

REVISÃO

Reprodução Sexuada em *Pyricularia oryzae*

Silvino Intra Moreira¹, Paulo César Ceresini², Eduardo Alves³

¹Departamento de Biologia, Setor de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brasil; ²Faculdade de Engenharia - UNESP, Ilha Solteira, SP, Brasil; ³Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 37200-000, Brasil.
Autor para correspondência: Eduardo Alves (ealves@dfp.ufla.br)
Data de chegada: 18/12/2014. Aceito para publicação em: 09/06/2015.

10.1590/0100-5405/2067

RESUMO

Moreira, S.I.; Ceresini, P.C.; Alves, E. Reprodução Sexuada em *Pyricularia oryzae*. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.3, p.175-182, 2015.

A brusone é causada pelo fungo Ascomyceto *Pyricularia oryzae*, sendo a doença mundialmente mais importante do arroz. Além do arroz, *P. oryzae* causa a brusone em trigo no Brasil, no Paraguai e na Bolívia. A alta variabilidade genético-patotípica observada em populações locais de *P. oryzae*, é possivelmente responsável pela baixa durabilidade da resistência de cultivares de arroz e trigo a referida doença, e talvez também seja determinante em eventos de ‘mudança de hospedeiro’ pelo

patógeno. Esta revisão tem por objetivo apresentar aspectos relevantes da reprodução sexuada de *P. oryzae*, bem como informações sobre mecanismos de regulação do ciclo reprodutivo sexual do patógeno por meio dos genes *mating type* e feromônios, num sistema de reconhecimento específico. O conhecimento da biologia reprodutiva e da importância da reprodução sexuada em *P. oryzae* é essencial para o manejo da brusone baseado em resistência durável.

Palavras-chave: brusone, peritécio, variabilidade genética, *Magnaporthe oryzae*.

ABSTRACT

Moreira, S.I.; Ceresini, P.C.; Alves, E. Sexual Reproduction in *Pyricularia oryzae*. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.3, p.175-182, 2015.

Blast is caused by the Ascomycete *Pyricularia oryzae* and is the most important disease affecting rice in the world. Besides rice, wheat is affected by blast caused by *P. oryzae* in Brazil, Paraguay and Bolivia. The high genetic-pathotypic variability observed in local populations of *P. oryzae* is probably responsible for the low resistance durability of rice and wheat cultivarsto this disease and may also be determinant in eventsof

‘host shift’ by the pathogen. This review aims to present important aspects of the sexual reproduction of *P. oryzae*, as well as information about the regulatory mechanisms of the pathogen sexual cycle by the genes *mating type* and pheromones in a specific recognition system. Understanding the reproductive biology and the importance of *P. oryzae* sexual cycle is essential for blast disease management based on durable resistance.

Additional keywords: blast disease, perithecium, genetic variability, *Magnaporthe oryzae*.

A brusone é causada pelo fungo Ascomyceto *Pyricularia oryzae* Cavara, sendo a mais importante doença do arroz no mundo (55). A brusone do trigo é recente, tendo emergido no Brasil no Estado do Paraná em 1985 (22), e ocorre também no Paraguai e na Bolívia (15). O fungo é hemibiotrófico, e causa sintomas em todas as partes das plantas, como manchas elípticas em folhas (55) e branqueamento gradual de espigas (22). A severidade da doença varia muito de acordo com as condições climáticas e com as cultivares utilizadas, e as perdas podem chegar a quase 100 % (19,22).

A alta variabilidade do fungo contribui para a frequente perda de resistência em cultivares de arroz e trigo (39), e em conjunto com mudanças nos agro-ecossistemas, também contribui com o fenômeno de ‘mudança de hospedeiro’. O trabalho de Couch et al. (10) aponta evidências de que linhagens infectivas ao arroz emergiram a partir de isolados de *Setaria*, na China, seguido de especialização em plantas daninhas comuns ao arroz. Stuckenbrok & McDonald (45) sugerem que o mesmo tenha ocorrido para favorecer a emergência da brusone do trigo no Sul do Brasil. Existem evidências de que a reprodução sexuada

seja a principal fonte de variabilidade de *P. oryzae* (36,40).

Espécies de *Pyricularia* foram nomeadas em sua fase sexual como *Magnaporthe* spp. (9, 21) por muitos anos, mas recentemente tem sido resolvida a utilização apenas do nome *Pyricularia* tanto para a fase assexuada como para a fase sexuada, seguindo o Novo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (30, 46).

O reconhecimento dos indivíduos sexualmente compatíveis é regulado por genes *mating type* (48) e feromônios (43). A indução do desenvolvimento de peritécios negros com longos pescoços e ascas unitunicadas contendo oito ascósporos tri-septados pode ser realizada por pareamento de indivíduos compatíveis *in vitro* ou em plantas, em tecidos senescentes (20, 44). Esta observação pode levar à hipótese de que o teleomorfo ocorra em restos de cultura. No entanto, esta e outras questões permanecem ainda não esclarecidas.

São escassos os estudos sobre o papel da reprodução sexuada na estrutura genética de populações de *P. oryzae*, bem como na biologia reprodutiva do patógeno envolvendo morfogênese, fatores reguladores e métodos de indução.

Compatibilidade sexual em populações de *Pyricularia oryzae*

Uma vez que *P. oryzae* é heterotálico (ou auto-incompatível) (27), sua fase perfeita só é possível quando ocorre o cruzamento entre dois indivíduos de tipos sexualmente compatíveis (*mating types*) e que sejam férteis. Isso ocorre quando a estrutura receptora ('feminina') chamada ascogônio está apta a receber o(s) núcleo(s) do indivíduo compatível doador ('macho'), por meio de conídios ou hifas (Figura 1A e B). É possível ainda que estes núcleos possam ser oriundos de microconídios unicelulares e fusiformes produzidos em fíalides (60).

A fase sexuada de *P. oryzae* normalmente não é observada naturalmente (20). No entanto, muitos estudos sugerem que isolados patogênicos ao arroz podem se reproduzir sexualmente, devido à presença de talos geneticamente compatíveis fêmeas férteis em populações do fungo na Índia (12), em Bangladesh (42), e no sudeste da Ásia (40), centros de origem do arroz. O primeiro relato de elevados níveis de fertilidade (24 a 52%) em isolados provenientes de arroz, em diferentes regiões da Índia, foi feito por Dayakar et al. (12).

