatro linhagens distintas do patógeno, com base na análise de 470 isolados monospóricos. Os estudos em Arkansas demonstraram variação restrita e limitada a cada local (Xia *et al.*, 1993). No Japão, diferentes linhagens foram identificadas em isolados coletados na década de 70, mas somente duas linhagens nos isolados coletados durante 1993 a 1997. As linhagens da década de 70 desapareceram, possivelmente devido à introdução de cultivares resistentes que apresentaram resistência para todos os membros das linhagens (Don *et al.*, 1999)

Entre os exemplos de alta diversidade genética e acentuado nível de estruturação incluem-se estudos realizados por Garrido (2001), que identificou elevada diversidade genética entre isolados de *M. grisea* coletados em diferentes regiões do Brasil, bem como entre isolados oriundos de cultivares de arroz irrigado, arroz de terras altas e de outras gramíneas. Na China, 54 linhagens de MGR586 foram identificadas em uma coleção de 473 isolados, provenientes de 144 locais, em um período de 16 anos (Shen *et al.*, 1996). Em contraste com o limitado número de linhagens nos EUA, Colômbia e Filipinas, a análise molecular utilizando MGR-586 de 64 isolados brasileiros coletados das cultivares de arroz irrigado e de terras altas nos campos experimentais da Embrapa Arroz e Feijão mostrou que os isolados pertencem a 18 linhagens e 15 patótipos (Fillipi *et al.*, 1996). No presente estudo, utilizando marcadores microssatélites, os isolados de brusone oriundos de municípios vizinhos do Estado de Tocantins (Formoso, Dueré, Lagoa da Confusão) apresentam grande diversidade genética, mas em sua grande maioria (85%) foram incluídos em uma mesma sub-população, contrastando com isolados de outras regiões (Luiz Alves, GO; Paragominas, PA), que, respectivamente, em sua maioria, agruparam-se em sub-populações distintas.

A constatação de estruturação em populações de isolados de *M. grisea* do Centro-Norte do Brasil tem implicações imediatas para os programas de melhoramento genético visando resistência ao patógeno. A alta diversidade genética do patógeno implica na necessidade de adoção de metodologias que desfavoreçam o desenvolvimento de epidemias de brusone. O emprego de resistência vertical em programas clássicos de retrocruzamento tem levado à quebra de resistência nas novas cultivares logo após o lançamento (Rangel, 2006). A alta diversidade do patógeno favorece o desenvolvimento de raças capazes de infectar as novas cultivares lançadas. O desenvolvimento e adoção de multilinhas formadas por linhagens quase-isogênicas que se diferenciam por genes de resistência de diferentes fontes (piramidização indireta) parece ser uma alternativa interessante para ser explorada por programas de melhoramento em áreas com alta diversidade do patógeno (P.H.N. Rangel; M.E. Ferreira, comunicação pessoal). Vale mencionar que a estruturação da população do patógeno sinaliza para a necessidade de desenvolvimento de cultivares específicas para cada área referente a uma sub-população. Assim, a região de Formoso, Dueré e Lagoa da Confusão, no Estado do Tocantins, deve ser monitorada para a diversidade racial do patógeno com vistas a desenvolver cultivares ou multilinhas específicos, resistentes às raças predominantes na região. De modo similar, os programas de melhoramento devem monitorar as raças predominantes em outras sub-populações, como em Luiz Alves (GO) e Paragominas (PA), com vistas a desenvolvimento de materiais específicos para estas

regiões. Por fim, é importante aprofundar o estudo de isolados coletados na Região Amazônica, visto que aparentemente constituem um grupo diferente dos isolados encontrados em Tocantins e Goiás. Os isolados do Estado do Pará (Paragominas) são facilmente discriminados dos isolados das outras regiões com base no polimorfismo de DNA observado em locos microssatélites. No entanto, não há nada que indique que esta diferenciação esteja correlacionada com a aparente ausência de epidemias de brusone com alto impacto em produtividade na região amostrada.

4 CONCLUSÕES

- Os marcadores microssatélites mostraram-se altamente eficientes para estimar a diversidade genética e detectar estruturação em população de isolados monospóricos de *M. grisea*.
- Alguns marcadores selecionados apresentam um conteúdo informativo elevado, facilitando a genotipagem em escala e propiciando alta eficiência na análise de polimorfismo de DNA.
- A população de isolados de *M. grisea* apresentou subestruturação em três sub-populações. Os isolados de Goiás (Luiz Alves) em sua maioria são observados no Grupo 1; os isolados de Tocantins (Formoso, Dueré e Lagoa da Confusão) em sua maioria são observados no Grupo 2 e os isolados do Pará (Paragominas) são observados no Grupo 3.
- Os isolados do Pará são os mais distantes geneticamente em relação aos isolados de Goiás e Tocantins.
- A alta diversidade genética observada na população de isolados, assim como a evidência de estruturação sugerem a necessidade de monitoramento específico e emprego de estratégias adequadas (ex., multilinhas, piramidização) pelos programas de melhoramento genético para as sub-populações detectadas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams SD, Kim J, Jensen R, Marcus L, Slice DE, Walker J (2002) NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analyses system, versão 2.10 Z. Applied Biostatics.
- Ahn S W (1994) International collaboration on breeding for resistance to rice blast. In: Zeigler R S, Leong S A, Teng P S. (Eds) Rice Blast disease. Wallingford. CAB International. 137-153.
- Bowcock M, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. Nature 368: 455-457.
- Brondani C, Brondani R P V, Garrido L R, Ferreira M E (2000) Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. Genetics and Molecular Biology 23(4):753-762.
- Brondani R P, Grattapaglia D (2001) Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. Biotechniques 4(793) 795-793.
- Brondani C, Rangel N, Brondani V, Ferreira E (2002). QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 104(6-7): 1192-1203.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis models and estimation procedures. American journal human genetics. 19(3):233-257
- Chen D H, Zeigler R, Leungh H, Nelson R J (1995) Population structure of *Magnaporthe grisea* at two screening site in the Phillipines. Phytopathology 85(9) 1011-1020.
- Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Mccouch S R (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 95(4):553-567.
- Cregan PB, Bhagwat AA, Akkaya MS, Rongwen J (1994) Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean Methods in Molecular and Cellular Biology 5:49-61.

Don L D, Kusaba M, Urashima A S, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S (1999) Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 65(1) 15-24.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8):2611-20.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164(4):1567-87.

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética: Embrapa-Cenargen. Brasília, 3:120 p.

Fillipi MC, Prabhu AS, Levy EM (1996) Espectro de virulência de isolados e linhagens de *Magnaporthe grisea* em arroz. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 21: 398, ago.1996. Suplemento, ref.383. Edição de Resumos do XXIX Congresso de Fitopatologia, Campo Grande, MS, ago.

Garrido LR (2001) 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*). Tese de Doutorado. Brasília, DF: Universidade de Brasília.

Goldstein DB, Clark AG (1995) Microsatellite variation in north-american populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* 23(19):3882-3886.

Hammer JE, Farral I, Orbach MJ, Valent B, Chumley FG (1989) Host species specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(24):9981-9985.

Han S S, RA D S, Nelson R (1993) Comparison of RFLP based phylogenetic trees and pathotypes of *Magnaporthe oryzae* in Korea. *Journal of Agricultural Science*. 35(1):315-323.

Hearne CM, Ghosh, S, Todd JA (1992) Microsatellites for linkage analysis of genetic-traits. *Trends in Genetics* 8(8):288-294.

Hoshino AA, Palmieri DA, Bravo JP, Pereira TEB, Lopes CR, Gimenes MA (2002) Marcador microssatélite na conservação do germoplasma vegetal. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 5(29):146-150.

Hummel S, Schultes T (2000) From skeletons to fingerprints - STR typing of ancient DNA. *Ancient Biomolecules* 3:103-116.

Idury, R.M, Cardon, LR (1997) A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Research* 7:1104-1109.

Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11(10):424-429.

Kaye C, Milazzo J, Rozenfend S, Lebrun MH, Tharreau D (2003) *Fungal Genetics and biology* 40:207-214.

Levy M, Romão J, Marchetti MA, Hammer J (1991) DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *The plant cell* 3(1): 95-102.

Levy M, Correa-Victoria FJ, Zeigler RS, Xu S, Hammer JE (1993) Genetic diversity of the rice blast fungus in disease nursery in Colombia. *Phytopathology* 83(12):1427-1433.

Liu K, Muse SU (2005) PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21(9):2118-2129

McDonald BA (1997) The populations genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-453.

Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583.

Ou SH (1985) *Rice diseases*. Wallingford: CAB.

Powell W, Machray G C, Provan J (1996) Polymorfism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science* 1:211-222.

Prabhu AS, Filippi MC (2006) Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão 388 p.

Prabhu AS, Filippi MC, Araújo LG, Faria JC (2002) Genetic and phenotypic characterization of isolates of *Magnaporthe grisea* from rice cultivars Epagri 108 and Epagri 109 in the State of Tocantins. *Fitopatologia Brasileira* 27(6):566-573

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945 – 959.

Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution* 8(8):285-292.

Rangel PHN (2006) Mapeamento genético e piramidização de genes de resistência no desenvolvimento de multilinhas e cultivares compostas de arroz irrigado com resistência estável à brusone (*Magnaporthe grisea*). Relatório Técnico. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.

Rosenberg NA (2004). Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138.

Russel J, Fuller J, Young G, Thomas B, Taramino G, Macaulay M, Waugh R, Powell W (1997) Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40:442-450.

Shen Y, Zhu P, Yuan X, Zhao X, Manry J, Rojas C, Shahjahan AKM, Levy M (1996) The genetic diversity and geographic distribution of *Magnaporthe grisea* in China. *Scientia Agricultura Sinica*. 29(4):39-46.

Silva LMA (2008) Identificação de raças e análise de virulência de *Magnaporthe grisea* para composição de multilinhas e variedades compostas de arroz irrigado no estado do Tocantins. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Tocantins. Gurupi-TO

Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification, Freeman & Co.

Xia JQ, Correl JC, Lee FN, Marchetti MA, Rhoads DD (1993) DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Pyricularia grisea* (*Magnaporthe grisea*) population in two rice fields in Arkansas. *Phytopathology* 83(10):1029-1035.

Xia JQ, Correl JC, Lee FN, Ross WJ, Rhoads DD (2000) Regional population diversity of *Magnaporthe grisea* in Arkansas and the influence of host selection. *Plant disease* 84(8): 877-884.

Zeigler RS, Cuoc LX, Scott RP, Bernardo MA, Chen DH, Valent B, Nelson RJ (1995) The relationship between lineage and virulence in *Magnaporthe grisea* in the Philippines. *Phytopathology* 85(4):443-451.

Zeigler RS (1998) Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology* 36:249-276.

Zheng Y, Zhang G, Lin FC, Wang ZH, Jin GL, Yang L, Wang Y, Chen X, Xu ZH, Zhao XQ, Wang HK, Lu JP, Lu GD, Wu WR (2008) Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* 45(10):1340-1347.

ANEXOS

Anexo 1. Dados de crescimento micelial *in vitro* (mm²) de 35 isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea*, aos 3,6,9 e 12 dias após a repicagem (DAR) em 4 repetições (REP). UnB/Embrapa CENARGEN, Brasília-DF.

