



**GLAUCO ANTÔNIO TEIXEIRA**

**TRANSMISSIBILIDADE DE *Magnaporthe oryzae*  
POR SEMENTES DE TRIGO E DELEÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DO GENE *BIN1* DO  
PATÓGENO**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**GLAUCO ANTÔNIO TEIXEIRA**

**TRANSMISSIBILIDADE DE *Magnaporthe oryzae* POR SEMENTES DE  
TRIGO E DELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *BINI* DO  
PATÓGENO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração Patologia de Sementes e Microscopia Eletrônica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Eduardo Alves

Coorientador

Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Teixeira, Glauco Antônio.

Transmissibilidade de *Magnaporthe oryzae* por sementes de trigo, e deleção e caracterização do gene BIN1 do patógeno / Glauco Antônio Teixeira. – Lavras : UFLA, 2014.

87 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Brusone. 2. Potencial de inoculo. 3. Silenciamento gênico. 4. Microscopia eletrônica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**TRANSMISSIBILIDADE DE *Magnaporthe oryzae* POR SEMENTES DE  
TRIGO E DELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *BINI* DO  
PATÓGENO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração Patologia de Sementes e Microscopia Eletrônica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 31 de março de 2014.

Dra. Elaine Aparecida de Souza UFLA  
Dra. Maria Alves Ferreira UFLA  
Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA  
Dra. Vanda Maria de Oliveira Cornélio EPAMIG

Orientador

Dr. Eduardo Alves

Coorientador

Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS - MG**

**2014**

A Deus, por estar sempre presente.

**Dedico**

A meus queridos pais, Antônio e Marta, por serem a razão da minha motivação e perseverança. A meus irmãos, Ramon e Pablo, pelo apoio e amizade.

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelas bolsas concedidas, respectivamente, no Brasil e no exterior e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao LME.

Ao professor Eduardo Alves, pelo imenso e contínuo apoio e orientação.

À professora Nicole Donofrio, pela experiência proporcionada.

Ao professor José C. Machado, sempre me apoiando da melhor forma.

À minha namorada, Livia, pelo amor e pela companhia incondicionais em todos os momentos.

Aos professores Elaine A. de Souza, Maria A. Ferreira, Renato M. Guimarães, Mário S. de Abreu, Flávio H. Medeiros, Mário Lúcio V. Resende, Ricardo M. de Souza, Edson A. Pozza, Ludwig H. Pfenning, Antônia dos R. Figueira e Vicente P. Campos.

Aos funcionários Eloísa, Elisa, Ângela, Ana Maria, Ruth, Sulamara, Carzinho, Elenice e Saritha.

Aos colegas de laboratório e amigos, Camila, Fabiano, Silvino, Elícia, Rafael, Amanda, Aline, Natália, Érika, Douglas, Cláudia, Janaira, Mirella, Carol, Carla, Ellen, Willian, Marciel e Mirian.

Aos amigos Eudes, Roberto Lanna, Luiz Henrique, Henrique Ferro, João Eduardo, Lilian, Cláudio Ogoshi, Gustavo, Helon, Gabriel Dornelas, Gabriel Vasco, Felipe, Edgar e Samuel.

Aos amigos da República, Fábio, Willian (Coyote), Eugênio Chaves e Marcos Helvécio.

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

## RESUMO GERAL

Dentre as doenças fúngicas da cultura do trigo, a brusone, causada por *Magnaporthe oryzae*, tem se destacado nos últimos anos. Sua principal forma de disseminação entre lavouras é por meio das sementes. Assim, este trabalho foi realizado com os objetivos de estudar a transmissibilidade de *M. oryzae* por sementes de trigo e os efeitos dos potenciais de inóculo no desenvolvimento inicial das plantas e nocautear o gene *Bin1* do patógeno para verificar o comportamento dos mutantes *in vitro* e quando inoculados em plantas de cevada. Foram realizados os testes de germinação e incidência (*blottertest*) e o teste de vigor. Para visualização do interior das sementes, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura. O tipo selvagem *Bin1-Guy11* de *Magnaporthe oryzae* foi transformado pela técnica de protoplastos e os mutantes foram selecionados em meio completo contendo 300 µg/mL de higromicina B. Avaliaram-se o crescimento micelial, a germinação de esporos e a formação de apressórios. O teste de patogenicidade foi realizado utilizando-se plantas de cevada. Em ambas as cultivares, a germinação das sementes diminuiu com o aumento do tempo de exposição das sementes ao inóculo, enquanto a incidência de *M. oryzae* nas sementes aumentou. O índice de velocidade de emergência (IVE), o estande inicial (EI), o estande final (EF) e a diferença de estandes (EI-EF) não diferiram entre si, para ambas as temperaturas de 20 e 25 °C. Porém, a altura das plantas e o peso seco foram maiores na temperatura de 25 °C. Para a cultivar MGS Brilhante, nas sementes não inoculadas, o IVE diminuiu com o aumento do tempo de exposição das sementes ao meio osmoticamente modificado e, para as sementes inoculadas, o IVE aumentou até próximo ao tempo de 48 horas de exposição, a partir do qual começou a diminuir. EI e EF diminuíram com o aumento do tempo de exposição das sementes ao meio, inclusive na presença do fungo. No entanto, esta queda foi mais acentuada quando na presença apenas do meio osmoticamente modificado. EI e EF, a partir de 72 horas de exposição, foram maiores nas sementes inoculadas que nas não inoculadas com o fungo. A diferença nos estandes aumentou com a maior exposição das sementes, sendo mais acentuada para as sementes apenas em contato com o meio, sem a presença do fungo. Tanto a altura de plantas quanto o peso seco diminuíram com o aumento do tempo de exposição das sementes, mesmo na ausência do fungo. Ao contrário, a cultivar BRS 264 apresentou menor germinação, IVE, EI, EF e EF-EI e maior incidência nos tratamentos com sementes inoculadas, quando comparados com as não inoculadas. Por meio da microscopia eletrônica de varredura verificou-se que houve deformações nos tecidos das sementes de ambas as cultivares submetidas aos diferentes potenciais de inoculação, à medida que se aumentou o tempo de exposição, tendo esse efeito sido mais expressivo na cultivar BRS 264. Em tecidos foliares, observou-se maior padrão