No Brasil, isolados de arroz avaliados por Urashima et al. (50) desenvolveram peritécios *in vitro*, mas não produziram ascósporos e não apresentaram compatibilidade sexual com isolados de outros hospedeiros testados. Quanto aos isolados patogênicos a plantas de trigo, ambos os tipos compatíveis foram detectados no campo (4, 50), compatíveis sexualmente com outros isolados de trigo, cevadinha

(*Bromus catharticus* Vahl), alpiste (*Phalaris canariensis* L.) e triticale (*X. triticosecal* Wittmack) (18).

O idiomorfo Mat1-1 predominou nas populações amostradas nos Estados do Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo. Por outro lado, Maciel et al. (36) encontraram populações de isolados de trigo com diferentes distribuições dos idiomorfos Mat1-1 e Mat1-2: no Centro-Oeste (4:1), no Triângulo Mineiro (30:1), em São Paulo (1:0), e no Paraná (15:1). Tendo analisado a estrutura populacional do patógeno (com base em onze microssatélites e testes de patogenicidade) estes autores propuseram que as populações de *P. oryzae* possuem um sistema reprodutivo misto, onde a reprodução sexuada é seguida da dispersão clonal. O favorecimento da dispersão clonal de *P. oryzae* pela seleção de indivíduos Mat1-1 com um gene de resistência à estrobilurina foi recentemente descrito para populações do Distrito Federal, e dos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (5).

Morfogênese do peritécio de *Pyricularia spp.*

A fase perfeita de *Pyricularia* foi primeiramente descrita como *Ceratosphaeria grisea*, por Hebert (21), por meio de cruzamentos entre isolados de capim-colchão (*Digitaria horizontalis* Willdenow), em meio Sachs' Agar com grãos de cevada e bainhas de arroz e incubados a 25°C sob luz fluorescente contínua.

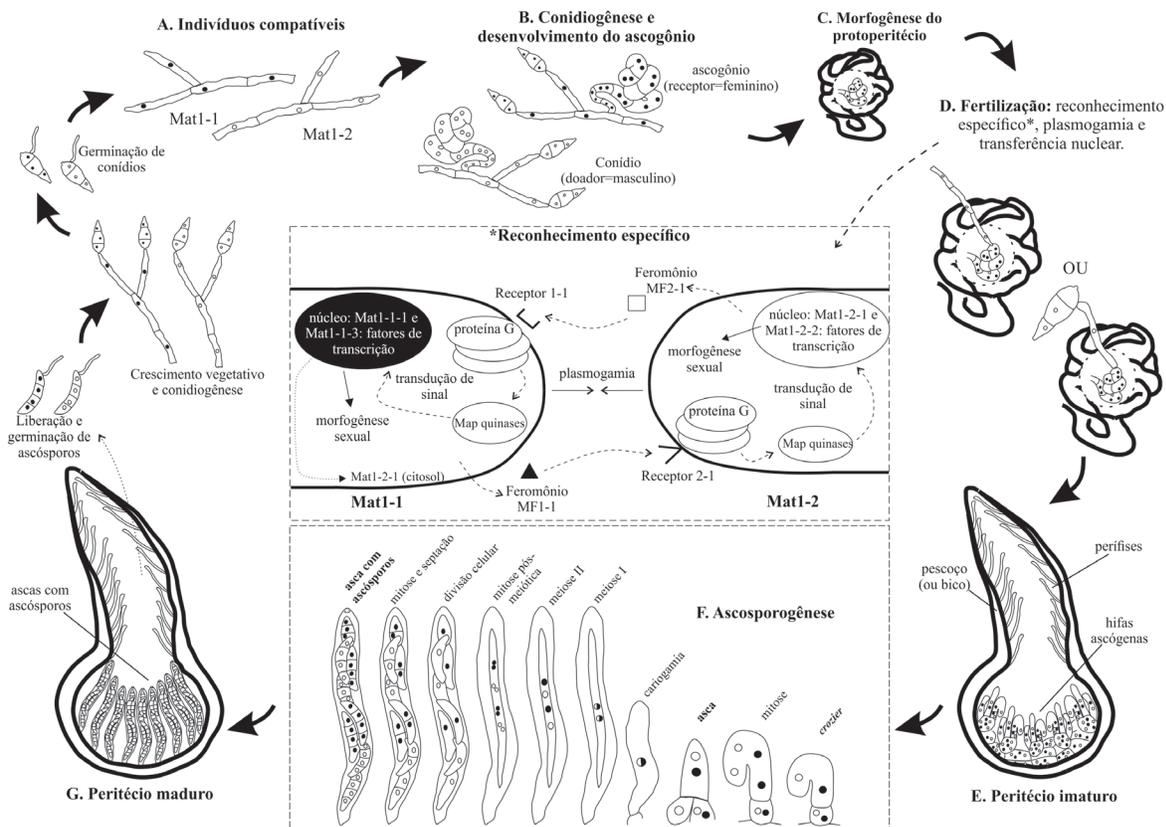


Figura 1. Esquema ilustrativo do ciclo sexual de *Pyricularia oryzae* e com etapas da morfogênese e a e sua regulação gênica em *P. oryzae* e/ou outros Ascomycota. **A**, Presença de indivíduos compatíveis, Mat1-1 e Mat1-2 (27); **B**, Desenvolvimento das estruturas 'masculinas' (hifas e/ou conídios, 'doadores') e 'femininas' (ascogônios, 'receptores'); **C**, Envolvimento do ascogônio, originando o protoperitécio (34, 35); **D**, Fertilização: plasmogamia e transferência nuclear precedidos de reconhecimento por meio de feromônios MF1-1 e MF2-1 (43) em receptores específicos de indivíduos compatíveis (25, 29), desencadeado uma transdução de sinais (31, 33) por meio de proteínas G (16, 41), MAP quinases (34), transferases, proteases, e fatores de transcrição, entre estes, genes MAT (26, 48), para a indução da expressão de genes necessários à morfogênese sexual. **E**, Desenvolvimento do protoperitécio em peritécio imaturo com hifas ascógenas fertilizadas (34, 35) muitas vezes dependente da expressão de genes MAT (7, 32), de feromônios (7, 17) e/ou de proteínas G (16). **F**, Ascosporigênese: cariogamia e meiose em hifas ascógenas, seguido de mitoses pós-meióticas, divisão celular, novas mitoses, e septação, para origem de ascósporos tetra-celulares (57); evento muitas vezes dependente da expressão de genes MAT (17), de feromônios (49), e/ou de proteínas G (16), ou seja, sem a expressão destes genes pode ocorrer esterilidade. **G**, Peritécio maduro e liberação dos ascósporos por meio de deliquescência de ascas, com origem de novos indivíduos pela germinação de células terminais (57).