Isolado	Repetição	3 DAR	6 DAR	9 DAR	12 DAR	Isolado	Repetição	3 DAR	6 DAR	9 DAR	12 DAR
F-1	1	407,0	1149,9	2780,5	3741,5	LC-8	3	254,9	1332,3	3096,8	4811,8
F-1	2	343,6	1216,2	1980,9	3741,5	LC-8	4	372,9	1375,5	2832,6	4456,1
F-1	3	232,2	722,1	2837,3	4041,8	F-9	1	257,5	1158,1	2719,5	4320,4
F-1	4	287,8	1139,7	2458,6	4410,6	F-9	2	285,3	916,9	2640,8	4277,5
LC-1	1	541,3	1394,5	2760,1	3383,0	F-9	3	239,1	841,3	2292,8	3419,5
LC-1	2	273,3	1363,2	2146,5	3608,1	F-9	4	190,6	839,5	2056,1	3224,0
LC-1	3	414,6	1055,6	2964,1	4033,9	F-8	1	229,2	891,3	2057,5	3482,4
LC-1	4	356,6	1271,5	2807,2	4314,5	F-8	2	372,3	1109,3	2794,6	4412,6
LC-2	1	523,4	1154,0	2045,3	4075,9	F-8	3	303,7	1393,4	2943,0	4072,1
LC-2	2	293,8	1632,6	2375,0	4408,7	F-8	4	235,1	1074,4	2622,5	4298,9
LC-2	3	353,1	1036,1	1896,6	4020,1	LC-6	1	233,1	1182,8	2832,6	4256,2
LC-2	4	339,0	643,8	1481,1	3667,3	LC-6	2	342,5	1325,7	2738,2	4186,7
F-2	1	238,1	980,4	2807,2	3611,7	LC-6	3	326,3	1321,3	3188,6	4604,0
F-2	2	254,4	1184,9	2663,9	3927,4	LC-6	4	278,6	1313,7	3175,2	4483,9
F-2	3	336,6	1259,7	2485,3	3994,7	F-10	1	205,5	964,3	2267,2	3553,0
F-2	4	259,6	1141,7	2560,2	4353,6	F-10	2	269,5	991,8	2557,2	4032,4
F-3	1	329,7	1262,9	2604,2	4000,4	F-10	3	241,7	1197,4	2531,6	4326,2
F-3	2	318,3	1307,2	2636,2	4412,6	F-10	4	243,2	1009,0	2578,4	4119,7
F-3	3	387,0	1010,0	2985,2	4202,1	LA-1	1	239,6	991,8	2251,6	3996,6
F-3	4	303,7	1277,9	2872,3	4159,8	LA-1	2	372,3	1112,8	3058,8	4242,6
73	1	637,5	1498,4	3415,5	4075,9	LA-1	3	330,6	1239,5	2605,7	3921,8
73	2	237,6	1439,7	2291,4	3825,6	LA-1	4	336,6	1107,3	2241,6	3185,2
73	3	237,1	823,7	2555,7	3683,5	F-10	1	299,2	1121,4	2301,4	3608,1
73	4	323,4	1233,1	2454,2	4110,1	F-10	2	295,9	1226,8	2452,7	3836,7
D-1	1	154,1	623,7	2083,8	2870,7	F-10	3	351,9	1221,5	2527,1	3568,9
D-1	2	174,4	678,4	1865,4	3171,8	F-10	4	341,3	1276,9	2605,7	3908,8
D-1	3	248,3	657,0	1951,7	2563,3	LC-7	1	273,8	1294,1	2964,1	4334,0
D-1	4	182,9	922,4	2267,2	4119,7	LC-7	2	238,6	1288,7	2426,2	3792,6
LC-4	1	208,8	864,4	2382,3	3393,4	LC-7	3	293,8	1455,7	3256,2	4685,0
LC-4	2	198,5	862,6	2509,2	4121,6	LC-7	4	354,3	1522,9	3148,4	4509,8
LC-4	3	279,7	933,5	2996,6	4213,6	LA-2	1	375,9	1364,3	3017,8	4373,2
LC-4	4	263,8	961,5	2504,7	4167,5	LA-2	2	341,9	1469,5	2973,8	4404,7
F-4	1	359,0	1174,6	2673,1	3918,1	LA-2	3	389,4	1601,2	3188,6	4840,7

Anexo 1. Continuação

Isolado	Repetição	3 DAR	6 DAR	9 DAR	12 DAR	Isolado	Repetição	3 DAR	6 DAR	9 DAR	12 DAR
F-4	2	197,1	1418,2	2217,7	3505,3	LA-2	4	429,3	1518,3	3078,6	4298,9
F-4	3	362,6	1175,6	2941,4	4015,4	PA-6	1	280,7	1119,4	2557,2	4157,9
F-4	4	343,6	1256,5	2561,7	3727,0	PA-6	2	217,5	1265,1	2435,0	4285,3
D-2	1	206,9	794,3	2518,2	3252,8	PA-6	3	271,4	1321,3	2848,4	4575,9
D-2	2	210,7	762,0	2364,9	3081,9	PA-6	4	340,1	1359,9	2778,9	4392,9
D-2	3	184,7	668,9	2330,1	3165,1	PA-4	1	209,8	1071,4	2648,5	4094,9
D-2	4	156,6	816,8	2128,6	3151,7	PA-4	2	197,1	1245,8	2330,1	4053,2
D-3	1	235,1	944,6	2702,5	3723,3	PA-4	3	248,5	1227,8	2673,1	4381,1
D-3	2	102,9	1195,3	1986,2	4314,5	PA-4	4	285,0	1240,5	2657,7	4180,9
D-3	3	318,3	1011,9	2617,9	3810,9	PA-3	1	171,8	895,0	2057,5	3638,6
D-3	4	193,8	1065,5	2587,5	4353,6	PA-3	2	221,8	1006,1	1911,0	2947,9
D-4	1	293,8	1041,9	2816,7	3651,1	PA-3	3	250,3	1163,2	2700,9	4551,8
D-4	2	286,1	1115,3	2802,4	4030,5	PA-3	4	267,4	1253,3	2657,7	4318,4
D-4	3	363,8	974,7	3075,3	4225,2	PA-2	1	155,8	809,8	1964,9	3643,9
D-4	4	330,9	1275,8	2800,9	4575,9	PA-2	2	189,3	1134,6	2300,0	3914,4
LC-5	1	377,8	982,2	2584,4	3239,2	PA-2	3	217,9	1239,5	2954,3	4420,5
LC-5	2	347,2	889,5	2567,8	3390,0	PA-2	4	265,9	1124,4	2405,7	3728,8
LC-5	3	318,3	748,6	1178,7	1907,0	PA-7	1	212,6	924,2	2152,1	3708,8
LC-5	4	367,4	811,5	1776,0	2973,8	PA-7	2	346,6	1282,3	2861,2	4312,6
F-5	1	382,0	1327,9	1963,6	4424,5	PA-7	3	364,4	1430,6	2949,5	4402,8
F-5	2	443,7	1287,6	2704,0	4232,9	PA-7	4	332,6	1167,3	2639,3	4148,3
F-5	3	375,9	1500,8	2939,8	4349,7	PA-1	1	298,1	1171,5	2557,2	3705,2
F-5	4	342,5	1446,6	2947,9	4624,2	PA-1	2	232,6	1428,4	2797,8	4045,6
F-1 B	1	152,4	826,3	2470,5	4102,5	PA-1	3	281,3	1318,1	2859,6	4632,3
F-1 B	2	129,5	837,8	2185,4	4186,7	PA-1	4	334,9	1381,0	2670,0	4173,2
F-1 B	3	186,5	1268,3	2722,6	4256,2	PA-8	1	251,8	1121,4	2466,0	4225,2
F-1 B	4	299,2	1191,1	2350,4	3736,1	PA-8	2	334,9	1448,9	2851,6	4152,1
F-3 B	1	179,3	1034,1	2636,2	3951,7	PA-8	3	310,1	1530,0	3579,6	4318,4
F-3 B	2	178,4	1305,0	2461,6	3699,8	PA-8	4	348,9	1295,2	3218,9	4571,8
F-3 B	3	273,3	1478,7	3168,5	4547,8	PA-5	1	313,2	998,4	2210,6	3781,6
F-3 B	4	265,3	1175,6	3022,7	4310,6	PA-5	2	395,0	1048,8	2561,7	4295,0
PA-1	1	230,7	988,9	2219,1	3645,7	PA-5	3	364,4	989,9	2245,9	3799,9
PA-1	2	395,0	1444,3	3537,0	4202,1	PA-5	4	308,7	952,1	2209,2	3579,6
PA-1	3	358,4	1632,6	3390,0	4902,8	PA-9	1	292,1	1202,6	2845,3	3862,5
PA-1	4	432,6	1600,0	3417,7	4175,2	PA-9	2	295,1	1219,9	2923,7	4507,8
LC-8	1	213,1	1001,3	2356,2	3669,1	PA-9	3	339,0	1190,1	2810,4	4322,3
LC-8	2	239,1	1125,4	2307,1	4098,7	PA-9	4	310,4	1296,3	2648,5	4256,2

Anexo 2. Dados de avaliações em plantas do número de dias do período de incubação (PI) e período de latência (PL) após a inoculação com 35 isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea* nas cultivares de arroz Caloro (C), Fanny (F) e Oryzica Llanos 5 (OL-5) em 4 repetições (REP). UnB/Embrapa CENARGEN, Brasília-DF.

Cultivar	Isolado	REP	PI	PL	Cultivar	Isolado	REP	PI	PL	Cultivar	Isolado	REP	PI	PL
C	LC-1	1	3	6	F	LC-1	1	3	6	OL-5	LC-1	1	4	9
C	LC-1	2	3	6	F	LC-1	2	3	6	OL-5	LC-1	2	4	9
C	LC-1	3	3	6	F	LC-1	3	3	6	OL-5	LC-1	3	4	9
C	LC-1	4	3	6	F	LC-1	4	3	6	OL-5	LC-1	4	4	9
C	F-1	1	2	5	F	F-1	1	3	5	OL-5	F-1	1	4	6
C	F-1	2	3	6	F	F-1	2	3	6	OL-5	F-1	2	4	6
C	F-1	3	3	5	F	F-1	3	3	5	OL-5	F-1	3	4	6
C	F-1	4	3	5	F	F-1	4	3	5	OL-5	F-1	4	4	6
C	LC-2	1	3	6	F	LC-2	1	3	6	OL-5	LC-2	1	3	6
C	LC-2	2	3	6	F	LC-2	2	3	6	OL-5	LC-2	2	3	6
C	LC-2	3	3	6	F	LC-2	3	3	6	OL-5	LC-2	3	3	6
C	LC-2	4	3	5	F	LC-2	4	3	5	OL-5	LC-2	4	3	6
C	F-2	1	1	2	F	F-2	1	1	2	OL-5	F-2	1	3	6
C	F-2	2	1	2	F	F-2	2	1	2	OL-5	F-2	2	3	6
C	F-2	3	1	2	F	F-2	3	1	2	OL-5	F-2	3	3	6
C	F-2	4	1	2	F	F-2	4	1	2	OL-5	F-2	4	3	6
C	F-3	1	3	6	F	F-3	1	3	6	OL-5	F-3	1	5	0
C	F-3	2	3	6	F	F-3	2	3	6	OL-5	F-3	2	5	0
C	F-3	3	3	6	F	F-3	3	3	6	OL-5	F-3	3	5	0
C	F-3	4	3	5	F	F-3	4	3	6	OL-5	F-3	4	5	0
C	73	1	4	5	F	73	1	4	5	OL-5	73	1	6	0
C	73	2	4	5	F	73	2	4	5	OL-5	73	2	6	0
C	73	3	4	6	F	73	3	4	6	OL-5	73	3	6	0
C	73	4	4	5	F	73	4	4	5	OL-5	73	4	6	0
C	D-1	1	3	8	F	D-1	1	2	6	OL-5	D-1	1	2	0
C	D-1	2	3	8	F	D-1	2	2	7	OL-5	D-1	2	2	0
C	D-1	3	3	7	F	D-1	3	2	6	OL-5	D-1	3	2	0
C	D-1	4	3	8	F	D-1	4	2	6	OL-5	D-1	4	2	0
C	LC-4	1	3	5	F	LC-4	1	3	5	OL-5	LC-4	1	3	9
C	LC-4	2	3	5	F	LC-4	2	3	5	OL-5	LC-4	2	3	9
C	LC-4	3	3	6	F	LC-4	3	3	6	OL-5	LC-4	3	3	9
C	LC-4	4	3	5	F	LC-4	4	3	5	OL-5	LC-4	4	3	9
C	F-4	1	4	6	F	F-4	1	4	6	OL-5	F-4	1	4	0