---

Comitê Orientador: Eduardo Alves – UFLA (Adviser) and José da Cruz Machado – UFLA.

de colonização na cultivar BRS 264, não tendo havido diferença entre os isolados. Três mutantes (*bin1-13*, *bin1-19* e *bin1-23*) e um *ectopic* (*bin1-24*) foram obtidos. O tipo selvagem *Bin1-Guy11* apresentou maior taxa de crescimento micelial (TCM) que os isolados *bin1-13*, *bin1-23*, *bin1-19* e *bin1-24* em meio completo, e o tipo selvagem *Bin1-Guy11* e o *bin1-24* (ectopic) mostraram TCM maior que os outros isolados, em meio mínimo. A germinação de conídios não se diferenciou significativamente entre os tratamentos. No entanto, o tipo selvagem *Bin1-Guy11* e o *ectopicbin1-24* apresentaram mais apressórios formados que os outros mutantes. O tipo selvagem *Bin1-Guy11* produziu mais lesões por folha que os mutantes. Portanto, conclui-se que *M. oryzae* interfere negativamente no desempenho das sementes de trigo e que a presença do restritor hídrico contribuiu para a queda do desempenho das mesmas. Também os sintomas da brusone foram fortemente reduzidos quando o gene *Bin1* foi deletado.



## GENERAL ABSTRACT

Among the fungal diseases of wheat, wheat blast, caused by *Magnaporthe oryzae*, has emerged in recent years. Its main form of dissemination among crop fields is by seeds. This work aimed to study the transmissibility of *M. oryzae* by wheat seeds and the effects of inoculum potential in plant development and knock out the *Bin1* gene pathogen to verify the behavior of mutants in vitro and when inoculated on barley plants. Germination tests and incidence (blotter test) and vigor tests were performed. Images of inside part of the seeds were obtained using the scanning electron microscope. The wild-type *Guy11-Bin1M.oryzae* was transformed by protoplast technique and mutants were selected in complete medium containing 300µg/mL of hygromycin B. It has been evaluated the mycelial growth, spore germination and appressorium formation. The pathogenicity test was performed using barley plants. In both cultures, the germination decreased with increasing exposure time of the inoculum to seed, while the incidence of *M. oryzae* increased. The emergence rate index (ERI), initial stand (IS), final stand (FS) and stands difference (IS-FS) did not differ for both temperatures of 20 and 25 °C. However, plant height and dry weight were higher at 25 °C. For cultivar MGS Brilhante, seeds not inoculated, the ERI decreased with increasing time of exposure of seeds to osmotically modified medium, and for the inoculated seeds, the ERI increased until near the time of 48h exposure, from which began to decline. The IS and FS decreased with increasing the time of exposure of the seeds to the environment, even in the presence of the fungus.

---

Advising Committee: Eduardo Alves – UFLA (Adviser) and José da Cruz Machado – UFLA.