Os peritécios de *Pyricularia spp.* podem estar isolados ou em grupos, fundidos ou não, parcialmente ou totalmente imergidos no substrato, com longos rostros salientes a partir da superfície, hialinos a escurecidos com a idade (Figuras 2 e 3), contendo longas perifíses filiformes e deliquescentes. As ascas se originam na base do pescoço, cilíndricas a subclavadas, unitunicadas e com uma fina parede e um opérculo na extremidade superior. Os ascósporos são hialinos, fusiformes, tri-septados, moderadamente curvados, com glóbulos de óleo usualmente presentes, e provavelmente a liberação ocorre pela deliquescência da asca. Podem germinar a partir de uma, ou de ambas as células terminais (Figura 1 G)(21).

Hifas vegetativas uninucleadas dão origem a hifas ascógenas binucleadas, que formam o *crozier* (Figura 1 F). Eventualmente, é possível também observar dois núcleos em células de hifas vegetativas mais velhas (57).

A fertilização ocorre quando o(s) núcleo(s) do indivíduo doador chega(m) aos ascogônios do indivíduo receptor, estruturas localizadas no interior de protoperitécios. Muitas espécies de Ascomycota possuem tricógines, prolongamentos que saem dos ascogônios e se projetam para o exterior dos protoperitécios. Os tricógines recebem núcleos de indivíduos doadores por meio de plasmogamia com o tubo germinativo de conídios ou de hifas. No entanto, esta estrutura ainda não foi caracterizada em *Pyricularia spp.*, necessitando maior elucidação sobre como ocorre sua fertilização, talvez pela entrada de tubos germinativos e/ou hifas nos protoperitécios, onde estão as hifas ascógenas (Figura 1 D), ou ainda chegando ao ascogônio antes mesmo de seu envelopamento. O núcleo doado migra para o ascogônio (Figura D e E), onde poderá se recombinar com núcleo do indivíduo receptor na meiose (Figura 1 F), o que caracteriza o início do ciclo de reprodução sexuada (8). Após, cada um dos quatro núcleos gerados sofre mitose pós-meiótica, resultando assim nos oito núcleos dos oito ascósporos encontrados em cada asca (Figura 1 F). Novas mitoses ocorrem dentro dos ascósporos, seguido de septação e, ao final, ascósporos com quatro células uninucleadas, à medida que ocorre a maturação final do peritécio (Figura 1 G) (57).

O protoperitécio é uma estrutura esférica a sub-esférica que se desenvolve envolvendo os ascogônios (Figura 1 C), e resulta na origem do peritécio maduro (Figura 1 G). Sua morfogênese em *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge (descrita por meio de microscopia eletrônica de varredura (34)) foi dividida nas fases de formação da hélice ascogonial, expansão do protoperitécio, e emergência do tricógine. O anel ascogonial é estabilizado de forma helicoidal por meio matriz extracelular (MEC). Ramificações de novas células as cogoniais envelopam a hélice, com um envelopamento adicional de hifas ramificadas do envelope original e hifas vizinhas, originando o protoperitécio, com uma capa compacta estabilizada por meio de MEC. Este se expande e origina elongações chamadas de tricógines, marcando a maturação do protoperitécio. Para amorfogênese do peritécio de *N. crassa*, a fusão com células de tipos sexuais compatíveis é requerida. Foi possível caracterizar para *Sordaria macrospora* Auers wal das fases ascogonial, protoperitecical, e peritecical (35). Ao menos treze tipos de células especializadas e morfologicamente distintas foram classificados em três classes, hifas, células conglutinadas, e esporos. Ainda não existe uma análise descritiva em classes de células para os tecidos sexuados de *Pyricularia spp.*. A seguir, uma discussão sobre vários fatores genéticos reguladores da compatibilidade e da morfogênese sexual.

Estrutura e função de genes relacionados ao ciclo sexual em *Pyriculariaoryzae* e em outros Ascomycota

O locus onde estão localizados os genes *mating type* (MAT) em *P.*

oryzae é chamado Mat1, localizado no cromossomo três. Possui dois idiomorfos, Mat1-1, o qual codifica os transcritos Mat1-1-1, Mat1-1-2 e Mat1-1-3, e Mat1-2, o qual codifica os transcritos Mat1-2-1 e Mat1-2-2 (26,48). Os genes MAT1-1-3 e MAT1-2-2 possuem, respectivamente, as ORFs MAT1-1-3a e MAT1-1-3b, e MAT1-2-2a e MAT1-2-2b, determinadas por *splicing* alternativo (26).

A proteína deduzida do transcrito Mat1-1-1 inclui um motivo α -box, que é conservado como produto de Mat1-1 em vários fungos Ascomycota (48). Este gene define o idiomorfo Mat1-1, e evidências suportam que sua proteína α é um fator de transcrição que se liga ao DNA via domínio α conservado. Seu gene correspondente em *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen é MAT α 1p, um co-ativador transcricional essencial para a expressão de genes *mating type* - específicos, bem como de feromônios e receptores de feromônios (25).

Por outro lado, a proteína deduzida de MAT1-2-1 contém o motivo GAM-box de ligação ao DNA, que é conservado em produtos Mat1-2 de vários Ascomycota, e caracteriza o idiomorfo Mat1-2 (48). O domínio GAM (Grupo de Alta Mobilidade) possui uma sequência com afinidade a DNA encontrada em proteínas cromossomais não-histonas e fatores de transcrição. As ORFs MAT1-1-3a e MAT1-2-2a (26) também codificam para o domínio GAM. Análises estruturais e filogenéticas de GAM-box de MAT1-1-3 e MAT1-2-1 de *Podospira anserina* (Rabe nh.) Niessl mostraram que estas proteínas são muito dissimilares entre si e que provavelmente se ligam ao DNA de maneira muito diferente (1,2).

Quanto ao transcrito de MAT1-1-2, SMR1 de *P. anserina*, foi verificado que seu domínio conservado HPG possui resíduos de histidina, prolina e glicina. Mutações de substituição de triptofano para alanina promoveram completa inibição do desenvolvimento de peritécios, nos estádios iniciais (7). Estudos de localização celular de SMR1 com GFP indicaram sua localização no citoplasma, mas sua função permanece não elucidada (7).

A interação entre os transcritos dos genes MAT pode ocorrer (24) ou não (1) em diferentes Ascomycota, sem função conhecida para o ciclo sexual.