Anexo 2. Continuação														
Cultivar	Isolado	REP	PI	PL	Cultivar	Isolado	REP	PI	PL	Cultivar	Isolado	REP	PI	PL
C	F-4	2	4	6	F	F-4	2	4	6	OL-5	F-4	2	4	0
C	F-4	3	4	6	F	F-4	3	4	6	OL-5	F-4	3	4	0
C	F-4	4	4	6	F	F-4	4	4	6	OL-5	F-4	4	4	0
C	D-2	1	3	6	F	D-2	1	3	6	OL-5	D-2	1	3	9
C	D-2	2	3	6	F	D-2	2	3	6	OL-5	D-2	2	3	9
C	D-2	3	3	6	F	D-2	3	3	6	OL-5	D-2	3	3	9
C	D-2	4	3	6	F	D-2	4	3	6	OL-5	D-2	4	3	9
C	D-3	1	3	9	F	D-3	1	5	9	OL-5	D-3	1	3	0
C	D-3	2	3	8	F	D-3	2	6	9	OL-5	D-3	2	3	0
C	D-3	3	3	8	F	D-3	3	6	9	OL-5	D-3	3	3	0
C	D-3	4	3	8	F	D-3	4	6	9	OL-5	D-3	4	3	0
C	D-4	1	3	6	F	D-4	1	3	6	OL-5	D-4	1	4	0
C	D-4	2	3	6	F	D-4	2	3	6	OL-5	D-4	2	4	0
C	D-4	3	2	6	F	D-4	3	3	6	OL-5	D-4	3	3	0
C	D-4	4	3	6	F	D-4	4	3	6	OL-5	D-4	4	4	0
C	LC-5	1	2	7	F	LC-5	1	3	7	OL-5	LC-5	1	3	0
C	LC-5	2	2	6	F	LC-5	2	3	8	OL-5	LC-5	2	3	0
C	LC-5	3	2	6	F	LC-5	3	3	8	OL-5	LC-5	3	3	0
C	LC-5	4	2	6	F	LC-5	4	3	8	OL-5	LC-5	4	3	0
C	F-5	1	3	5	F	F-5	1	2	5	OL-5	F-5	1	6	8
C	F-5	2	3	6	F	F-5	2	3	6	OL-5	F-5	2	6	7
C	F-5	3	3	6	F	F-5	3	3	6	OL-5	F-5	3	6	8
C	F-5	4	3	6	F	F-5	4	3	6	OL-5	F-5	4	6	8
C	F-1 B	1	3	6	F	F-1 B	1	3	5	OL-5	F-1 B	1	4	11
C	F-1 B	2	3	6	F	F-1 B	2	4	5	OL-5	F-1 B	2	3	11
C	F-1 B	3	4	5	F	F-1 B	3	3	5	OL-5	F-1 B	3	4	10
C	F-1 B	4	3	7	F	F-1 B	4	3	6	OL-5	F-1 B	4	3	11
C	F-3 B	1	3	6	F	F-3 B	1	3	6	OL-5	F-3 B	1	5	0
C	F-3 B	2	4	6	F	F-3 B	2	3	6	OL-5	F-3 B	2	5	0
C	F-3 B	3	3	6	F	F-3 B	3	4	5	OL-5	F-3 B	3	5	0
C	F-3 B	4	3	6	F	F-3 B	4	3	6	OL-5	F-3 B	4	5	0
C	PA-1	1	4	5	F	PA-1	1	4	5	OL-5	PA-1	1	5	0
C	PA-1	2	4	6	F	PA-1	2	4	6	OL-5	PA-1	2	5	0
C	PA-1	3	4	6	F	PA-1	3	4	6	OL-5	PA-1	3	5	0
C	PA-1	4	3	5	F	PA-1	4	3	5	OL-5	PA-1	4	5	0
C	PA-2	1	3	5	F	PA-2	1	3	5	OL-5	PA-2	1	6	11
C	PA-2	2	4	5	F	PA-2	2	3	5	OL-5	PA-2	2	5	11
C	PA-2	3	4	6	F	PA-2	3	3	6	OL-5	PA-2	3	6	11

Anexo 2. Continuação														
Cultivar	Isolado	REP	PI	PL	Cultivar	Isolado	REP	PI	PL	Cultivar	Isolado	REP	PI	PL
C	PA-2	4	3	6	F	PA-2	4	3	6	OL-5	PA-2	4	5	11
C	F-8	1	4	7	F	F-8	1	3	7	OL-5	F-8	1	6	0
C	F-8	2	4	8	F	F-8	2	4	8	OL-5	F-8	2	4	0
C	F-8	3	3	6	F	F-8	3	4	6	OL-5	F-8	3	6	0
C	F-8	4	4	6	F	F-8	4	3	6	OL-5	F-8	4	4	0
C	LC-6	1	3	6	F	LC-6	1	3	6	OL-5	LC-6	1	6	0
C	LC-6	2	3	6	F	LC-6	2	3	6	OL-5	LC-6	2	6	0
C	LC-6	3	3	6	F	LC-6	3	3	7	OL-5	LC-6	3	6	0
C	LC-6	4	4	6	F	LC-6	4	4	6	OL-5	LC-6	4	6	0
C	D-5	1	5	9	F	D-5	1	5	8	OL-5	D-5	1	6	0
C	D-5	2	5	9	F	D-5	2	5	9	OL-5	D-5	2	6	0
C	D-5	3	5	9	F	D-5	3	6	9	OL-5	D-5	3	6	0
C	D-5	4	5	9	F	D-5	4	6	9	OL-5	D-5	4	6	0
C	PA-3	1	4	6	F	PA-3	1	4	6	OL-5	PA-3	1	5	0
C	PA-3	2	4	6	F	PA-3	2	4	6	OL-5	PA-3	2	5	0
C	PA-3	3	4	6	F	PA-3	3	4	6	OL-5	PA-3	3	5	0
C	PA-3	4	4	6	F	PA-3	4	4	6	OL-5	PA-3	4	5	0
C	PA-4	1	3	5	F	PA-4	1	3	5	OL-5	PA-4	1	6	0
C	PA-4	2	4	5	F	PA-4	2	4	5	OL-5	PA-4	2	6	0
C	PA-4	3	3	5	F	PA-4	3	3	5	OL-5	PA-4	3	6	0
C	PA-4	4	3	6	F	PA-4	4	3	6	OL-5	PA-4	4	6	0
C	F-9	1	3	4	F	F-9	1	2	4	OL-5	F-9	1	3	9
C	F-9	2	3	5	F	F-9	2	3	5	OL-5	F-9	2	4	9
C	F-9	3	4	6	F	F-9	3	3	6	OL-5	F-9	3	4	9
C	F-9	4	3	6	F	F-9	4	3	6	OL-5	F-9	4	4	10
C	LA-1	1	3	5	F	LA-1	1	3	6	OL-5	LA-1	1	6	0
C	LA-1	2	3	5	F	LA-1	2	3	6	OL-5	LA-1	2	6	0
C	LA-1	3	4	6	F	LA-1	3	4	6	OL-5	LA-1	3	6	0
C	LA-1	4	4	6	F	LA-1	4	4	6	OL-5	LA-1	4	6	0
C	PA-5	1	4	6	F	PA-5	1	4	6	OL-5	PA-5	1	5	0
C	PA-5	2	3	6	F	PA-5	2	3	6	OL-5	PA-5	2	4	0
C	PA-5	3	3	6	F	PA-5	3	3	6	OL-5	PA-5	3	5	0
C	PA-5	4	3	6	F	PA-5	4	3	6	OL-5	PA-5	4	5	0
C	PA-6	1	4	5	F	PA-6	1	3	5	OL-5	PA-6	1	5	8
C	PA-6	2	4	5	F	PA-6	2	3	5	OL-5	PA-6	2	6	9
C	PA-6	3	4	5	F	PA-6	3	3	5	OL-5	PA-6	3	6	9
C	PA-6	4	3	5	F	PA-6	4	3	5	OL-5	PA-6	4	5	9
C	PA-7	1	3	6	F	PA-7	1	3	6	OL-5	PA-7	1	4	0

Anexo 2. Continuação														
Cultivar	Isolado	REP	PI	PL	Cultivar	Isolado	REP	PI	PL	Cultivar	Isolado	REP	PI	PL
C	PA-7	2	3	5	F	PA-7	2	3	5	OL-5	PA-7	2	3	0
C	PA-7	3	4	5	F	PA-7	3	3	6	OL-5	PA-7	3	4	0
C	PA-7	4	4	5	F	PA-7	4	4	5	OL-5	PA-7	4	4	0
C	D-1	1	3	5	F	D-1	1	3	5	OL-5	D-1	1	4	0
C	D-1	2	3	5	F	D-1	2	3	5	OL-5	D-1	2	4	0
C	D-1	3	4	6	F	D-1	3	4	5	OL-5	D-1	3	4	0
C	D-1	4	3	5	F	D-1	4	3	5	OL-5	D-1	4	3	0
C	LA-2	1	5	9	F	LA-2	1	7	9	OL-5	LA-2	1	7	0
C	LA-2	2	6	9	F	LA-2	2	6	9	OL-5	LA-2	2	6	0
C	LA-2	3	6	10	F	LA-2	3	6	10	OL-5	LA-2	3	6	0
C	LA-2	4	6	9	F	LA-2	4	6	9	OL-5	LA-2	4	6	0
C	LC-7	1	3	6	F	LC-7	1	3	6	OL-5	LC-7	1	4	0
C	LC-7	2	3	7	F	LC-7	2	2	6	OL-5	LC-7	2	3	0
C	LC-7	3	4	6	F	LC-7	3	4	7	OL-5	LC-7	3	4	0
C	LC-7	4	4	6	F	LC-7	4	3	6	OL-5	LC-7	4	4	0
C	PA-9	1	3	5	F	PA-9	1	4	5	OL-5	PA-9	1	4	0
C	PA-9	2	3	5	F	PA-9	2	3	5	OL-5	PA-9	2	4	0
C	PA-9	3	4	6	F	PA-9	3	4	6	OL-5	PA-9	3	4	0
C	PA-9	4	3	6	F	PA-9	4	3	6	OL-5	PA-9	4	3	0
C	F-10	1	4	6	F	F-10	1	4	6	OL-5	F-10	1	6	0
C	F-10	2	4	6	F	F-10	2	4	6	OL-5	F-10	2	6	0
C	F-10	3	4	6	F	F-10	3	4	6	OL-5	F-10	3	6	0
C	F-10	4	4	6	F	F-10	4	4	6	OL-5	F-10	4	6	0
C	F-11	1	4	6	F	F-11	1	3	5	OL-5	F-11	1	6	12
C	F-11	2	4	6	F	F-11	2	4	5	OL-5	F-11	2	6	12
C	F-11	3	3	5	F	F-11	3	3	5	OL-5	F-11	3	5	11
C	F-11	4	4	7	F	F-11	4	4	6	OL-5	F-11	4	6	12
C	LC-8	1	4	6	F	LC-8	1	3	6	OL-5	LC-8	1	4	0
C	LC-8	2	4	6	F	LC-8	2	4	6	OL-5	LC-8	2	4	0
C	LC-8	3	3	5	F	LC-8	3	4	5	OL-5	LC-8	3	3	0
C	LC-8	4	4	6	F	LC-8	4	3	6	OL-5	LC-8	4	4	0

Anexo 3. Dados de severidade de Brusone nas folhas através da escala de notas visuais de 7 graus (0,1,3,4,5,7 e 9) aos 3,6,9 e 12 dias após a inoculação (DAR) com 35 isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea*, nas cultivares de arroz Caloro (C), Fanny (F) e Oryzica Llanos 5 (OL-5) em 4 repetições (REP). UnB/Embrapa CENARGEN, Brasília-DF.

Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12
C	F-1	1	3	4	7	7	F	F-1	1	1	4	7	7	OL-5	F-1	1	0	4	4	4
C	F-1	2	1	5	7	7	F	F-1	2	1	5	7	7	OL-5	F-1	2	0	4	4	4
C	F-1	3	1	4	5	5	F	F-1	3	1	4	5	5	OL-5	F-1	3	0	4	4	4
C	F-1	4	1	4	7	7	F	F-1	4	1	4	7	7	OL-5	F-1	4	0	4	4	4
C	LC-1	1	1	4	5	5	F	LC-1	1	1	4	5	7	OL-5	LC-1	1	0	3	4	4
C	LC-1	2	1	4	7	7	F	LC-1	2	1	4	7	9	OL-5	LC-1	2	0	3	4	4
C	LC-1	3	1	4	5	5	F	LC-1	3	1	4	5	5	OL-5	LC-1	3	0	3	4	4
C	LC-1	4	1	4	5	5	F	LC-1	4	1	4	5	7	OL-5	LC-1	4	0	3	4	4
C	LC-2	1	1	4	5	5	F	LC-2	1	1	4	7	7	OL-5	LC-2	1	1	4	5	5
C	LC-2	2	1	4	5	5	F	LC-2	2	1	4	7	7	OL-5	LC-2	2	1	4	4	4
C	LC-2	3	1	4	5	5	F	LC-2	3	1	4	5	5	OL-5	LC-2	3	1	4	4	4
C	LC-2	4	1	5	5	5	F	LC-2	4	1	5	5	7	OL-5	LC-2	4	1	4	4	4
C	F-2	1	4	4	5	5	F	F-2	1	4	4	5	5	OL-5	F-2	1	1	4	4	4
C	F-2	2	4	4	5	5	F	F-2	2	4	4	5	5	OL-5	F-2	2	1	4	4	4
C	F-2	3	4	4	4	5	F	F-2	3	5	4	5	5	OL-5	F-2	3	1	4	4	4
C	F-2	4	4	4	5	5	F	F-2	4	4	4	5	5	OL-5	F-2	4	1	4	4	4
C	F-3	1	1	4	4	4	F	F-3	1	1	4	4	5	OL-5	F-3	1	0	1	1	1
C	F-3	2	1	4	4	4	F	F-3	2	1	4	4	4	OL-5	F-3	2	0	1	1	1
C	F-3	3	1	4	5	5	F	F-3	3	1	4	4	5	OL-5	F-3	3	0	1	1	1

Anexo3. Continuação																				
Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12
C	F-3	4	1	5	5	5	F	F-3	4	1	4	4	4	OL-5	F-3	4	0	1	1	1
C	73	1	0	5	5	5	F	73	1	0	5	7	7	OL-5	73	1	0	1	1	1
C	73	2	0	5	5	5	F	73	2	0	5	7	7	OL-5	73	2	0	1	1	1
C	73	3	0	4	4	4	F	73	3	0	4	5	5	OL-5	73	3	0	1	1	1
C	73	4	0	5	5	5	F	73	4	0	5	7	7	OL-5	73	4	0	1	1	1
C	D-1	1	1	1	4	4	F	D-1	1	1	4	5	5	OL-5	D-1	1	1	3	3	3
C	D-1	2	1	1	4	4	F	D-1	2	1	1	5	5	OL-5	D-1	2	1	1	1	1
C	D-1	3	1	3	5	5	F	D-1	3	1	4	5	5	OL-5	D-1	3	3	3	3	3
C	D-1	4	1	1	4	4	F	D-1	4	1	4	7	7	OL-5	D-1	4	3	3	3	3
C	LC-4	1	1	5	7	7	F	LC-4	1	1	5	7	9	OL-5	LC-4	1	1	1	4	4
C	LC-4	2	1	5	5	5	F	LC-4	2	1	5	5	7	OL-5	LC-4	2	1	1	4	4
C	LC-4	3	1	4	5	5	F	LC-4	3	1	4	5	7	OL-5	LC-4	3	1	3	4	4
C	LC-4	4	1	5	5	5	F	LC-4	4	1	5	5	7	OL-5	LC-4	4	1	1	4	4
C	F-4	1	0	4	7	7	F	F-4	1	0	4	7	7	OL-5	F-4	1	0	1	1	1
C	F-4	2	0	4	7	7	F	F-4	2	0	4	7	7	OL-5	F-4	2	0	1	1	1
C	F-4	3	0	4	5	5	F	F-4	3	0	4	5	5	OL-5	F-4	3	0	1	1	1
C	F-4	4	0	4	5	5	F	F-4	4	0	4	5	5	OL-5	F-4	4	0	1	1	1
C	D-2	1	1	4	4	5	F	D-2	1	1	4	4	4	OL-5	D-2	1	1	1	4	4
C	D-2	2	1	4	5	5	F	D-2	2	1	4	4	5	OL-5	D-2	2	1	3	4	4
C	D-2	3	1	4	5	5	F	D-2	3	1	4	4	5	OL-5	D-2	3	1	3	4	4
C	D-2	4	1	4	5	5	F	D-2	4	1	4	4	4	OL-5	D-2	4	1	3	4	4
C	D-3	1	1	3	4	4	F	D-3	1	0	3	4	5	OL-5	D-3	1	1	1	1	1

Anexo3. Continuação																				
Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12
C	D-3	2	1	1	5	5	F	D-3	2	0	1	4	5	OL-5	D-3	2	1	1	1	1
C	D-3	3	1	1	5	5	F	D-3	3	0	1	4	5	OL-5	D-3	3	1	1	1	1
C	D-3	4	1	1	5	5	F	D-3	4	0	1	4	5	OL-5	D-3	4	1	1	1	1
C	D-4	1	1	4	4	5	F	D-4	1	1	4	5	5	OL-5	D-4	1	0	1	1	1
C	D-4	2	1	4	4	5	F	D-4	2	1	4	5	5	OL-5	D-4	2	0	1	1	1
C	D-4	3	3	4	5	5	F	D-4	3	1	4	5	5	OL-5	D-4	3	1	1	1	1
C	D-4	4	1	4	4	4	F	D-4	4	1	4	4	4	OL-5	D-4	4	0	1	1	1
C	LC-5	1	3	3	4	4	F	LC-5	1	1	1	4	4	OL-5	LC-5	1	1	1	1	1
C	LC-5	2	3	4	4	4	F	LC-5	2	1	3	4	4	OL-5	LC-5	2	1	1	1	1
C	LC-5	3	3	4	4	4	F	LC-5	3	1	1	4	4	OL-5	LC-5	3	1	1	1	1
C	LC-5	4	3	4	4	4	F	LC-5	4	1	1	4	4	OL-5	LC-5	4	1	1	1	1
C	F-5	1	1	5	5	5	F	F-5	1	3	5	7	7	OL-5	F-5	1	0	1	4	4
C	F-5	2	1	4	5	5	F	F-5	2	1	4	5	7	OL-5	F-5	2	0	1	4	4
C	F-5	3	1	4	5	5	F	F-5	3	1	4	5	5	OL-5	F-5	3	0	1	4	4
C	F-5	4	1	4	5	5	F	F-5	4	1	4	7	7	OL-5	F-5	4	0	1	4	4
C	F-1 B	1	1	4	7	7	F	F-1 B	1	1	4	7	7	OL-5	F-1 B	1	0	4	4	4
C	F-1 B	2	1	5	7	7	F	F-1 B	2	0	4	7	7	OL-5	F-1 B	2	1	4	4	4
C	F-1 B	3	0	4	7	7	F	F-1 B	3	1	5	7	7	OL-5	F-1 B	3	0	4	4	4
C	F-1 B	4	1	5	7	7	F	F-1 B	4	1	5	7	7	OL-5	F-1 B	4	1	4	4	4
C	F-3 B	1	1	4	4	4	F	F-3 B	1	1	4	4	5	OL-5	F-3 B	1	0	1	1	1
C	F-3 B	2	0	4	4	5	F	F-3 B	2	1	4	5	5	OL-5	F-3 B	2	0	1	1	1
C	F-3 B	3	1	4	4	5	F	F-3 B	3	0	5	5	5	OL-5	F-3 B	3	0	1	1	1

Anexo3. Continuação																				
Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12
C	F-3 B	4	1	4	4	5	F	F-3 B	4	1	4	4	5	OL-5	F-3 B	4	0	1	1	1
C	PA-1	1	0	5	7	9	F	PA-1	1	0	7	7	9	OL-5	PA-1	1	0	1	1	1
C	PA-1	2	0	4	7	7	F	PA-1	2	0	4	7	7	OL-5	PA-1	2	0	1	1	1
C	PA-1	3	0	4	7	7	F	PA-1	3	0	4	7	7	OL-5	PA-1	3	0	1	1	1
C	PA-1	4	1	5	7	7	F	PA-1	4	1	7	7	7	OL-5	PA-1	4	0	1	1	1
C	LC-8	1	1	7	7	7	F	LC-8	1	1	7	7	7	OL-5	LC-8	1	0	1	3	4
C	LC-8	2	0	7	7	9	F	LC-8	2	1	7	7	9	OL-5	LC-8	2	0	3	3	4
C	LC-8	3	1	5	7	7	F	LC-8	3	1	5	7	7	OL-5	LC-8	3	0	1	3	4
C	LC-8	4	1	5	7	7	F	LC-8	4	1	5	7	7	OL-5	LC-8	4	0	3	3	4
C	F-9	1	0	3	5	5	F	F-9	1	1	1	5	5	OL-5	F-9	1	0	0	1	1
C	F-9	2	0	3	5	5	F	F-9	2	0	1	5	5	OL-5	F-9	2	0	1	1	1
C	F-9	3	0	4	5	7	F	F-9	3	0	4	5	7	OL-5	F-9	3	0	1	1	1
C	F-9	4	1	4	7	7	F	F-9	4	1	4	7	7	OL-5	F-9	4	0	1	1	1
C	F-8	1	1	4	5	5	F	F-8	1	1	4	7	7	OL-5	F-8	1	0	1	1	1
C	F-8	2	1	4	5	5	F	F-8	2	1	4	5	5	OL-5	F-8	2	0	1	1	1
C	F-8	3	1	4	5	5	F	F-8	3	1	1	7	5	OL-5	F-8	3	0	1	1	1
C	F-8	4	0	4	7	5	F	F-8	4	0	4	7	7	OL-5	F-8	4	0	1	1	1
C	LC-6	1	0	1	4	5	F	LC-6	1	0	1	5	5	OL-5	LC-6	1	0	1	1	1
C	LC-6	2	0	1	4	4	F	LC-6	2	0	1	4	4	OL-5	LC-6	2	0	1	1	1
C	LC-6	3	0	1	4	5	F	LC-6	3	0	1	4	5	OL-5	LC-6	3	0	1	1	1
C	LC-6	4	0	1	4	5	F	LC-6	4	0	1	4	5	OL-5	LC-6	4	0	1	1	1
C	F-10	1	0	4	7	7	F	F-10	1	0	4	7	7	OL-5	F-10	1	0	1	1	1