However, this decrease was more pronounced only in the presence of osmotically modified medium. The IS and FS, from 72h of exposure were higher in inoculated seeds than in non- inoculated with the fungus. The difference in the stands increased with increasing exposure of seeds, more pronounced for seeds only in contact with the medium, without the presence of the fungus. Both plant height and the dry weight decreased with increasing time of exposition, even in the absence of the fungus. In contrast , BRS 264 showed lower germination, ERI, IS, FS and IS-FS and higher incidence in treatments with inoculated seeds compared with non-inoculated. By scanning electron microscopy showed that there were strains in the tissues of seeds of both cultivars subjected to different potentials of inoculation, as was increased exposure time, and this effect was larger in BRS 264. In leaf tissues, we observed a higher colonization pattern on BRS 264, with no differences among the isolates. Three mutants (*13-Bin1*, *19-Bin1* and *23-Bin1*) and ectopic (*24-Bin1*) were obtained. The wild-type *Guy11-Bin1* showed the highest mycelial growth index (MGI) that isolates *13-Bin1*, *19-Bin1*, *23-Bin1* and *24-Bin1*, in complete medium, and the wild-type *Guy11-Bin1* and *24-Bin1* (ectopic) MGI have shown larger than the other isolates in minimal medium. Conidia germination did not differ significantly between treatments. However, the wild-type *Guy11-Bin1* and ectopic *24-Bin1* showed more appressoria formed than the others mutants. Also, the wild-type *Guy11-Bin1* produced more lesions per leaf than the mutants. Therefore, it has been concluded that *M. oryzae* has impacted negatively on the performance of wheat seeds and that the presence of water restrictor contributed to the decrease in performance of the them. Also, the blast symptoms were significantly reduced when the *Bin1* gene was deleted.

---

Advising Committee: Eduardo Alves – UFLA (Adviser) and José da Cruz Machado – UFLA.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	9
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	11
2.1 Origem e evolução do trigo.....	11
2.2 Importância do trigo .....	12
2.3 A brusone do trigo.....	13
2.4 Etiologia e ciclo da doença .....	13
2.5 Sintomatologia .....	15
2.6 Hospedeiros, regiões de ocorrência e danos causados pela brusone .....	16
2.7 <i>M. oryzae</i> em sementes e níveis de inoculação .....	19
2.8 Controle .....	20
2.9 Interação planta-patógeno.....	22
2.10 Biologia molecular aplicada aos estudos de patogenicidade e virulência .....	23
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	24
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2.....	36
1 INTRODUÇÃO .....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1 Organismos e condições de crescimento .....	39
2.2 Inoculação das sementes .....	40
2.3 Transmissibilidade de <i>M. oryzae</i> de sementes de trigos para plântulas....	41
2.4 Detecção de <i>M. oryzae</i> em plântulas assintomáticas .....	42
2.5 Desempenho das sementes submetidas a diferentes potenciais de inóculo .....	43
2.5.1 Germinação de sementes e incidência de <i>M. oryzae</i> em sementes de trigo inoculadas artificialmente sob diferentes tempos de exposição .....	43
2.5.2 Coleta das amostras para microscopia eletrônica .....	43
2.5.3 Eventos de pré-penetração, penetração e colonização de <i>M. oryzae</i> em folhas de trigo inoculadas artificialmente .....	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
3.1 Transmissibilidade de <i>M. oryzae</i> por sementes .....	45

3.2	Detecção de <i>M. oryzae</i> em sementes de trigo inoculadas artificialmente	52
3.3	Germinação de sementes e incidência de <i>M. oryzae</i> em sementes de trigo inoculadas artificialmente sob diferentes tempos de exposição	56
3.4	Influência da restrição hídrica em sementes de trigo e seus efeitos no desenvolvimento das plântulas	59
3.5	Eventos de pré-penetração, penetração e colonização de <i>M. oryzae</i> em tecidos foliares de trigo	62
4	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	CHAPTER 3	68
	Characterization and target deletion of <i>Bin1</i> in <i>Magnaporthe oryzae</i> and its effect on fungal development and plant infection process	68
1	INTRODUCTION	70
2	MATERIAL AND METHODS	71
2.1	Fungal strains, growth conditions, and transformation	71
2.2	Plasmids, DNA Libraries, and DNA Manipulations	71
2.3	Mycelial growth, conidia germination, and appressorium formation	73
2.4	Plant infection assay	73
3	RESULTS	74
3.1	Obtaining the construct and the mutants	74
3.2	Mycelial growth, conidia germination, and appressorium formation	76
3.3	Plant infection assay	77
3.4	Comparing Bin1 sequences in close species	80
4	DISCUSSION	81
	ACKNOWLEDGEMENTS	83
	REFERENCES	84

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O trigo faz parte da alimentação básica, em muitos países no mundo, devido à sua grande utilização na produção de pães, biscoitos e farinhas, entre outros, e também por ter papel fundamental na composição de rações para a alimentação animal. A crescente demanda deste produto reflete a necessidade de aumento da produção. Para isso, é essencial e estratégico que haja investimento, principalmente no aumento de produtividade das lavouras.

Com foco nesse aumento de produtividade, vários fatores devem ser considerados, tais como aumento da fertilidade do solo, uso de cultivares mais adaptadas às regiões produtoras, zoneamento agrícola, rotação e sucessão de culturas e controle de plantas daninhas, pragas e doenças, dentre outros. Existem relatos de que as doenças podem causar perdas de até 100% da produção nessas culturas, como é o caso da brusone, causada pelo ascomiceto *Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr. [anamorph *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc.] (COUCH; KOHN, 2002), considerada a mais importante doença de alguns cereais, como aveia, avevém, centeio e, principalmente, arroz e o trigo.