A importância do locus MAT na reprodução sexuada parece ser diferente em diferentes fungos (6). O nocaute combinado de MAT A-1 (MAT1-1-1) e MAT A-3 (MAT1-1-3) em *N. crassa* reduziu a fertilidade, sem efeitos no corpo de frutificação e na compatibilidade vegetativa (17). Já o nocaute de MAT1-1-1 e MAT1-2-1 afetou a fertilidade de *P. anserina* (14). Em *S. macrospora*, o nocaute de SMTA-2 (MAT1-1-2) ou a dupla-deleção SMTA-2/3 (deleção de MAT1-1-1 e MAT1-1-3), teve como consequência o subdesenvolvimento do ascocarpo (32). As análises de qRT-PCR nestes mutantes revelaram que a proteína SmtA-1 atua como um regulador positivo da expressão de genes de precursores de feromônios ppg1 e ppg2, e SmtA-2 teve um efeito negativo na expressão de ppg2. Já isolados Δ MAT1-2-1 de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg tiveram regulação negativa na expressão de precursores e receptores de feromônio (29), e a importância do locus Mat1-2 no ciclo sexual de *Fusarium graminearum* Schwabe foi verificada por Lee et al. (33), quando observaram que sua deleção reduziu significativamente a quantidade de transcritos de inúmeros genes relacionados direta ou indiretamente com o ciclo sexuado.

Kang et al. (27) transformaram isolados de *P. oryzae* de um *mating type* com um cosmídeo linearizado contendo o gene MAT do *mating type* oposto, resultando assim num isolado que continha ambos, ou seja, um transformado homotático, tanto para isolado Mat1-1 quanto para isolado Mat1-2. Todavia, tanto ascósporos quanto conídios destes indivíduos transformados não reproduziram a característica homotática, apresentando um *mating type* ou outro.

Além dos genes MAT, a regulação do reconhecimento específico

dos indivíduos de tipo sexual oposto ocorre por meio de feromônios e seus receptores específicos, cuja interação desencadeia uma transdução de sinais para estimular a expressão de outros genes importantes para o ciclo sexual (43). A partir deste reconhecimento é iniciada uma rota de sinalização celular que envia sinais ao núcleo, onde, juntamente com diversos fatores de transcrição, induzem a expressão de genes relacionados à reprodução sexuada (Figura 1 D*). Os principais componentes da rota MAP quinase de resposta a feromônios já elucidados para *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *N. crassa*, foram citados por Kim et al. (31): proteínas regulatórias *mating type*; fatores *mating* (precursores de feromônios); proteínas G; proteínas MAP quinase; fatores de transcrição; transferases; endoproteases; e aminopeptidases. Após o sequenciamento do genoma de *P. oryzae*, verificou-se que diversos destes componentes possuem genes de alta similaridade com genes relacionados em *S. cerevisiae* (13). A reprodução sexuada de *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter foi correlacionada com o aumento da expressão dos genes MAT e de genes-chave da rota de sinalização de feromônios MAP quinase (37).

Genes precursores de feromônios já foram caracterizados para *S. cerevisiae* (11), *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Bar (59), *P. oryzae* (43), *S. macrospora* (38) e *N. crassa* (3).

Shen et al. (43) identificaram os genes *Mating factors*, MF1-1 e MF2-1 como precursores de feromônios em *P. oryzae*. O gene MF1-1 codifica para um polipeptídeo de 26 aminoácidos, e possui terminação CAAX, encontrado em genes de feromônios de *S. cerevisiae*. O gene MF2-1 contém sítios potenciais de protease Kex2, e sequências repetidas dipeptídicas na região N-terminal, como em *S. cerevisiae* e *C. parasitica*.

A deleção de MF1-1 em *C. parasitica* causa esterilidade em

'doadores' (machos), sem efeitos no ciclo vegetativo (49). No entanto, foi verificado que o gene precursor de feromônio MFA-1 de *N. crassa* também pode afetar o crescimento filamentososo (31). A regulação da reprodução sexual pode sofrer influência das condições do ambiente, mas, além disso, existe um controle intrínseco do organismo, que obedece a um 'relógio molecular'. Foi verificado que a expressão de MF1-1 em *C. parasitica* pode variar de acordo com estímulos do ambiente, como a composição do substrato onde o fungo se encontra, e com a idade do isolado (49). A expressão de precursores de feromônios de *N. crassa* apresentou padrão circadiano (3).

As proteínas G são mediadoras em respostas a sinais do ambiente. São compostas pelas subunidades α , β e γ , e seus genes são requeridos para formação de corpos de frutificação, como observado para *A. nidulans* (41). O gene MAGB em *P. oryzae* codifica a subunidade α da proteína G, cujo silenciamento levou a defeitos na formação de peritécios, apressórios e conídios, e no crescimento celular (16).

Métodos para a indução do ciclo sexual de *Pyricularia oryzae*

Frequentemente os estudos sobre a fase sexuada de *Pyricularia* spp. são conduzidos *in vitro*, desde sua primeira caracterização (21) até os dias atuais (51) (Tabela 1). Itoi et al. (23) desenvolveram um método ainda bastante utilizado (Tabela 1), o método de "cultivo-em-triângulo". Baseia-se no pareamento equidistante entre peças de micélio de três indivíduos em uma mesma placa, onde dois são testadores (conhecidamente férteis), um de cada tipo sexual, e o outro isolado, avaliado quanto à compatibilidade com um dos dois testadores. Linhas duplas de peritécios com ascósporos viáveis na interface entre duas colônias indicam fertilidade, e o lado onde isso ocorre indica a qual tipo sexual pertence o isolado avaliado. No entanto, nem todos os isolados