Anexo3. Continuação																				
Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12
C	F-10	2	0	4	7	5	F	F-10	2	0	4	5	5	OL-5	F-10	2	0	1	1	1
C	F-10	3	0	4	5	5	F	F-10	3	0	4	5	5	OL-5	F-10	3	0	1	1	1
C	F-10	4	0	4	7	7	F	F-10	4	0	4	7	7	OL-5	F-10	4	0	1	1	1
C	LA-1	1	1	7	7	9	F	LA-1	1	1	7	7	9	OL-5	LA-1	1	0	1	1	1
C	LA-1	2	0	5	7	7	F	LA-1	2	0	5	7	7	OL-5	LA-1	2	0	3	1	1
C	LA-1	3	1	5	7	7	F	LA-1	3	1	5	5	5	OL-5	LA-1	3	0	1	1	1
C	LA-1	4	1	4	7	7	F	LA-1	4	1	4	7	7	OL-5	LA-1	4	1	1	1	1
C	F-10	1	1	9	9	9	F	F-10	1	3	9	9	9	OL-5	F-10	1	1	4	4	4
C	F-10	2	1	7	9	9	F	F-10	2	1	7	5	7	OL-5	F-10	2	0	4	5	5
C	F-10	3	0	4	7	7	F	F-10	3	1	4	7	7	OL-5	F-10	3	0	4	4	4
C	F-10	1	1	4	7	9	F	F-10	1	1	4	7	7	OL-5	F-10	1	0	3	4	4
C	LC-7	1	1	7	7	7	F	LC-7	1	1	4	7	7	OL-5	LC-7	1	0	1	1	1
C	LC-7	2	1	7	7	7	F	LC-7	2	1	4	7	7	OL-5	LC-7	2	0	1	1	1
C	LC-7	3	0	4	7	7	F	LC-7	3	0	4	5	7	OL-5	LC-7	3	0	1	1	1
C	LC-7	4	0	4	7	7	F	LC-7	4	0	4	5	7	OL-5	LC-7	4	0	1	1	1
C	LA-2	1	0	4	5	7	F	LA-2	1	0	4	5	7	OL-5	LA-2	1	0	1	1	1
C	LA-2	2	1	4	5	5	F	LA-2	2	1	4	5	5	OL-5	LA-2	2	1	1	1	1
C	LA-2	3	1	4	5	5	F	LA-2	3	1	4	5	5	OL-5	LA-2	3	0	1	1	1
C	LA-2	4	1	4	5	5	F	LA-2	4	1	4	5	5	OL-5	LA-2	4	0	1	1	1
C	PA-6	1	0	5	7	9	F	PA-6	1	1	7	7	9	OL-5	PA-6	1	0	3	5	5
C	PA-6	2	0	5	9	9	F	PA-6	2	1	5	9	9	OL-5	PA-6	2	0	1	4	4
C	PA-6	3	0	5	7	7	F	PA-6	3	1	5	7	7	OL-5	PA-6	3	0	1	4	4

Anexo3. Continuação																				
Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12
C	PA-6	4	1	5	9	9	F	PA-6	4	1	5	9	9	OL-5	PA-6	4	0	3	4	4
C	PA-4	1	1	4	7	9	F	PA-4	1	1	4	5	5	OL-5	PA-4	1	0	1	1	1
C	PA-4	2	1	5	5	5	F	PA-4	2	1	5	5	5	OL-5	PA-4	2	1	1	3	3
C	PA-4	3	0	5	5	7	F	PA-4	3	1	4	5	5	OL-5	PA-4	3	0	1	1	1
C	PA-4	4	0	5	7	7	F	PA-4	4	0	5	7	7	OL-5	PA-4	4	0	1	1	1
C	PA-3	1	1	5	9	9	F	PA-3	1	1	5	9	9	OL-5	PA-3	1	0	1	1	1
C	PA-3	2	1	5	7	9	F	PA-3	2	1	5	7	9	OL-5	PA-3	2	0	1	1	1
C	PA-3	3	0	4	7	7	F	PA-3	3	0	5	7	9	OL-5	PA-3	3	0	1	1	1
C	PA-3	4	1	7	9	9	F	PA-3	4	1	7	9	9	OL-5	PA-3	4	1	1	1	1
C	PA-2	1	0	3	4	5	F	PA-2	1	0	0	4	5	OL-5	PA-2	1	0	0	1	1
C	PA-2	2	0	1	4	5	F	PA-2	2	0	1	4	5	OL-5	PA-2	2	0	1	1	1
C	PA-2	3	0	1	3	5	F	PA-2	3	0	1	4	5	OL-5	PA-2	3	0	1	1	1
C	PA-2	4	0	1	4	4	F	PA-2	4	0	1	4	5	OL-5	PA-2	4	0	1	1	1
C	PA-7	1	1	4	4	5	F	PA-7	1	1	4	4	5	OL-5	PA-7	1	0	1	1	1
C	PA-7	2	1	1	4	4	F	PA-7	2	3	4	4	4	OL-5	PA-7	2	1	1	1	1
C	PA-7	3	0	4	4	5	F	PA-7	3	0	1	4	5	OL-5	PA-7	3	0	1	1	1
C	PA-7	4	0	4	7	5	F	PA-7	4	1	4	5	5	OL-5	PA-7	4	0	1	1	1
C	PA-1	1	1	5	7	7	F	PA-1	1	0	5	5	5	OL-5	PA-1	1	0	1	1	1
C	PA-1	2	1	5	7	7	F	PA-1	2	1	5	5	5	OL-5	PA-1	2	0	1	1	1
C	PA-1	3	0	4	5	5	F	PA-1	3	0	4	4	5	OL-5	PA-1	3	0	1	1	1
C	PA-1	4	1	4	7	7	F	PA-1	4	1	4	5	5	OL-5	PA-1	4	1	1	1	1
C	PA-8	1	0	4	5	7	F	PA-8	1	0	4	5	7	OL-5	PA-8	1	0	1	1	1

Anexo3. Continuação																				
Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12	Cultivar	Isolado	REP	3	6	9	12
C	PA-8	2	0	4	5	7	F	PA-8	2	0	4	5	7	OL-5	PA-8	2	0	1	1	1
C	PA-8	3	0	4	7	7	F	PA-8	3	0	4	7	7	OL-5	PA-8	3	0	1	1	1
C	PA-8	4	0	4	7	7	F	PA-8	4	0	4	7	7	OL-5	PA-8	4	0	1	1	1
C	PA-5	1	0	4	5	7	F	PA-5	1	1	5	5	7	OL-5	PA-5	1	0	1	1	4
C	PA-5	2	0	4	5	7	F	PA-5	2	0	5	5	7	OL-5	PA-5	2	0	1	1	4
C	PA-5	3	1	5	7	9	F	PA-5	3	1	5	5	9	OL-5	PA-5	3	0	1	1	4
C	PA-5	4	0	3	7	7	F	PA-5	4	0	4	7	7	OL-5	PA-5	4	0	1	1	4
C	PA-9	1	0	4	5	7	F	PA-9	1	0	4	7	9	OL-5	PA-9	1	0	1	1	1
C	PA-9	2	0	4	5	9	F	PA-9	2	1	4	5	9	OL-5	PA-9	2	0	1	1	1
C	PA-9	3	1	5	5	9	F	PA-9	3	1	5	7	9	OL-5	PA-9	3	1	1	1	1
C	PA-9	4	0	4	7	9	F	PA-9	4	0	4	7	9	OL-5	PA-9	4	0	1	1	1

Anexo 4A. Dados originais de genotipagem de 140 isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea* utilizando-se 31 marcadores microssatélites. UnB/Embrapa CENARGEN, Brasília-DF.

Isolado	ms 81-82	PG 36	ms 99-100	PG-21	ms 47-48	ms 109-110	ms 93-94	ms 125-126	ms 83-84	PG 04	PG 42	ms 87-88	MGM 21	PG 27	ms 107-108
107	171,39	208,32	186,43	207,95	163,46	176,20	210,96	174,60	-	-	-	179,35	144,44	207,86	325,30
11	-	-	186,51	208,17	163,54	176,32	215,95	174,31	187,04	210,92	212,16	179,61	144,23	214,58	325,32
127	170,73	-	192,51	-	-	174,10	208,21	-	-	-	-	173,37	144,46	222,35	327,32
12	211,59	208,33	186,48	210,09	163,47	176,39	216,21	174,32	187,16	220,55	212,29	179,36	144,40	220,28	325,13
148	140,84	206,54	183,65	206,03	-	174,15	209,27	186,40	172,70	205,81	-	182,33	144,36	202,43	325,52
14	147,19	189,26	-	-	-	176,13	209,04	-	183,19	184,77	-	182,26	-	-	325,22
152	211,20	208,53	186,49	208,47	-	176,38	209,74	174,65	-	224,43	210,33	179,49	144,64	218,42	325,37
154	171,64	-	183,80	204,28	161,50	174,16	209,15	186,20	-	-	-	182,24	144,39	198,52	325,29
15	116,83	210,70	186,47	210,16	163,55	176,41	208,57	174,86	187,22	212,74	212,30	179,43	144,36	218,52	325,35
161	-	194,53	195,37	194,28	163,52	174,04	206,87	-	-	-	-	220,10	144,46	232,24	325,25
164	-	194,53	183,70	204,09	161,51	174,13	208,73	174,41	-	-	-	182,50	144,29	205,83	325,14
168	171,20	210,23	186,40	210,05	163,48	176,28	-	174,53	-	-	-	-	-	-	323,43
16	141,45	206,48	-	206,08	163,52	176,21	209,08	186,32	172,40	201,44	245,74	182,35	144,52	214,35	325,25
173	170,99	210,57	195,35	194,37	163,59	174,20	208,21	-	-	-	-	220,12	144,39	232,19	325,28
186	171,48	-	192,41	256,59	-	174,22	-	-	-	-	-	173,43	144,42	220,38	326,96
188	171,50	-	186,37	208,06	163,47	176,20	-	-	-	-	-	179,43	144,38	209,78	325,33
190	116,64	208,47	186,49	208,18	163,56	176,48	-	174,48	-	-	-	-	-	-	325,47
19	-	204,85	183,52	204,37	161,59	174,20	209,53	186,38	172,39	214,41	243,64	182,31	144,42	204,28	325,29
1	-	-	186,60	210,16	163,53	176,33	208,65	174,65	-	-	-	179,45	-	220,44	-
209	116,81	208,42	183,73	204,28	161,42	174,20	208,09	186,34	-	-	-	182,33	144,35	202,40	325,34

Anexo 4A. Continuação															
Isolado	ms 81-82	PG 36	ms 99-100	PG-21	ms 47-48	ms 109-110	ms 93-94	ms 125-126	ms 83-84	PG 04	PG 42	ms 87-88	MGM 21	PG 27	ms 107-108
20	-	-	183,71	206,11	163,56	176,20	207,88	186,10	172,76	208,80	243,83	182,33	144,23	214,40	325,38
214	-	204,45	183,72	-	-	-	208,05	186,32	-	-	-	182,23	144,44	200,49	325,47
218	-	204,44	186,46	208,03	163,47	176,30	206,68	174,41	-	-	-	179,36	144,36	213,58	325,24
22	171,09	-	192,33	256,99	183,91	174,24	208,23	150,20	-	-	-	173,46	144,43	224,19	327,17
23	-	-	183,74	204,18	161,49	174,10	209,13	186,31	-	-	-	182,38	144,44	200,17	-
24	171,31	-	192,42	256,72	183,65	174,10	208,18	150,31	-	-	-	173,40	144,27	224,28	327,18
251	-	208,31	186,58	208,07	163,45	176,32	-	171,46	-	-	-	179,46	-	222,25	-
2	141,16	204,45	-	204,09	161,42	174,10	208,08	186,35	172,81	204,00	255,83	182,35	144,37	206,64	325,36
302	-	208,65	183,67	204,27	161,58	174,32	209,02	186,19	-	-	-	182,30	144,48	202,45	325,22
319	171,66	208,24	183,71	208,81	161,97	174,45	209,06	-	-	-	-	182,17	144,62	208,46	325,12
34	-	194,53	-	194,28	163,50	174,21	207,79	-	172,05	248,14	243,83	220,11	144,30	232,21	325,20
359	-	208,49	186,45	208,86	163,95	176,79	-	174,52	-	-	-	179,22	144,76	216,20	325,24
365	-	205,63	183,69	204,61	161,80	174,46	179,17	-	-	-	-	182,10	144,69	204,70	325,25
374	116,70	208,34	186,44	208,50	163,78	176,47	216,00	174,50	-	-	-	179,14	144,51	216,14	324,92
376	-	204,19	183,77	204,77	161,92	174,53	180,00	-	-	-	-	182,21	-	208,35	325,30
380	-	204,37	183,62	204,69	161,78	174,52	208,78	174,46	-	-	-	182,25	-	208,50	325,19
389	141,58	204,45	183,59	204,71	161,73	174,47	208,92	192,23	-	-	-	182,36	144,52	208,54	325,33
38	-	-	183,61	204,18	161,58	174,14	208,42	-	-	-	-	182,31	-	206,72	327,24
391	-	204,36	183,56	204,27	161,50	174,16	208,76	177,54	-	215,03	247,96	182,32	144,43	208,55	325,23
393	-	204,71	183,49	204,62	161,72	174,39	209,17	-	-	-	-	182,12	144,63	206,54	325,32
397	140,38	204,87	186,42	204,09	-	174,04	208,26	186,44	172,66	214,76	242,01	182,35	144,26	202,29	325,10
39	-	-	183,61	206,35	163,54	176,31	209,42	174,68	-	-	-	179,45	-	222,39	325,29