Por ser um patógeno capaz de atacar uma diversidade de espécies de plantas, sua ocorrência abrange todas as áreas de cultivo, em vários países do mundo. No entanto, a brusone do trigo encontra-se ainda restrita aos países da América do Sul.

Apesar de sobreviver em restos de cultura, sua principal forma de disseminação entre lavouras é por meio das sementes (BRUNO; URASHIMA, 2001; NUNES et al., 2002; PRABHU; FILIPPI, 2006). Entretanto, o potencial de inóculo nas sementes necessário para causar uma epidemia ainda é pouco conhecido. Alguns autores relatam que uma pequena fonte de inóculo é

suficiente para que a doença se espalhe rapidamente nas lavouras, em condições favoráveis. Além disso, apesar de, em vários trabalhos, as sementes serem citadas como principal forma de disseminação, fatores relacionados à localização exata do patógeno nos tecidos das sementes ainda precisam ser elucidados. Para isso, existem várias técnicas modernas de detecção, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, esta é uma técnica qualitativa e que não permite a visualização do patógeno *in loco*. Paralelamente, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra ser uma excelente ferramenta para demonstrar a localização de patógenos em diferentes tecidos, inclusive nas sementes. Em vários trabalhos utilizou-se essa tecnologia para ajudar a compreender as diversas interações entre patógeno e hospedeiro.

O uso da biotecnologia no estudo de microrganismos tem proporcionado inestimáveis contribuições para diversas áreas do conhecimento, inclusive na fitopatologia. Dentre as suas diversas aplicações, a técnica de obtenção de organismos geneticamente modificados tem sido amplamente utilizada, não somente por melhoristas na obtenção de cultivares resistentes a determinada praga ou doença, mas também por fitopatologistas interessados em conhecer mais profundamente os mecanismos (genes, enzimas, proteínas) integrantes da rota metabólica que leva à infecção dos patógenos nas plantas. Em *Magnaporthe oryzae*, o nocaute de alguns genes-alvo tem resultado em uma diversidade de mutantes, fenótipos estes que contribuem para explicar a atuação de determinadas proteínas, principalmente aquelas relacionadas à patogênese.

Diante disso, este trabalho foi realizado com os objetivos de estudar os efeitos dos níveis de inoculação no desempenho de sementes de trigo inoculadas com *M. oryzae*, nocautear o gene *Bin1* do fungo e avaliar os fenótipos dos mutantes de *M. oryzae* quanto à patogenicidade.

A tese está dividida em três capítulos. No primeiro, trata-se do referencial teórico sobre o que será abordado no decorrer dos trabalhos

seguintes. O segundo capítulo refere-se aos estudos dos efeitos do patógeno no desempenho de sementes de trigo e, por fim, no terceiro capítulo, os estudos moleculares da deleção do gene *Bin1* de *M. oryzae*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Origem e evolução do trigo

O trigo pertence à espécie *Triticuma estivum* L., família Poaceae, tribo Triticeae e gênero *Triticum*. É uma planta hermafrodita, de ciclo anual, autógama, sendo considerada uma das principais fontes de carboidratos do mundo. É originário do sudeste asiático e seus relatos de domesticação remontam há, pelo menos, 7.000 anos a.C. (BRAMMER et al., 2000; MORAES-FERNANDES et al., 2000; PATNAIK; KHURANA, 2001).

As espécies do gênero *Triticum* têm um número básico de sete cromossomos, apresentando diferentes níveis de ploidia, incluindo espécies diploides ( $2n=14$ , genoma AA), tetraploides ( $2n=28$ , genomas AABB) e hexaploides ( $2n=42$ , genomas AABBDD). As espécies atualmente cultivadas comercialmente são o trigo duro tetraploide *Triticum turgidum* L. e o trigo comum hexaploide, *Triticum aestivum* L., sendo este composto por três genomas distintos, poliplodia natural que confere ao trigo certas características que facilitam a incorporação de genes de espécies afins (JAHUAR, 1993).

Após vários anos de melhoramento genético, as modificações em rendimento, qualidade de panificação, arquitetura da planta e aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos foram relevantes. Existem, atualmente, genótipos cultivados em um espectro amplo, desde a linha do Equador até 60° de latitude (LUPTON, 1987). As migrações aos vários ecossistemas têm sido propiciadas, principalmente, pela intervenção do homem,

por meio de seleção e de introdução de novas cultivares, que sejam adaptadas a condições ambientais específicas (ANGRA, 1995).

## **2.2 Importância do trigo**

Além de ser cultivado nas mais diversas regiões do mundo, o trigo é fundamental na base alimentar dos povos, principalmente depois de ter sido transformado em farinha, atribuindo-lhe inúmeras finalidades, como fabricação de pães, biscoitos, macarrão, bolachas, bolos e confeitaria, entre outros.

A produção mundial de trigo concentra-se, atualmente, em torno de 669,5 milhões de toneladas, sendo a União Europeia a maior produtora, com destaque para França, Alemanha, Reino Unido e Polônia, seguidos por China, Índia, Rússia e Estados Unidos, entre outros (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2013).