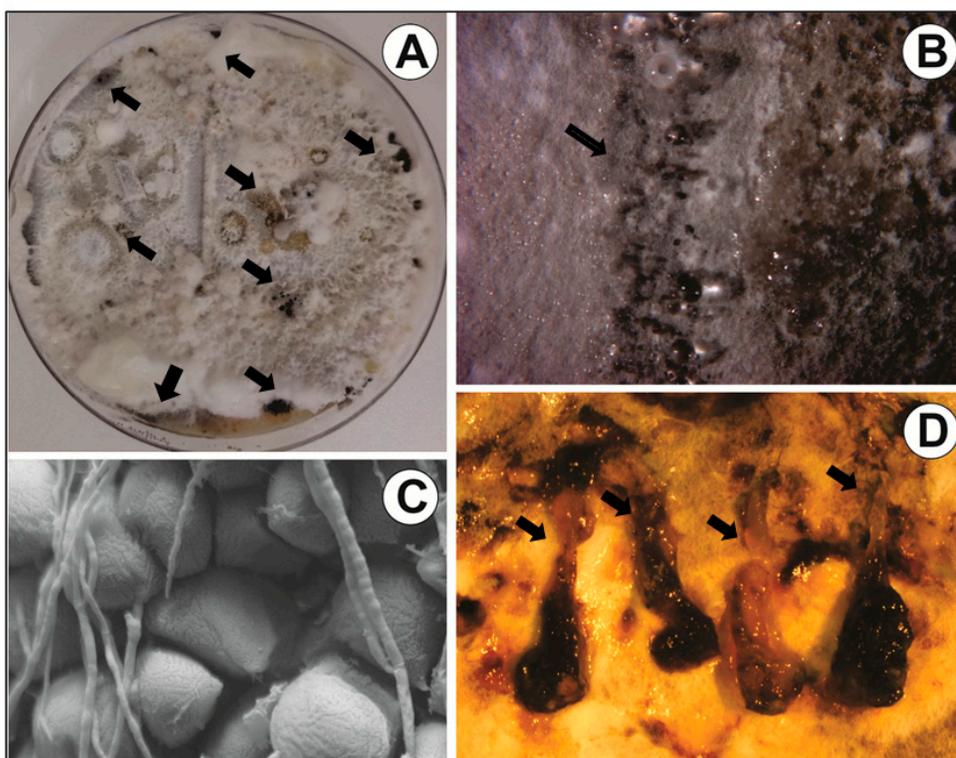


Figura 2. Indução *in vitro* de produção de peritécios de *Pyricularia oryzae* pelo pareamento de isolados compatíveis Mat1-1 e Mat1-2, patogênicos ao trigo (A, C e D) e ao arroz (B), em meio de aveia incubados sob iluminação fluorescente e negra (próxima à UV) combinadas de forma contínua a 22 °C por 30 dias. A, imagem em esteriomicroscópio de peritécios dispersos em várias regiões da placa (setas); B, imagem em esteriomicroscópio de peritécios alinhados na região de encontro das colônias (seta); C, imagem em microscópio eletrônico de varredura: vários protoperitécios se desenvolvendo de forma agrupada; D, imagem em microscópio de luz de peritécios encontrados imersos no meio de cultura, apresentando longos pescoços (setas), removidos por meio de escarificação.

Tabela 1. Métodos para indução da produção de peritécios de *Pyricularias* spp.

Hospedeiro(s)	País(es) de origem dos isolados	Método	Testador(es)	Condições de luz/temperatura	Referência
<i>Digitaria saguinalis</i>	EUA	Pareamento em Sachs' agar com grãos de cevada e palha de arroz	-	25°C/luz fraca/21 dias	(21)
<i>Eleusine coracana</i>	Japão	2mL suspensão com fragmentos miceliais sobre bainhas de arroz desinfestadas, em Sachs' agar	-	20°C/ luz 330-780nm/fotoperíodo 12hrs (550erg/cm2/seg) /20-30 dias	(28)
<i>Eleusine coracana</i>	Japão	“Cultivo-em-triângulo” com peças de micélio em meio de aveia	G10-1, P2-6 (Mat1-1), Z2-1, Z5-1, Z7-1 (Mat1-2)	28°C/luz branca/10dias; Seguindo de 20 dias sob luz negra (perto da UV)	(23)
<i>Oryza sativa</i>	Guiana Francesa e Mali	Suspensão mista de conídios injetada em plantas de arroz	Guy11(Mat1-2) e ML25 (Mat1-1)	Plantas inoculadas sob 20°C/ luz branca/15 dias; bainhas com lesões transferidas para câmara úmida a 20°C/luz branca/15dias	(44)
<i>E. coracana, Brachiaria plantaginea, Setaria italica, Triticuma aestivatum</i>	Japão, Brasil	“Cultivo-em-triângulo” com peças de micélio em meio de aveia (distância de 4cm) (23)	G10-1 (Mat1-1), Z2-1 (Mat1-2)	25°C/escuro/7 dias; seguido de 20 dias sob luz branca contínua/20°C	(50)
<i>O. sativa</i>	China	Suspensão mista de conídios injetada em plantas de arroz (44)	CHNOS0101-3B-2 (Mat1-2), 3B-4 (Mat1-1) e 3B-5 (Mat1-2)	Diferentes protocolos testados, a partir de Silue e Notteghem (44)	(20)
<i>E. coracana, O. sativa</i>	Índia, Guiana Francesa	“Cultivo-em-triângulo” com peças de micélio em meio de aveia (distância de 5cm) (23)	Guy11, KA-3, KA-9, KA-7	27°C/escuro/7 dias; seguido de 20 dias sob luz branca contínua/22-24°C	(53)
<i>E. coracana, O. sativa</i>	Índia, Guiana Francesa	plugs de micélio em meio de aveia (distância de 2cm)	Guy11, KA-3, KA-9, KA-7	20-22°C/luz branca contínua (40W)/20 dias	(12)
<i>T. aestivatum</i>	Brasil	“Cultivo-em-triângulo” com peças de micélio em meio de aveia (distância de 4cm) (23)	Bp3a e Br118.2D; Br7 e Br8; Br35 e Br48	22°C/luz branca contínua /30 dias	(4)
<i>E. coracana, O. sativa, T. aestivatum</i>	Uganda, Índia, Guiana Francesa, Brasil	peças de micélio em meio de aveia (distância de 4cm)	KA-3, KA-7, KA-9, Guy-11, BR-48, e BR-116.5	27°C/fotoperíodo 12hrs/7 dias; seguido de 20 dias sob luz branca contínua (76µE m ⁻² s ⁻¹)/20°C	(54)
<i>Stenotaphrum secundatum, Festuca arundinacea</i>	EUA, Guiana Francesa	Placa com meio de aveia dividida em 8 setores radiais com peças alternados em testadores e avaliados	Guy11 (Mat1-2), 2539 (Mat1-1)	25°C/luz branca contínua /28 dias	(47)
<i>T. aestivatum, Hordeum vulgare, X. triticosecale, Brachiaria plantaginea, O. sativa</i> e várias outras Poaceas	Brasil: MS, PR e SP	“Cultivo-em-triângulo” com peças de micélio em meio de aveia (distância de 4cm) (23)	Isolados parentais	22°C/luz branca contínua /28 dias	(18)
<i>Lolium multiflorum, O. sativa</i>	Tailândia, China	peças de micélio em meio de aveia (distância de 3cm)	Hermafroditas: TH12 (MAT1-1) e TH16 (MAT1-2); CHL43 (MAT1-1) e CHL42 (MAT1-2)	20°C/luz branca contínua /20 dias	(58)
<i>T. aestivum x Tricosecale, L. multiflorum, O. sativa</i>	Brasil	“Cultivo-em-triângulo” com peças de micélio em meio de aveia (23)	Br8	22°C/luz branca contínua /20 dias	(51)