Anexo 4A. Continuação															
Isolado	ms 81-82	PG 36	ms 99-100	PG-21	ms 47-48	ms 109-110	ms 93-94	ms 125-126	ms 83-84	PG 04	PG 42	ms 87-88	MGM 21	PG 27	ms 107-108
3	-	-	183,63	204,27	161,59	174,20	-	174,67	-	-	-	182,33	144,49	210,48	325,18
401	140,68	204,69	183,73	204,28	161,60	174,26	209,30	192,26	172,62	214,68	247,85	182,42	144,36	200,31	325,17
403	-	208,32	195,34	208,84	163,90	176,65	215,58	-	-	-	-	179,24	-	218,16	325,33
409	135,77	194,56	183,76	194,84	163,93	174,58	199,54	-	-	-	-	219,84	-	234,02	325,33
411	141,13	204,53	-	204,18	161,49	174,10	208,07	174,44	173,06	212,80	247,84	182,33	144,41	202,13	325,27
412	141,29	204,62	186,50	-	-	-	207,97	186,22	-	210,57	245,84	182,42	144,36	200,35	325,22
413	116,67	208,42	183,70	-	-	-	172,70	-	-	-	-	179,31	144,48	220,19	325,20
416	141,19	204,62	195,43	204,09	-	174,14	208,11	186,28	172,85	210,65	245,85	182,31	144,35	200,26	325,20
417	-	194,73	186,46	-	-	-	208,40	198,55	-	-	-	219,88	144,65	234,01	325,20
418	116,60	208,38	183,59	-	-	-	172,41	-	-	-	-	179,24	-	222,16	325,33
422	-	206,38	183,63	206,60	163,86	174,55	207,76	188,98	-	-	-	182,02	-	208,63	325,19
430	-	206,36	183,75	206,49	161,79	174,36	207,91	-	-	-	-	182,17	144,82	218,33	325,30
431	-	-	183,55	204,52	161,71	174,42	208,90	191,93	-	-	-	182,19	144,60	206,68	325,30
434	171,50	208,64	161,41	-	-	-	209,15	186,23	-	-	-	-	-	-	325,22
436	141,68	204,36	186,43	204,62	161,56	174,32	208,94	186,07	-	-	-	182,25	144,66	208,37	325,21
437	-	210,38	163,60	210,76	163,71	176,51	215,38	177,49	-	-	-	179,32	144,68	214,71	325,23
439	-	204,46	186,46	204,54	163,89	174,40	208,76	186,09	-	-	-	182,29	144,59	199,79	325,21
445	-	208,34	163,60	208,41	163,59	176,47	216,03	174,43	-	-	-	179,12	-	218,26	325,18
446	141,50	204,36	183,64	204,54	161,64	174,19	207,82	186,22	-	-	-	182,12	144,52	198,88	325,42
453	-	204,27	186,53	204,35	161,38	174,23	208,78	186,14	-	-	-	182,17	-	199,35	325,24
456	-	208,62	-	208,17	163,45	176,32	208,84	174,72	186,95	220,61	208,36	179,34	-	214,54	325,22
458	-	204,36	183,61	204,52	161,61	174,21	208,56	186,11	-	-	-	182,33	-	199,81	325,32

Anexo 4A. Continuação															
Isolado	ms 81-82	PG 36	ms 99-100	PG-21	ms 47-48	ms 109-110	ms 93-94	ms 125-126	ms 83-84	PG 04	PG 42	ms 87-88	MGM 21	PG 27	ms 107-108
459	-	202,61	-	-	-	-	208,80	186,23	-	-	-	181,18	-	199,49	327,14
462	-	206,35	192,47	206,41	163,82	174,38	201,35	189,02	-	-	-	182,39	-	208,58	325,25
466	172,12	256,84	-	257,43	-	174,37	200,58	-	-	-	-	173,38	-	216,85	325,31
467	140,73	202,61	186,50	204,62	161,83	174,53	209,12	-	-	-	-	182,44	144,64	199,79	-
468	116,64	208,23	183,77	208,44	163,73	176,53	215,17	174,37	-	-	-	-	-	-	325,43
46	-	204,62	183,65	204,18	161,49	174,13	208,86	-	-	-	-	182,16	-	200,36	325,38
477	140,65	204,60	161,42	204,18	161,50	174,26	209,31	186,38	172,63	210,69	253,73	182,34	144,45	200,54	325,28
480	-	208,25	161,49	208,46	163,79	176,45	215,83	174,36	-	-	-	179,58	-	205,52	325,17
485	-	-	186,54	204,53	161,93	174,50	208,71	174,45	-	-	-	182,39	144,50	206,67	325,28
487	172,28	210,13	183,69	210,57	163,63	176,43	215,96	177,34	-	-	-	182,44	-	-	325,24
494	-	204,28	159,32	204,45	161,67	174,31	208,77	186,13	-	210,75	251,30	182,41	144,41	199,77	325,14
4	-	-	183,57	-	-	-	-	-	157,51	201,31	247,66	182,26	144,45	203,73	325,16
511	142,02	204,09	183,62	204,36	161,69	174,40	208,62	185,93	-	-	-	182,48	-	-	325,44
516	174,09	204,19	183,65	204,45	161,68	174,39	209,26	186,40	-	210,58	-	182,41	144,61	200,14	325,25
527	141,06	206,56	183,60	206,17	161,41	174,16	208,88	186,26	172,64	205,71	245,79	182,32	144,37	208,57	325,15
530	144,69	204,27	-	204,27	161,67	174,23	209,94	174,53	-	-	-	182,20	-	-	325,14
532	141,79	204,28	183,62	204,46	161,58	174,19	208,79	186,22	180,39	210,64	249,47	182,31	144,48	201,78	325,26
536	141,93	204,09	186,38	204,53	161,74	174,44	208,69	186,01	-	-	-	179,49	-	-	325,11
540	116,45	208,15	183,74	208,27	163,62	176,33	214,75	174,32	182,35	205,68	210,20	179,54	144,65	207,94	325,36
541	141,41	204,36	186,46	204,64	161,76	174,44	208,74	186,18	-	-	-	179,37	-	-	325,19
545	116,50	208,04	183,67	208,39	163,55	176,29	216,05	174,31	-	220,37	212,14	179,34	-	207,66	325,31
546	141,64	204,27	186,18	204,55	161,69	174,50	200,40	186,08	-	-	-	182,40	-	-	325,15

Anexo 4A. Continuação															
Isolado	ms 81-82	PG 36	ms 99-100	PG-21	ms 47-48	ms 109-110	ms 93-94	ms 125-126	ms 83-84	PG 04	PG 42	ms 87-88	MGM 21	PG 27	ms 107-108
547	141,09	204,54	183,60	204,18	161,50	174,26	209,10	186,38	173,21	202,03	251,63	182,25	-	200,40	325,15
552	141,91	204,18	183,64	204,71	161,90	174,53	208,47	186,13	-	210,77	251,46	182,36	144,70	200,15	325,27
553	141,84	204,09	186,57	204,46	161,60	174,36	208,73	186,04	178,38	-	-	182,49	-	-	325,26
560	-	-	183,56	208,35	163,63	176,52	215,67	177,25	-	-	-	182,49	-	-	325,31
564	-	204,09	183,70	204,27	161,60	174,23	208,53	186,19	-	-	-	182,41	-	201,84	325,34
566	174,56	206,59	-	206,18	163,53	174,33	208,27	189,12	172,64	203,64	245,85	182,40	144,26	208,51	325,33
575	116,91	210,30	183,78	206,26	161,49	176,43	215,83	177,59	187,15	230,22	210,09	179,36	-	-	325,26
57	-	-	183,69	204,28	161,51	174,24	209,07	210,68	-	-	-	182,41	144,49	202,38	327,18
584	-	204,18	-	-	-	174,45	209,52	174,24	180,28	214,71	247,68	182,40	144,47	208,65	327,11
586	172,10	-	192,37	-	-	174,47	207,57	150,06	-	-	-	173,47	144,64	224,13	325,36
587	171,98	256,77	183,69	-	-	174,29	207,60	149,92	178,19	181,08	173,17	173,50	144,43	224,32	325,38
588	-	-	183,69	206,24	161,58	174,33	207,53	186,15	172,41	205,06	245,66	182,42	144,50	201,87	325,25
5	-	-	183,72	206,22	163,49	176,19	209,26	186,32	-	-	-	182,42	-	207,84	325,32
60	-	-	183,49	204,18	161,48	174,27	209,25	174,70	-	-	-	182,29	144,44	208,57	-
611	141,55	206,26	183,62	-	-	174,21	208,54	185,99	179,13	-	-	182,35	-	204,64	325,27
616	-	-	186,47	206,44	161,68	174,39	208,39	186,22	178,92	208,87	249,49	183,89	144,42	198,59	327,17
617	116,89	210,71	183,50	210,18	163,48	176,21	209,27	174,47	186,81	218,90	208,39	179,53	-	218,45	325,29
618	141,81	206,20	192,19	206,37	161,78	174,39	207,71	185,95	178,92	208,70	-	182,39	-	204,71	325,13
628	-	-	189,30	-	-	-	207,57	150,11	171,30	172,98	167,04	173,47	-	226,32	327,33
629	172,22	208,11	186,43	208,09	163,56	176,39	218,81	174,33	190,00	209,21	212,00	179,33	-	214,44	325,36
630	-	207,96	192,40	-	-	176,45	215,54	174,14	186,45	216,37	212,10	179,42	144,41	214,40	325,30
631	170,86	-	186,48	-	-	174,27	208,38	150,36	171,48	171,76	167,39	173,41	144,25	219,16	325,43

Anexo 4A. Continuação															
Isolado	ms 81-82	PG 36	ms 99-100	PG-21	ms 47-48	ms 109-110	ms 93-94	ms 125-126	ms 83-84	PG 04	PG 42	ms 87-88	MGM 21	PG 27	ms 107-108
632	116,78	202,54	186,45	202,22	161,31	176,30	212,14	174,50	187,10	206,00	210,37	179,35	144,37	202,36	325,39
633	116,75	200,58	186,59	-	-	176,37	209,21	174,63	172,75	173,48	208,47	179,44	144,36	226,27	325,28
635	-	-	186,51	202,20	161,41	176,30	-	-	187,31	205,77	210,30	179,42	-	215,81	325,35
636	116,39	207,92	183,69	208,41	163,64	176,41	222,48	174,30	186,61	226,52	204,45	179,51	-	218,53	325,14
642	-	-	183,72	206,36	161,58	174,23	208,82	-	172,43	203,57	247,82	182,34	-	202,42	325,25
6	-	206,28	183,72	204,62	161,79	174,36	208,66	186,06	172,58	207,14	243,84	182,28	144,45	202,35	325,37
72	-	-	-	204,09	161,53	174,28	209,27	174,39	-	-	-	182,34	144,44	202,17	325,19
73	135,44	194,60	183,73	-	-	-	207,95	-	171,57	-	241,97	220,13	144,30	232,20	-
7	-	204,77	183,64	204,62	161,72	174,41	208,14	186,16	-	-	-	185,22	-	208,57	325,24
8	-	-	-	204,37	161,59	174,20	208,51	174,27	172,29	207,23	243,76	182,40	144,48	208,60	325,36
92	-	-	183,63	207,98	163,45	176,31	209,08	174,35	-	-	-	179,37	144,42	216,38	325,16
93	-	-	192,49	204,18	161,49	174,10	209,00	220,34	-	-	-	182,41	144,36	206,55	325,25
99	-	-	-	-	-	174,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	183,57	204,44	161,66	174,42	209,36	-	-	-	-	182,37	144,53	202,53	-
800	138,44	202,55	-	202,29	-	176,27	209,18	174,72	173,15	175,92	212,28	179,34	-	232,04	-
805	144,97	204,62	186,50	204,09	-	176,18	214,71	174,59	186,72	206,84	212,28	179,45	144,47	-	-
700	-	-	192,64	-	-	-	208,25	150,51	177,30	179,28	172,80	173,38	-	-	326,92
705	-	-	192,63	-	186,49	174,42	208,48	150,66	177,95	177,68	173,36	173,60	-	-	326,98
710	-	-	192,51	-	190,39	174,47	207,99	150,54	177,92	179,73	173,28	173,65	-	220,90	327,16
715	-	-	192,41	-	186,56	174,67	208,41	150,70	177,80	179,63	173,21	173,62	-	-	327,01
720	-	-	192,39	-	190,41	175,39	208,13	150,51	177,82	179,55	173,08	173,38	-	220,69	327,06
725	173,09	-	192,76	-	186,46	-	211,37	150,53	181,09	179,72	175,40	173,66	-	220,45	326,82