No Brasil, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2014), a estimativa de área cultivada de trigo, para a safra 2013/14, é de 2,20 milhões de hectares, em um total de 54,98 milhões de hectares cultivados com grãos. Portanto, com uma estimativa de produção de 193,59 milhões de toneladas de grãos, 3,6% superior ao volume produzido na safra 2012/13, a cultura do trigo (5,8 milhões de toneladas) representará 10,5% do volume total de grãos produzidos no país. Ainda segundo a CONAB (2014), a produtividade do trigo terá um aumento de 13,8%, produzindo, em média, 2.631 kg/ha.

A produção de trigo concentra-se, principalmente, na região sul, com destaque para os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, responsáveis por 90% da produção nacional. Entretanto, a cultura vem se expandindo rapidamente para as regiões centrais do país, em especial para os estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (LIMA, 2004).



### 2.3 A brusone do trigo

A cultura do trigo é limitada por diversas doenças de origem biótica, incluindo bactérias, fungos, nematoides e vírus, registradas em vários países do mundo, reduzindo significativamente a produtividade, a qualidade fisiológica e sanitária das sementes e a qualidade dos grãos. Os fungos são considerados os principais causadores de doenças nesta cultura (MURRAY, 2010). Dentre estas doenças, destaca-se a brusone, causada por *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch (ana. *Pyricularia oryzae* Cavara) (COUCH; KOHN, 2002), agente causal de severas doenças em mais de 50 espécies de gramíneas, em especial trigo e arroz, e outros importantes cereais para consumo humano e animal (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2009).

### 2.4 Etiologia e ciclo da doença

*Magnaporthe oryzae* B. C. Couch (ana. *Pyricularia oryzae* Cavara), agente causal da brusone, encontra-se, segundo a classificação taxonômica de Couch e Kohn (2002), no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Magnaporthales e Família Magnaporthaceae. O agente causal da brusone do trigo é um fungo que apresenta, no campo, em seu ciclo biológico, apenas a forma anamórfica, sendo a forma teleomórfica relatada somente em laboratório. Na forma anamórfica denomina-se *Pyricularia oryzae* Cavara, caracterizada por conidióforos simples ou em grupos, podendo penetrar através de estômatos ou entre células epidérmicas. A maioria deles não apresenta ramificação, podendo ser retos ou sinuosos, geniculados próximos ao ápice e de coloração pardo-clara e lisos (PURCHIO; MUCHOVEJ, 1994).

Os conídios são solitários, secos, terminais ou laterais, simples, hialinos, lisos, septados, com presença de hilo protuberante. Inicialmente, são aderidos ao

conidióforo por meio de uma célula e, quando maduros, a célula se divide em duas, liberando o conídio (ALVES; FERNANDES, 2006; ELLIS, 1971; PURCHIO; MUCHOVEJ, 1994). As células conidiais são mononucleares (PRABHU; FILIPPI, 2006). Os conídios apresentam formatos piriformes obclavados, arredondados na base e estreitando-se em direção ao ápice. As dimensões podem variar de 17-28  $\mu\text{m}$  de comprimento e 6-9  $\mu\text{m}$  de largura (ELLIS, 1971). Cada conidióforo pode formar de 1 a 20 conídios (PRABHU; FILIPPI, 2006).

A corrente de eventos que envolvem o desenvolvimento da doença, incluindo as fases e as subfases do desenvolvimento do agente causal e o efeito da moléstia no hospedeiro, constitui o ciclo da doença, também correspondente ao ciclo das relações patógeno-hospedeiro (AGRIOS, 2005). A brusone caracteriza-se como uma doença policíclica em folhas do trigo, apresentando vários ciclos do patógeno em relação a um ciclo do hospedeiro (PAGANI, 2011). O ciclo inicia-se com o esporo atingindo a superfície do hospedeiro que, em contato com a água, libera uma substância mucilagínosa no seu ápice, que o adere à superfície do hospedeiro (EBBOLE, 2007; LEITE et al., 2001; PRABHU; FILIPPI, 2006). O início da germinação ocorre com a emissão do tubo germinativo, podendo ser produzido pela célula basal ou apical, raramente pela mediana. Nesta fase começa a ocorrer a degradação de carboidratos, fonte de energia dos conídios. Posteriormente, o tubo germinativo começa a se diferenciar em um apressório, que medeia a penetração do fungo nas células epidérmicas em menos de 24-30 horas após a inoculação (PRABHU; FILIPPI, 2006; RIBOT et al., 2008). Na penetração da cutícula, o apressório exerce uma pressão de turgor de, aproximadamente, 80 atm (EBBOLE, 2007; HOWARD; FERRARI, 1989; HOWARD; VALENT, 1996; PAGANI, 2011). A superfície externa da planta é rompida por meio da formação de um *peg* de penetração que, ao entrar na célula, diferencia-se em uma hifa especializada dando origem a um

grampo de conexão, transferindo o conteúdo nuclear e citoplasmático do apressório para a hifa primária (PAGANI, 2011). Mais tarde, dentro das células da planta hospedeira, a colonização célula-célula ocorre através dos plasmodesmas. O fungo diferencia hifas infecciosas que colonizam tecidos do hospedeiro, ainda sem danos visíveis. Após 4-5 dias da penetração, o fungo destrói os tecidos colonizados, aparecendo as lesões necróticas que, posteriormente, esporulam, iniciando-se um novo ciclo (RIBOT et al., 2008).