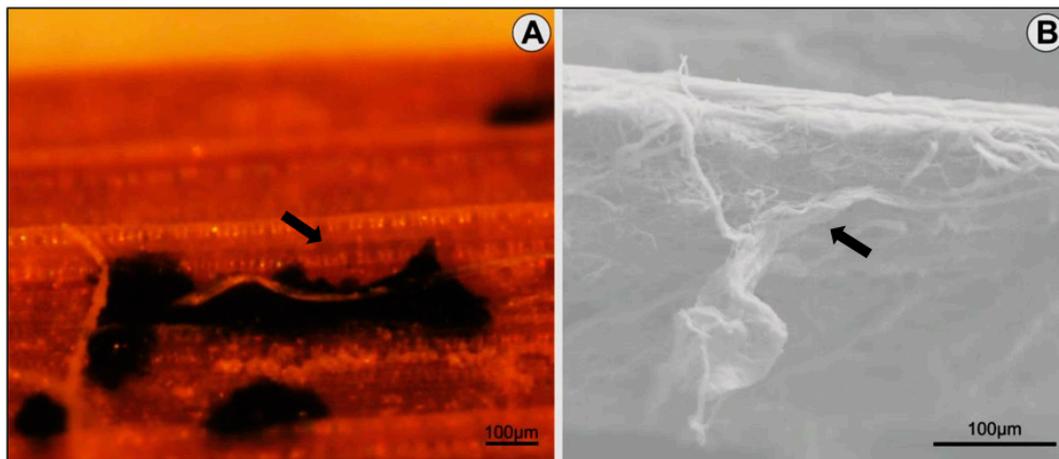


Figura 3. Indução da produção de peritécios de *Pyricularia oryzae* isolados de trigo emhastes senescentes de plantas de arroz (A) e trigo (B), por meio de inoculação com suspensão conidial mista contendo isolados compatíveis Mat1-1 e Mat1-2. A, imagem em microcópico de luz de peritécios desenvolvidos agrupados e parcialmente submersos nos tecidos vegetais (seta); B, imagem de microscopia eletrônica de varredura: corte transversal de haste, com colonização micelial interna e peritécio com pescoço longo (seta).

de *P. oryzae* apresentam este comportamento. Em pareamento de isolados de arroz (linhagens 70-15 e 40-91), linhas de peritécios foram observadas, como no método de Itoi et al. (23) (Figura 2 B), mas quando isolados de trigo são pareados (linhagens 50-46 e 33-1), os peritécios se originaram dispersos de forma irregular nas placas (Figura 2 A, C e D). Provavelmente isto não deva ser uma regra para todos os isolados de arroz ou de trigo, e não são conhecidos os fatores que determinam este comportamento. Assim, sugere-se, neste caso, primeiramente identificar o tipo sexual dos isolados por meio de PCR (47), seguido de pareamentos com duplas de indivíduos compatíveis, para localização de testadores (hermafroditas férteis) de Mat1-1 e de Mat1-2.

Métodos para a indução do ciclo sexual de *P. oryzae* em plantas também já foram desenvolvidos. Silue & Notteghem (44) e Hayashi et al. (20) observaram a formação de peritécios em bainhas senescentes de folhas de arroz por meio da injeção de conídios em suspensões mistas com linhagens Mat1-1 e Mat1-2, patogênicas ao arroz. Repetiu-se este procedimento (20) com sucesso em plantas de arroz (Figura 3 A) e trigo (Figura 3 B) inoculadas com isolados de trigo. Foram observados peritécios superficiais, parcialmente submersos (Figura 3 A) e internos (Figura 3 B) aos tecidos senescentes de hastes cortadas e incubadas em câmara úmida sob 20 °C e luz fluorescente contínua por 30 dias. O desenvolvimento dos ascocarpos em tecidos senescentes pode levar à hipótese de que o teleomorfo de *P. oryzae* ocorra durante a fase necrotrófica, provavelmente em restos de cultura. No entanto, esta questão permanece ainda não esclarecida, sendo potencialmente fundamental em termos de manejo da brusone.

Diversas técnicas de indução do ciclo sexual já foram desenvolvidas (Tabela 1), e as condições ideais de luz, temperatura e nutrientes variam para isolados de diferentes origens geográficas e hospedeiros (56). Maior número de peritécios foi observado com temperatura de incubação de 20°C para isolados de capim-colchão dos EUA, e 22 a 25°C, para isolados de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica* (L.) Gartner) do Japão (56). A luz é essencial para a produção consistente de peritécios, e baixos comprimentos de onda (próximo à UV) são mais eficientes (56). O meio de aveia, comparado aos meios batata-sacarose e Sach'sagarcom bainhas de arroz, apresentou maior número de peritécios (56).

Cruzamentos *in vitro* com obtenção de descendentes podem ser úteis em estudos genéticos. Valent et al. (52) realizaram pareamentos com isolado de arroz e de capim-chorão (*Eragrostis curvula* (Schrad.)

Nees), tendo utilizado o isolado de arroz como o parental recorrente em seis gerações. Por meio de estudos de patogenicidade e virulência da progênie, foi observado que os parentais possuem diferentes controles genéticos quanto à habilidade de infectar arroz.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas são as questões ainda não esclarecidas no ciclo sexual de *Pyricularia oryzae*, tais como: distribuição de idiomorfos em diversas populações; estudos populacionais com obtenção de progênies da reprodução sexuada; o evento de fertilização; as funções específicas dos genes MAT e feromônios no reconhecimento dos indivíduos, na morfogênes e sexual e na fertilidade; ocorrência da fase sexuada em tecidos vegetais; diferentes condições de indução *in vitro*. Assim, este objeto de estudos é desafiador, com amplas possibilidades a serem exploradas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Fundação de Pesquisa São Paulo (FAPESP 2013/10655-4), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT-PP 307361/2012-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arnaisé, S.; Debuchy, R.; Picard, M. What is a *bona fide* mating-type gene? Internuclear complementation of mat mutants in *Podospora anserina*. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v.256, p.169-178, 1997.
2. Arnaisé, S.; Zickler, Poisier, C.; Debuchy, R. *Pah1*: a homeobox gene involved in hyphal morphology and microconidio genesis in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.39, p.54-64, 2001.
3. Bobrowicz P.; Pawlak R.; Correa A.; Bell-Pedersen, D.; Ebbole D.J. The *Neurospora crassa* pheromone precursor genes are regulated by the mating type locus and the circadian clock. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.45, p.795-804, 2002.
4. Bruno, A.C.; Urashima, A.S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo e de outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26,