Anexo 4A. Continuação															
Isolado	ms 81-82	PG 36	ms 99-100	PG-21	ms 47-48	ms 109-110	ms 93-94	ms 125-126	ms 83-84	PG 04	PG 42	ms 87-88	MGM 21	PG 27	ms 107-108
730	170,71	-	-	-	-	-	-	-	177,77	177,59	173,11	173,45	-	-	326,97
735	172,85	-	192,45	-	-	-	-	-	-	-	-	173,48	-	-	-
740	-	-	192,70	-	-	174,60	207,92	150,40	177,89	-	-	173,78	-	-	326,99
745	173,15	-	192,96	-	186,56	174,58	208,46	150,61	-	-	-	173,79	-	224,66	327,03
750	172,83	-	192,59	-	186,47	174,43	211,50	150,61	-	-	-	173,40	-	220,36	327,02
760	172,48	-	192,61	-	186,43	175,68	208,46	150,64	177,61	179,40	173,06	173,60	-	224,69	326,94
770	172,80	-	192,64	206,32	186,29	174,52	208,12	150,47	177,86	177,59	173,18	173,67	-	-	326,83
775	172,85	-	192,79	206,63	186,49	175,56	208,54	150,74	180,31	175,11	181,94	173,50	-	224,65	326,89

Anexo 4B. Dados originais de genotipagem de 140 isolados monospóricos de *Magnaporthe grisea* utilizando-se 31 marcadores microsatélites. UnB/Embrapa CENARGEN, Brasília-DF.

Isolado	PG 20	PG 14	ms 41-42	ms 115-116	ms 61-62	PG 5	PG 16	PG 6	PG 19	ms 63-64	ms 67-68	PG 26	PG 9	PG 12	PG 30	ms 77-78
107	199,39	199,33	146,47	130,07	213,48	169,40	135,07	161,01	204,36	147,37	199,06	208,31	167,87	-	-	-
11	194,76	199,33	146,42	130,13	213,55	171,61	135,12	152,16	204,09	147,37	197,18	208,16	167,82	106,86	193,41	175,00
127	-	265,95	146,41	130,03	212,53	-	143,01	150,21	-	159,82	201,02	208,20	143,62	110,82	189,51	202,27
12	194,75	195,51	145,43	130,00	-	-	-	156,23	200,27	147,28	-	-	-	-	-	-
148	237,21	210,97	146,51	130,00	213,51	167,56	135,16	164,06	216,45	147,43	-	-	-	-	-	-
14	237,04	210,15	-	-	-	-	-	-	216,13	147,44	-	-	-	-	-	-
152	192,65	196,47	-	130,07	213,43	171,73	135,39	155,01	202,49	147,44	-	-	-	-	-	-
154	238,31	213,08	146,40	130,01	213,56	167,73	135,23	167,99	218,45	147,51	200,95	208,21	129,92	104,88	189,76	174,92
15	194,51	195,50	127,29	130,07	213,51	169,54	135,14	-	204,69	147,58	-	-	-	107,00	189,42	175,02
161	202,25	177,96	146,54	130,18	212,51	145,00	135,08	136,82	182,68	145,62	187,58	208,21	151,66	103,08	180,62	175,88
164	205,18	211,04	146,46	130,06	213,46	169,56	135,11	165,05	216,35	147,40	-	207,01	-	104,77	189,80	174,89
168	196,14	199,42	146,53	130,12	213,28	173,58	135,02	156,75	204,44	147,51	199,03	208,21	171,85	106,85	195,38	174,95
16	225,24	211,06	146,42	129,95	213,50	167,73	135,22	-	-	-	201,04	208,22	127,76	104,83	191,55	174,96
173	203,13	177,95	146,43	129,99	212,51	144,92	135,00	136,96	182,10	145,49	187,45	208,13	151,76	104,55	180,07	174,96
186	-	267,90	146,48	130,02	212,61	136,80	142,90	-	-	-	200,99	208,18	143,72	110,78	238,28	202,27
188	195,58	197,35	146,51	130,11	212,49	171,48	135,01	154,00	202,40	147,34	199,00	208,23	167,83	106,81	193,54	174,96
190	194,65	197,44	146,41	130,02	-	-	-	154,08	202,45	147,49	199,12	208,31	167,84	-	-	-
19	240,79	212,85	146,39	130,02	213,46	167,62	135,18	163,68	218,85	147,66	-	-	-	-	-	-
1	-	195,51	145,41	130,04	213,60	169,49	135,07	153,77	200,75	147,67	199,18	208,25	167,74	106,92	195,47	174,99
209	241,22	212,91	146,45	130,02	213,47	167,53	135,01	168,10	218,42	147,56	200,91	208,24	127,68	102,87	189,58	174,99

Anexo 4B. Continuação																
Isolado	PG 20	PG 14	ms 41-42	ms 115-116	ms 61-62	PG 5	PG 16	PG 6	PG 19	ms 63-64	ms 67-68	PG 26	PG 9	PG 12	PG 30	ms 77-78
20	241,34	209,92	146,45	130,09	213,50	167,61	135,19	-	182,69	145,59	-	-	-	104,80	191,43	174,93
214	-	207,15	146,36	129,96	213,42	167,58	135,01	166,16	212,43	147,49	200,99	208,26	127,83	104,77	189,58	174,92
218	192,65	197,45	146,43	129,99	213,47	173,64	135,17	163,12	202,41	147,41	-	-	-	-	-	-
22	191,55	208,63	146,45	130,07	212,55	136,94	143,01	150,31	-	160,43	-	-	-	-	-	-
23	195,97	210,85	146,51	130,15	213,50	167,61	135,02	-	182,71	-	201,07	208,30	127,84	104,81	189,55	175,00
24	-	265,89	145,38	129,97	212,65	136,85	143,01	-	-	159,46	201,00	208,24	143,76	-	-	-
251	-	199,42	146,43	130,06	213,46	171,56	135,11	149,94	218,27	147,55	199,04	208,09	173,90	104,82	189,58	-
2	237,30	-	-	-	213,55	167,52	135,09	-	-	-	200,95	208,22	127,82	104,75	189,57	174,96
302	241,29	212,96	146,36	129,93	213,48	167,61	135,11	-	182,46	147,35	-	-	-	104,70	189,75	174,96
319	202,23	210,92	146,37	129,89	213,51	167,91	135,52	164,09	-	-	202,91	208,23	127,84	-	-	202,19
34	194,69	177,95	146,39	130,01	212,52	144,88	-	-	204,36	145,35	-	-	-	102,73	179,79	174,97
359	237,48	197,54	146,41	129,94	213,46	171,86	135,57	136,92	220,20	147,42	199,06	208,13	169,89	-	-	-
365	194,69	214,99	146,34	129,91	212,37	167,76	135,33	161,01	218,26	147,41	200,86	208,12	129,78	-	-	-
374	198,51	197,35	146,54	130,15	213,47	169,68	135,32	168,21	216,29	147,36	-	-	-	-	-	-
376	202,40	210,98	146,41	130,02	213,60	145,26	135,46	168,19	-	-	201,06	208,15	127,81	-	-	-
380	243,37	211,09	146,38	129,96	213,43	169,83	135,37	-	182,47	147,38	200,91	208,16	127,96	-	-	201,82
389	-	211,09	146,34	129,96	212,47	167,80	135,25	165,14	-	145,49	200,91	208,16	127,88	-	-	-
38	-	210,86	146,46	130,17	213,40	167,60	135,08	136,95	-	-	201,20	208,25	127,85	104,87	189,55	175,00
391	239,20	210,89	147,00	130,24	213,52	169,68	135,06	-	216,51	147,58	201,07	208,31	127,75	104,77	189,58	174,96
393	241,13	211,03	146,35	130,00	213,38	167,79	135,30	-	206,43	147,46	200,81	208,24	127,75	-	-	197,00
397	205,73	212,97	146,44	129,96	-	167,69	-	-	-	-	-	-	-	104,77	189,53	174,94
39	241,00	201,30	146,54	130,07	213,54	171,57	135,07	-	216,86	147,44	199,06	208,20	165,78	106,80	191,62	174,89

Anexo 4B. Continuação																
Isolado	PG 20	PG 14	ms 41-42	ms 115-116	ms 61-62	PG 5	PG 16	PG 6	PG 19	ms 63-64	ms 67-68	PG 26	PG 9	PG 12	PG 30	ms 77-78
3	194,63	210,96	146,43	130,10	213,58	169,68	-	153,87	216,52	147,63	-	-	-	-	-	-
401	194,58	210,95	145,33	130,08	212,57	167,68	135,17	168,75	182,47	147,37	-	-	-	-	-	197,00
403	202,16	197,45	146,41	129,96	213,48	171,81	135,37	-	202,41	147,47	198,97	208,20	169,91	-	-	-
409	241,17	177,94	146,32	129,95	212,49	145,05	135,20	152,04	216,38	147,39	187,39	208,17	151,73	-	-	-
411	194,68	210,04	146,52	130,15	213,50	169,62	143,02	154,12	216,29	147,41	-	-	-	-	-	-
412	241,22	210,04	146,45	130,02	213,37	167,58	135,12	164,98	202,29	147,37	-	-	-	104,79	189,53	174,91
413	202,16	196,56	146,32	129,97	211,53	171,72	-	168,20	216,54	147,38	198,98	208,21	171,87	-	-	-
416	199,36	210,96	146,42	129,99	212,57	167,58	135,10	149,08	218,26	147,46	201,07	208,16	127,94	-	-	-
417	235,48	177,93	146,39	129,97	212,54	145,16	135,30	168,10	202,38	147,39	-	-	-	-	-	-
418	241,43	197,45	146,37	129,89	211,44	171,70	135,24	168,18	202,38	147,37	198,97	208,21	171,88	-	-	-
422	244,31	211,09	146,40	129,97	213,53	165,69	135,23	148,98	212,25	147,44	-	-	-	-	-	-
430	247,38	207,10	146,35	129,91	213,51	167,79	135,32	163,11	218,20	147,35	200,82	208,24	127,79	-	-	-
431	243,30	210,96	146,36	129,90	212,54	167,78	135,22	172,15	216,44	147,27	200,82	207,05	127,88	-	-	-
434	188,83	210,97	146,32	129,93	-	-	-	164,09	216,29	147,41	-	-	-	-	-	-
436	249,12	211,02	146,32	129,93	213,54	167,70	135,28	166,04	202,40	147,27	200,91	208,15	127,69	-	-	-
437	194,55	214,79	145,32	129,89	-	-	-	166,13	216,19	147,29	198,95	208,10	167,87	107,12	195,35	174,94
439	247,36	210,97	146,35	130,00	213,53	168,95	135,41	-	202,23	147,39	200,90	208,11	127,86	-	-	-
445	241,32	210,95	146,44	129,96	213,45	171,75	135,22	166,27	216,45	147,27	-	-	-	-	-	-
446	196,31	211,05	146,37	129,90	213,48	167,77	135,28	155,10	216,35	147,41	200,91	208,16	127,88	-	-	-
453	249,32	211,15	145,30	129,92	213,34	167,58	134,14	166,10	216,16	147,44	-	-	-	-	-	-
456	243,15	197,35	127,22	130,20	213,58	171,60	135,10	168,16	-	-	-	-	-	-	-	-
458	233,53	211,02	146,35	129,85	213,54	167,68	135,28	-	216,25	147,35	200,91	208,14	127,79	-	-	-