Para a sua sobrevivência, os principais mecanismos são o parasitismo de hospedeiros cultivados e de hospedeiros secundários, o saprofitismo em restos culturais de plantas cultivadas suscetíveis, as plantas voluntárias que permanecem no campo na entressafra e as próprias sementes (DÍAZ et al., 2004).

## **2.5 Sintomatologia**

Como resultado da invasão dos tecidos do trigo e a extração de nutrientes, a doença se exterioriza pelos sintomas. Os sintomas podem ocorrer em toda a parte aérea da planta, entretanto, são mais comuns em espigas, ocorrendo também em folhas, colmos, bainhas, nós, pedúnculo, glumas aristas e sementes (IGARASHI, 1988). O sintoma em folha é o menos frequente; as lesões apresentam formato elíptico, com comprimento de 2 a 25 mm e largura de 1 a 2 mm, de coloração castanha. O centro da lesão, com o passar do tempo, torna-se esbranquiçado e a margem definida de coloração castanho-avermelhada. A frutificação do fungo pode deixar a lesão com uma coloração acinzentada (TOLEDO; ESCOBAR, 2002).

Na espiga ocorre o branqueamento parcial a partir do ponto de penetração do patógeno na ráquis, e as espigas severamente infectadas podem apresentar escurecimento da base e de parte do pedúnculo (LAU et al., 2011). A ráquis apresenta uma lesão de coloração negra, de aspecto brilhante, com

dimensões indefinidas. No ponto de infecção ocorre a interrupção da translocação de água e nutrientes para a espiga, impedindo o pleno enchimento de grãos, deixando-os chochos. Esse efeito pode ocorrer em qualquer parte da ráquis, podendo, em ataques severos, ser observado em mais de um ponto por ráquis (DÍAZ et al., 2004).

## **2.6 Hospedeiros, regiões de ocorrência e danos causados pela brusone**

O fungo *P. oryzae* apresenta uma ampla gama de hospedeiros, destacando-se o trigo, o arroz e a cevada. Numerosas gramíneas cultivadas, nativas e invasoras, são mencionadas como hospedeiros deste patógeno. No Brasil, *Pyricularia* ocorre em Poaceas, geralmente encontradas em lavouras de arroz e trigo, como *Brachiaria plantaginea*, *Cenchrus echinatus*, *Digitaria horizontalis*, *D. sanguinalis*, *Echinochloa colonum*, *E. crusgali*, *Eleusine indica*, *Hyparrhenia rufa*, *Lolium multiflorum*, *Pennisetum setosum*, *Rhynchylietrium roseum* e *Setaria geniculata* (BRUNO; URASHIMA, 2001; NUNES et al., 2002; PRABHU; FILIPPI, 2006). Prabhuet al. (1982) testaram a virulência de isolados de arroz, trigo e diferentes Poaceas invasoras, tendo demonstrado que todos os isolados foram infectivos ao trigo e à cevada. Porém, não existem relatos de *M. oryzae* infectando trigo, fora da América do Sul (MACIEL et al., 2014).

A ocorrência da brusone em trigo, na região sul do Brasil, foi descrita, pela primeira vez, por Igarashiet al. (1986), no estado do Paraná, nos municípios de Primeiro de Maio, Sertanópolis, Rancho Alegre, Londrina, Engenheiro Beltrão e São Pedro do Ivaí, no ano de 1985, de forma esporádica. Já no ano de 1986, ocorreu maior disseminação da doença nas regiões norte e oeste do Paraná, noroeste de São Paulo e sul do Mato Grosso do Sul, acarretando prejuízos consideráveis no norte do Paraná. A situação se agravou na safra de

1987, quando a doença tomou proporções epidêmicas nas regiões mencionadas anteriormente e provocou perdas parciais ou totais em muitas lavouras. Naquele ano, em cerca de 70 municípios, houve prejuízos estimados em 10% a 12% (IGARASHI, 1988; IGARASHI et al., 1986).

Conforme relatos de Igarashi (1988), a manifestação da doença se deu cerca de 8 a 10 dias após a emergência, devido à presença de sementes infectadas, cultivares suscetíveis, inóculo da safra anterior e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. Na época, a intensidade do ataque foi maior nos Vales do Paranapanema, Ivaí e Tibagi, em especial notada nos cultivares precoces, semeadas até a primeira quinzena de abril. De 1988 a 1992, no Mato Grosso do Sul, foi realizado um trabalho com o objetivo de avaliar os danos causados por *Pyricularia grisea* em trigo, pelo qual foi verificado que a importância econômica da brusone decorre das reduções no rendimento e na qualidade dos grãos.