- n.1, p.21-26, 2001.
5. Castroagudín, V.L.; Ceresini, P.C.; Oliveira, S.C.; Reges, J.T.; Maciel, J.L.N.; Bonato, A.L.V.; Dorigan, A.F.; McDonald, B.A. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.105, n.3, p.284-294, 2015.
 6. Coppin, E.; Arnais, S.; Contamine, V.; Picard, M. Deletion of the mating-type sequence in *Podospora anserina* abolishes mating without affecting vegetative functions and sexual differentiation. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v.241, p.409-414, 1993.
 7. Coppin, E.; de Renty, C.; Debuchy, R. The function of the coding sequences for the putative pheromone precursors in *Podospora anserina* is restricted to fertilization. **Eukaryot Cell**, Washington, v.4, p.407-420, 2005.
 8. Coppin, E.; Debuchy, R.; Arnais, S.; Picard, M. Mating types and Sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.4, p.411-428, 1997.
 9. Couch, B.C.; Kohn, L.M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*. **Mycologia**, Lexington, v.94, n.4, p.692, 2002.
 10. Couch, B.C.; Fudal, I.; Lebrun, M.-H.; Tharreau, D.; Valent, B.; van Kim, P.; Nottéghem, J.; Kohn, L.M. Origins of Host-Specific Populations of the Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in Crop Domestication with Subsequent Expansion of Pandemic Clones on Rice and Weeds of Rice. **Genetics**, Bethesda, v.170, p.613-630, 2005.
 11. Cross, F.; Hartwell, L.H.; Jackson, C.; Konopka, J.B. Conjugation in *Saccharomy cerevisiae*. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v.4, p.429-457, 1988.
 12. Dayakar, B.V.; Narayanan, N.N.; Gnanamanickam, S.S. Cross-compatibility and distribution of mating type alleles of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in India. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.6, p.700-704, 2000.
 13. Dean, R.A.; Talbot, N.J.; Ebbole, D.J.; Farman, M.L.; Mitchell, T.K.; Orbach, M.J.; Thon, M.; Kulkarni, R.; Xu, J.R.; Pan, H.; Read, N.D.; Lee, Y.; Carbone, I.; Brown, D.; Oh, Y.Y.; Donofrio, N.; Jeong, J.S.; Soanes, D.M.; Djonovic, S.; Kolomiets, E.; Rehmeier, C.; Li, W.; Harding, M.; Kim, S.; Lebrun, M.; Bohnert, H.; Coughlan, S.; Butler, J.; Calvo, S.; Ma, L.; Nicol R.; Purcell, S.; Nusbaum, C.; Galagan, J.E.; Birren, B.W. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, London, v.434, p.980-986, 2005.
 14. Debuchy, R.; Turgeon, B.G. Mating type in Euscomycetes. In: Kues, U., Fischer, R. **The Mycota I**. 2nd Ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p.293-323.
 15. Duveiller, E.H.; Hodson, D.; Tiedmann, A. Wheat blast caused by *Magnaporthe grisea*: A reality and new challenge for wheat research. In: Abstracts in the 8th International Wheat Conference, 2010, St. Petersburg. **Annals**. St. Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry. p.257-248.
 16. Fang, E.G.C.; Dean, R.A. Site-Directed Mutagenesis of the magB Gene Affects Growth and Development in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.13, n.11, p.1214-1227, 2000.
 17. Ferreira, A.V.-N.; An, Z.; Metzberg, R.L.; Glass, N.L. Characterization of mat A-2, mat A-3 and Amata Mating-type Mutants of *Neurospora crassa*. **Genetics**, Bethesda, v.148, p.1069-1079, 1998.
 18. Galbieri, R.; Urashima, A.S. Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual entre isolados de *Pyricularia grisea* de diferentes hospedeiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.1, p.22-28, 2008.
 19. Goulart, A.C.P.; Sousa, P.G.; Urashima, A.S. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.4, p.358-363, 2007.
 20. Hayashi, N.; Li, Y.C.; Li, J.L.; Naito, H. In vitro production on rice plants of perithecia of *Magnaporthe grisea* from Yunnan, China. **Mycological Research**, Cambridge, v.101, n.11, p.1308-1310, 1997.
 21. Hebert, T.T. The Perfect Stage of *Pyricularia grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, p.83-87, 1971.
 22. Igarashi, S.; Utimada, C.M.; Igarashi, L.C.; Kazuma, A.H.; Lopes, R.S. *Pyricularia* do trigo. Ocorrência de *Pyricularia* sp. No Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p.351-352, 1986.
 23. Itoi, S.; Mishima, T.; Arase, S.; Nozu, M. Mating behaviour of Japanese isolates of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, p.155-158, 1983.
 24. Jacobsen, S.; Wittig, M.; Poggeler, S. Interaction between mating type proteins from the homothallic fungus *Sordaria macrospora*. **Current Genetics**, Göteborg, v.41, p.150-158, 2002.
 25. Johnson, A.D. Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. **Current Opinion in Genetics & Development**, Baltimore, v.5, p.552-558, 1995.
 26. Kanamori, M.; Kato, H.; Yasuda, N.; Koizumi, S.; Peever, T. L.; Kamakura, T.; Teraoka, T.; Arie, T. Novel mating type-dependent transcripts at the mating type locus in *Magnaporthe oryzae*. **Gene**, Orlando-Amsterdam, v.403, p.6-17, 2007.
 27. Kang, S.; Chumley, F.G.; Valent, B. Isolation of the Mating-Type Genes of the Phytopathogenic Fungus *Magnaporthe grisea* Using Genomic Subtraction. **Genetics**, Bethesda, v.138, p.289-296, 1994.
 28. Kato, H.; Yamaguchi, T.; Nishihara, N. The Perfect State of *Pyricularia oryzae* Cav. in Culture. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v.42, p.507-510, 1976.
 29. Keszthelyi, A.; Janey, A.; Kerenyi, Z.; Mendes, O.; Waalwijk, C.; Hornok, L. Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcriptional factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). **Antoine van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.91, p.373-391, 2007.
 30. Klaubauf, S.; Tharreau, D.; Fournier, E.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W.; deVries, R.P.; Lebrun, M.-H. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (*Pyriculariaceae*). **Studies in Mycology**, Utrecht, p.1-36, 2014.
 31. Kim, H.; Metzberg, R.L.; Nelson, M.A. Multiple Functions of *mfa-1*, a Putative Pheromone Precursor Gene of *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.1, n.6, p.987-999, 2002.
 32. Klix, V.; Nowrousian, M.; Ringelberg, C.; Loros, J.J.; Dunlap, J.C.; Poggeler, S. Functional Characterization of MAT1-1-Specific Mating-type Genes in the Homothallic Ascomycete *Sordaria macrospora* Provides New Insights into Essential and Nonessential Sexual Regulators. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.9, p.894-905, 2010.
 33. Lee, S.; Lee, S.; Choi, D.; Lee, Y.; Yun, S. Identification of the down-regulated genes in a mat1-2-deleted strain of *Gibberella zeae*, using cDNA subtraction and microarray analysis. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v.43, p.295-310, 2006.
 34. Lichius, A.; Lord, K.M.; Jeffree, C.E.; Oborny, R.; Boonyarungsrit, P. Importance of MAP Kinases during Protoperithecial Morphogenesis in *Neurospora crassa*. **PLOS One**, San Francisco-Cambridge, v.7, n.8, e42565, p.1-21, 2012.
 35. Lord, K.M.; Read, N.D. Perithecial morphogenesis in *Sordaria macrospora*. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v.48, p.388-399, 2011.
 36. Maciel, J.L.N.; Ceresini, P.C.; Castroagudín, V.L.; Zala, M.; Kema, G.H.J.; McDonald, B.A. Population Structure and Pathotype Diversity of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 Years After Its Emergence in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v.104, n.1, p.95-107, 2014.
 37. Paoletti, M.; Seymour, F.A.; Alcocer, M.J.C.; Kaur, N.; Calvo, A.M.; Archer, D.B.; Dyer, O.S. Mating Type and the Genetic Basis of Self-Fertility in the Model Fungus *Aspergillus nidulans*. **Current Biology**, Maryland Heights-Cambridge, v.17, p.1384-1389, 2007.
 38. Poggeler, S. Two pheromone precursor genes are transcriptionally expressed in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. **Current Genetics**, Göteborg, v.37, p.403-411, 2000.
 39. Prabhu, A.S.; Filippi, M.C.; Silva, G.B. Dinâmica da População do Patógeno. In: Prabhu, A.S.; Filippi, M.C.; Silva, G.B. **Brusone em arroz: Controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p. 388.
 40. Saleh, D.; Xu, P.S.Y.; Li, C.; Adreit, H.; Milazzo, J.; Ravigné, V.; Bazin, E.; Nottéghem, J.; Fournier, E.; Tharreau, D. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.21, p.1330-1344, 2012.
 41. Seo, J.A.; Han, K.H.; Yu, J.H. Multiple roles of a heterotrimeric G-protein Y-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, Bethesda, v.171, p.81-89, 2005.
 42. Shahjahan, A.K.M. Practical approaches to rice blast management in tropical monsoon ecosystems, with special reference to Bangladesh. In: Zeigler, R.S.; Leong, S.A.; Teng, P.S. **Rice blast disease**. Wallingford: CAB International, 1994. p.465-488.
 43. Shen, W.C.; Bobrowicz, P.; Ebbole, D.J. Isolation of pheromone precursor genes of *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v.27, p.253-263, 1999.
 44. Silue, D.; Nottéghem, J.L. Production of perithecia of *Magnaporthe grisea* on rice plants. **Mycological Research**, Cambridge, v.94 n.8, p.1151-1152, 1990.
 45. Stuckenbrok, E.H.; McDonald, B.A. The Origins of Plant Pathogens in Agro-ecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.46, p.75-100, 2008.