Anexo 4B. Continuação																
Isolado	PG 20	PG 14	ms 41-42	ms 115-116	ms 61-62	PG 5	PG 16	PG 6	PG 19	ms 63-64	ms 67-68	PG 26	PG 9	PG 12	PG 30	ms 77-78
459	-	197,37	146,35	129,89	213,40	167,65	135,33	166,20	216,23	147,31	-	-	-	-	-	-
462	247,43	210,91	146,34	129,85	213,55	167,62	135,11	168,21	-	147,46	200,91	208,16	127,81	-	-	-
466	200,54	197,54	146,39	129,97	213,42	165,74	135,36	164,26	216,20	159,56	-	-	-	111,14	238,07	202,40
467	-	210,11	146,32	129,90	212,52	136,99	143,06	150,18	204,27	147,41	200,86	207,94	127,60	-	-	-
468	246,10	197,54	146,38	129,87	212,49	167,74	135,28	166,23	214,47	147,30	-	-	-	107,00	193,58	175,13
46	251,24	209,05	146,45	130,08	213,48	169,69	135,30	161,19	216,22	147,49	200,90	208,22	127,83	104,79	189,62	174,99
477	200,54	211,01	146,39	130,08	213,62	167,62	135,12	165,98	204,09	-	-	-	-	-	-	-
480	188,87	-	-	-	213,39	169,66	135,25	166,17	216,24	147,26	199,04	208,10	165,77	107,11	193,46	175,08
485	245,39	210,97	145,29	129,87	213,48	167,73	135,25	161,11	202,11	147,27	-	-	-	-	-	-
487	202,38	194,44	325,36	-	213,52	171,73	135,30	166,23	216,03	147,30	-	-	-	107,20	195,34	174,95
494	239,44	210,76	146,64	130,36	213,45	167,72	135,25	149,10	216,19	147,26	-	-	-	-	-	-
4	245,28	-	-	-	213,63	169,73	135,15	166,22	215,99	147,30	-	-	-	-	-	-
511	237,31	223,34	325,43	-	213,62	167,73	135,27	167,19	216,27	147,19	-	-	-	105,02	189,71	175,01
516	202,25	210,84	146,45	130,16	213,48	167,61	135,23	164,26	216,52	147,39	201,17	208,25	128,01	-	-	-
527	202,38	-	-	-	213,57	167,62	135,11	166,14	216,48	147,52	201,00	208,25	127,80	-	-	-
530	245,48	250,83	325,35	-	213,53	169,79	135,21	164,03	216,20	147,45	-	-	-	105,01	189,63	175,04
532	192,76	208,84	145,45	130,21	213,50	167,72	135,16	164,94	-	-	-	-	-	-	-	-
536	247,34	-	-	-	213,45	167,77	135,29	-	202,02	147,21	-	-	-	-	-	-
540	192,78	-	-	-	213,52	171,60	135,16	168,33	216,12	147,25	-	-	-	107,01	193,63	175,00
541	249,35	242,90	325,37	-	213,43	167,74	135,33	156,21	204,00	147,22	-	-	-	105,23	189,62	174,99
545	247,14	199,30	146,39	130,11	213,51	171,65	135,25	166,20	216,13	147,18	-	-	-	107,05	193,41	175,02
546	248,37	237,19	325,44	-	213,54	167,67	135,25	-	216,06	147,20	-	-	-	105,04	189,62	174,99

Anexo 4B. Continuação																
Isolado	PG 20	PG 14	ms 41-42	ms 115-116	ms 61-62	PG 5	PG 16	PG 6	PG 19	ms 63-64	ms 67-68	PG 26	PG 9	PG 12	PG 30	ms 77-78
547	245,29	211,04	146,44	130,08	213,46	167,53	135,00	167,22	-	-	-	-	-	-	-	-
552	194,77	210,86	145,48	130,14	213,56	167,69	135,19	-	-	-	-	-	-	105,02	189,58	174,98
553	243,43	206,05	325,39	-	213,49	167,68	135,24	-	202,14	147,22	-	-	-	105,12	189,65	175,02
560	192,72	194,48	325,39	-	213,61	173,73	135,15	166,27	216,08	147,29	-	-	-	107,00	193,44	175,09
564	190,88	210,97	145,44	130,18	-	167,61	-	153,07	201,52	147,18	-	-	-	104,95	189,62	174,99
566	245,19	211,06	146,34	129,91	213,48	165,58	135,11	168,31	202,40	147,40	-	-	-	104,75	191,49	176,92
575	202,36	197,45	146,30	129,92	213,47	171,62	135,14	-	216,36	147,41	-	-	-	106,75	195,28	175,04
57	-	210,96	146,51	130,07	213,51	167,55	135,11	149,02	-	147,36	-	-	-	-	-	-
584	-	208,93	145,47	130,14	213,52	169,67	135,28	166,05	-	-	-	-	-	-	-	-
586	239,41	265,72	146,47	130,12	212,64	137,01	143,08	-	-	-	-	-	-	111,03	188,92	202,36
587	205,95	-	146,48	130,13	212,63	137,02	143,14	-	216,04	159,63	-	-	-	-	-	197,00
588	-	210,86	145,55	130,20	213,49	167,68	135,24	150,35	-	147,20	-	-	-	105,03	191,56	175,05
5	241,41	210,96	146,51	130,00	213,39	167,61	135,11	164,17	216,68	147,36	200,95	208,19	127,92	104,87	191,52	174,97
60	-	210,94	146,53	130,11	213,52	169,63	135,05	-	216,24	147,59	201,08	208,25	127,82	104,88	189,62	174,96
611	-	215,69	146,91	115,84	213,49	167,64	-	164,81	216,07	147,32	-	-	-	-	-	-
616	-	210,84	146,39	130,11	213,52	167,68	135,28	166,09	202,77	147,43	-	-	-	105,18	191,64	175,05
617	194,73	196,38	127,19	129,96	213,51	173,66	135,09	166,20	216,16	147,53	199,06	208,20	167,80	-	-	-
618	194,74	210,91	146,49	130,12	213,52	167,74	135,19	150,85	-	147,21	-	-	-	105,02	191,59	174,99
628	-	208,71	146,31	130,01	212,54	137,00	142,98	166,23	204,09	159,82	200,99	208,19	143,62	111,05	238,22	202,34
629	197,53	199,21	146,40	130,12	-	-	-	150,26	202,11	147,21	-	-	-	-	-	-
630	179,08	197,36	146,37	130,04	213,53	171,59	135,14	154,12	204,63	147,19	199,06	208,11	169,76	106,98	193,51	175,01
631	198,62	267,86	146,48	130,07	212,46	136,93	143,00	151,07	-	-	-	-	-	110,81	189,66	202,18

Anexo 4B. Continuação																
Isolado	PG 20	PG 14	ms 41-42	ms 115-116	ms 61-62	PG 5	PG 16	PG 6	PG 19	ms 63-64	ms 67-68	PG 26	PG 9	PG 12	PG 30	ms 77-78
632	243,38	199,39	146,43	130,03	213,57	171,56	135,02	-	218,59	147,38	202,91	208,23	169,86	-	-	-
633	205,08	201,30	146,39	130,00	213,46	159,26	135,11	164,02	-	-	-	-	-	-	-	-
635	200,37	198,51	146,45	130,04	213,43	171,57	135,13	-	202,23	147,64	-	-	-	-	-	-
636	248,73	196,91	-	130,16	213,54	171,70	135,20	-	216,21	147,21	-	-	-	-	-	-
642	244,33	-	-	-	213,48	167,68	135,29	157,15	216,22	147,24	201,08	208,24	127,82	105,05	191,55	175,03
6	194,61	210,88	146,47	130,08	213,46	167,64	-	164,06	216,55	147,22	-	-	-	-	-	-
72	191,58	210,94	146,39	130,07	213,48	169,62	135,04	166,16	218,59	147,40	-	-	-	-	-	-
73	-	177,96	146,47	130,03	212,57	145,01	135,17	164,93	-	-	187,46	208,22	151,74	104,75	179,70	174,89
7	248,86	212,91	146,40	130,05	213,48	167,66	135,34	-	216,22	147,40	-	-	-	-	-	-
8	175,10	211,02	146,49	130,11	213,59	167,70	135,18	164,02	204,53	147,24	-	-	-	-	-	-
92	202,18	199,42	-	130,03	212,52	171,51	135,04	162,12	218,37	147,50	199,15	208,29	167,79	106,75	193,50	174,97
93	237,40	212,99	146,41	129,98	213,49	167,58	135,01	150,88	-	147,46	-	-	-	102,87	189,58	174,96
99	-	208,61	146,47	130,02	212,56	136,83	142,95	168,07	216,52	159,91	201,07	208,30	143,64	110,77	193,38	202,25
9	-	211,03	145,29	130,02	213,49	167,66	-	149,14	202,47	147,44	201,04	208,26	127,85	105,15	189,59	175,11
800	-	197,45	146,39	130,04	213,52	169,72	-	165,98	182,54	147,41	-	-	-	106,81	187,60	174,98
805	-	201,34	146,41	129,97	213,51	171,56	135,15	144,92	202,23	145,50	-	-	-	106,81	189,60	175,00
700	-	-	152,81	129,81	-	-	-	-	-	159,38	202,76	-	-	111,63	191,35	202,07
705	-	-	146,58	130,12	212,28	-	134,59	153,11	-	159,13	200,85	-	-	111,90	191,48	202,19
710	-	-	152,83	129,86	211,78	-	134,63	153,00	-	159,04	202,74	-	-	111,59	238,16	201,99
715	-	-	152,77	130,09	-	-	-	152,99	-	159,11	202,88	208,93	-	111,70	-	202,14
720	-	-	152,79	-	-	-	-	153,05	-	159,12	202,85	209,03	-	111,53	-	202,08
725	-	-	158,77	130,06	-	-	-	148,97	-	158,94	200,80	208,99	-	111,66	238,29	202,16

Anexo 4B. Continuação																
Isolado	PG 20	PG 14	ms 41-42	ms 115-116	ms 61-62	PG 5	PG 16	PG 6	PG 19	ms 63-64	ms 67-68	PG 26	PG 9	PG 12	PG 30	ms 77-78
730	-	-	146,79	129,93	-	-	-	153,33	-	159,38	202,77	208,90	-	111,53	-	-
735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
740	-	-	146,72	129,86	-	-	-	152,75	-	159,21	200,72	208,95	-	111,49	189,51	201,92
745	-	-	146,46	130,15	212,24	-	136,17	152,95	-	159,47	202,78	208,97	-	111,86	189,52	202,10
750	-	-	158,77	129,89	211,93	-	136,11	148,95	-	159,13	200,76	208,81	-	111,58	238,22	202,07
760	-	-	152,78	130,09	211,77	-	134,62	152,94	-	159,13	202,60	208,86	-	111,75	-	202,16
770	-	-	146,82	129,92	212,25	-	134,34	153,10	-	159,39	200,58	208,95	-	111,53	-	201,87
775	-	-	152,59	130,22	211,72	-	136,20	153,16	-	159,56	202,86	209,03	-	111,83	-	202,12

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)