Na safra 2004, a brusone voltou a causar graves prejuízos, principalmente no Cerrado brasileiro e no Mato Grosso do Sul, assim como nas regiões norte e oeste do estado do Paraná, provocando um alerta geral aos produtores de trigo e de cevada nessas regiões.

De acordo com Torres et al. (2009), a brusone está presente, além do Brasil, em áreas do Paraguai e da Bolívia, causando danos irreparáveis nas culturas de trigo. Quatro anos após a sua descoberta pela primeira vez no Brasil, no ano de 1985, causou danos graves nos campos de trigo do Paraguai. Em 2007, a doença foi registrada em campos de trigo na Argentina, com 100% de incidência de plantas infectadas na área (CABRERA; GUTIÉRREZ, 2007; PERELLÓ et al., 2011). Além do Paraguai e da Argentina, também está presente no Uruguai e na Bolívia (URASHIMA, 2010).

A forte intensidade com que a brusone vem se manifestando nas lavouras de trigo no cerrado brasileiro e nas principais regiões produtoras tem

preocupado tanto a comunidade científica nacional quanto a internacional. Recentemente, na safra 2009/2010, a ocorrência de brusone foi intensa, devido às condições climáticas favoráveis prevalentes nas regiões produtoras, abrangendo desde o norte do Paraná até o Distrito Federal (TORRES et al., 2009).

*M. oryzae* pode infectar todos os órgãos aéreos da planta, incluindo folhas, colmo e espiga. Os danos ocasionados pela brusone na produção de grãos de trigo dependem do momento da infecção da espiga e do local de penetração do fungo, podendo afetar a espiga parcial ou totalmente. A infecção da espiga do trigo é a forma mais destrutiva de ocorrência da doença. O estrangulamento da espiga impede a passagem de nutrientes, provocando diminuição do tamanho dos grãos, tornando-os inutilizáveis tanto para a comercialização quanto para a utilização na alimentação humana (TORRES et al., 2009).

Os danos ocasionados por este fitopatógeno na produção de grãos dependem, basicamente, do momento de infecção com relação ao desenvolvimento ontogênico da espiga e do local de penetração do fungo, que pode ocorrer em qualquer local do ráquis, afetando a espiga inteira ou parte dela, cujo estrangulamento impede a passagem de nutrientes e, conseqüentemente, ocorre a diminuição do tamanho do grão. Os grãos danificados pela doença não são aproveitáveis para comercialização e utilização na alimentação humana (TRINDADE et al., 2006).

Goulart e Paiva (2000) observaram redução de 51% do rendimento de grãos e incidência de 86% em campos de trigo, no estado de Mato Grosso do Sul, na safra 1991 e 1992 e, mais recentemente, Urashima et al. (2009) verificaram incidência de 76,2% e redução na produtividade de 32,2% na variedade BRS 208 na região de Itapeva, SP, na safra de 2005. Urashima e Kato (1994) verificaram que não existe nenhuma variedade de trigo resistente a todos

os isolados do fungo, apesar de algumas, como, por exemplo, a MGS Brilhante, serem consideradas moderadamente resistentes.

### **2.7 *M. oryzae* em sementes e níveis de inoculação**

Sementes infectadas são consideradas uma das principais fontes de disseminação de diferentes doenças de plantas. Foi considerada a principal fonte de inóculo primário para as primeiras epidemias de brusone na Califórnia, em 1997 (GREER; WEBSTER, 2001) e pela disseminação do fungo em trigo do Paraná para o Mato Grosso do Sul (URASHIMA et al., 1999).

Além disso, outro fator que ressalta a importância de sementes como fonte de inóculo reside no tempo de sobrevivência do fungo dentro desse órgão. *P. grisea* sobreviveu por mais de oito anos, dentro de tecidos do pericarpo de milho. *Eleusine coracana* (KATO, 1978) sobreviveu por 22 meses, em sementes de trigo, em condições de laboratório (REIS; BLUM; FORCELINI, 1995) e foi encontrado em sementes de arroz preservadas no banco de germoplasma por mais de 10 anos (FAIAD et al., 1996), evidenciando que a viabilidade do fungo é igual ou maior que a da própria semente.

A detecção de patógenos em sementes é o ponto de partida para o planejamento e a recomendação de medidas de controle mais eficientes. No entanto, alguns patógenos, como *M. oryzae*, tornam-se de mais difícil detecção quando em níveis de infestação mais baixos. Nesse sentido, os ensaios de sementes mais utilizadas para a detecção da brusone do arroz são placas de ágar e teste de sanidade (*blotter test*) com congelamento (NEERGAARD; LAMBAT; MATHUR, 1970), que envolvem a identificação dos sintomas da doença, o isolamento e o cultivo do patógeno, e a identificação pela morfologia e testes bioquímicos. Os métodos de detecção, apesar de simples e de fácil execução, podem levar a problemas na identificação e na interpretação e, assim, atrasar o

diagnóstico e o tratamento (ATKINS; CLARK, 2004). Outro método baseia-se na detecção sorológica do *M. grisea* (LEE; SCOTT; XIA, 1998), no entanto, é, geralmente, difícil a obtenção de anticorpos com a especificidade necessária para fungos (WARD; TAHIRI-ALAOUI; ANTONIW, 1998). Segundo Konstantinova et al. (2002), um teste adequado para este diagnóstico deve ser sensível e específico, a fim de evitar resultados cruzados com outros fungos.