46. Tosa, Y.; Chuma, I. Classification and parasitic specialization of blast fungi. **Journal of General Plant Pathology**, v.80, p.202-209, 2014.
47. Tredway, L.P.; Stevenson, K.L. Mating type Distribution and Fertility Status in *Magnaporthe grisea* Populations from Turfgrasses in Georgia. **Plant Disease**, St. Paul, v.87, n.4, p.435-441, 2003.
48. Turgeon, B.G. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p.115-137, 1998.
49. Turina, M.; Prodi, A.; Alfen, N.K.V. Role of the Mf1-1 pheromone precursor gene of the filamentous ascomycete *Cryphonectria parasitica*. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v.40, p.242-251, 2003.
50. Urashima, A.S.; Igarashi, S.; Kato, H. Host Range, Mating Type, and Fertility of *Pyricularia grisea* from Wheat in Brasil. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.12, p.1211-1216, 1993.
51. Urashima, A.S.; Silva, O.S. Characterization of *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) from Black Oat in Brasil. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v.159, n.11-12, p.789-795, 2011.
52. Valent, B.; Farrall, L.; Chumley, F.G. *Magnaporthe grisea* Genes for Pathogenicity and Virulence Identified Through a Series of Backcrosses. **Genetics**, Bethesda, v.127, p.87-101, 1991.
53. Viji, G.; Gnanamanickam, S.S. Mating type Distribution and Fertility Status of *Magnaporthe grisea* Populations from Various Hosts in India. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, n.1, p.36-40, 1998.
54. Viji, G.; Uddin, W. Distribution of Mating type Alleles and Fertility Status of *Magnaporthe grisea* Causing Gray Leaf Spot of Perennial Ryegrass and St. Augustinegrass Turf. **Plant Disease**, St. Paul, v.86, n.8, p.827-832, 2002.
55. Wang, X.; Lee, S.; Wang, J.; Ma, J.; Bianco, T.; Jia, Y. Current Advances on Genetic Resistance to Rice Blast Disease. In: Yan, W. **Rice: Germoplasm, Genetics and Improvement** Hangzhou: China Jiliang University, 2014. Cap.7, p.195-217. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/rice-germplasm-genetics-and-improvement/current-advances-on-genetic-resistance-to-rice-blast-disease>. Acesso em: 30 set. 2014.
56. Yaegashi, H.; Hebert, T.T. Effect of Temperature, Light and Nutrients on Production of Perithecia by *Pyricularia*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v.42, p.556-562, 1976.
57. Yaegashi, H.; Hebert, T.T. Perithecial Development and Nuclear Behaviour in *Pyricularia*. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, p.122-166, 1976.
58. Zeng, J.; Feng, S.; Cai, J.; Wang, L.; Lin, F.; Pan, Q. Distribution of Mating type and Sexual Status in Chinese Rice Blast Populations. **Plant Disease**, St. Paul, v.93, n.3, p.238-242, 2009.
59. Zhang, L.; Baasiri, R.A.; Van Alfen, N.K. Viral Repression of Fungal Pheromone Precursor Gene Expression. **Molecular and Cellular Biology**, Cambridge, v.18 n.2, p.953-959, 1998.
60. Zhang, H.; Wu, Z.; Wang, C.; Li, Y.; Xu, J. Germination and infectivity of microconidia in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Nature communications**, London, v.5, n.4518, p.1-9, 2014.