Assim, outras técnicas de detecção de patógenos têm sido bastante utilizadas, como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR). Ensaios de detecção baseados em PCR auxiliam no diagnóstico rápido, com altos níveis de sensibilidade (LEE; TEWARI; TURKINGTON, 2002). Tais métodos de detecção com base em PCR têm sido desenvolvidos para muitos patógenos de plantas (KONSTANTINOVA et al., 2002; KULIK et al., 2004; LEE; TEWARI; TURKINGTON, 2002; VANDEMARK et al., 2000), inclusive para *M. oryzae* em arroz (CHADHA; GOPALAKRISHNA, 2006), o que permite também sua adaptação para detecção de *M. oryzae* em outros cereais, inclusive no trigo.

Paralelamente, é imprescindível que se estabeleçam níveis pré-definidos de infecção nas sementes, para que seja possível analisar de forma mais precisa os resultados relacionados tanto com a transmissibilidade do fungo quanto com os efeitos causados seja pelo fungo, pela técnica de inoculação ou por ambos. Em vários trabalhos têm sido demonstrado os efeitos dos potenciais de inóculo na germinação e no vigor das sementes de diversas culturas agrícolas, e também nos níveis de incidência dos patógenos nestas sementes (COSTA et al., 2003; COUTINHO et al., 2001; MACHADO et al., 2007, 2001a, 2001b, 2004).

## **2.8 Controle**

Desde seu primeiro relato, boa parte da pesquisa científica esteve voltada para estudos sobre o tratamento de sementes capaz de prevenir o



desenvolvimento do fungo nos estágios iniciais da cultura. O tratamento com fungicidas tem sido uma importante estratégia utilizada no controle da brusone, tanto em trigo quanto em arroz (GOULART; PAIVA, 1991; PANDE et al., 1994). Alternativamente, a utilização de óleos essenciais no tratamento de sementes de milho contra *Stenocarpella maydis* também foi considerada uma técnica eficiente no controle deste patógeno (TEIXEIRA et al., 2013).

Portanto, é necessário um conjunto de técnicas e medidas a serem aplicadas integradamente com as práticas agrônômicas, reduzindo a população do patógeno a níveis toleráveis, sem causar danos econômicos. Porém, o seu sucesso depende da seleção de técnicas apropriadas para os diferentes ecossistemas (PRABHU; FILIPPI, 2006). De modo geral, os níveis de brusone podem ser minimizados de forma satisfatória por meio do uso de conjunto de medidas, como uso de variedades com resistência moderada, incorporação de restos culturais, eliminação de plantas hospedeiras, uso de sementes de boa qualidade, rotação de cultura, tratamento químico de sementes, plantio em época menos favorável à doença e pulverização com fungicidas.

Quanto aos genótipos resistentes de trigo, não há variedades altamente resistentes à doença (GOULART; PAIVA, 1993). Por exemplo, Maciel et al. (2008), testando diferentes genótipos de trigo submetidos à inoculação de *P. oryzae*, concluíram que a maioria demonstrou alta suscetibilidade à doença na espiga, embora alguns materiais tenham demonstrado graus de resistência à doença nas folhas-bandeira. De acordo com Trindade et al. (2006), a cultivar BR-18, genótipo mais semeado na região do cerrado no cultivo de safrinha, demonstrou o melhor nível de resistência parcial, comparada aos outros genótipos de trigo testados.

Devido à existência de numerosos hospedeiros secundários de *M. oryzae* e de este também poder colonizar saprofiticamente os substratos de restos culturais, estas características reduzem drasticamente o efeito erradicante da

rotação de culturas. A produção de esporos a partir de plantas hospedeiras secundárias ou restos de cultura, facilmente transportados pelo vento a longas distâncias, pode introduzir o patógeno naquelas áreas onde se procurou eliminá-lo por meio da rotação de culturas (REIS; BLUM; FORCELINI, 1995). Dessa forma, a rotação de culturas tem efeito bastante limitado para o controle da doença.

## 2.9 Interação planta-patógeno

A rota de transdução dos sinais que regula a morfogênese da infecção tem sido extensivamente estudada em *M. grisea* (TUCKER; TALBOT, 2001; XU, 2000). Em geral, o AMP cíclico (cAMP) sinal é envolvido no reconhecimento da superfície e na iniciação da formação do apressório (ADACHI; HAMER, 1998). Entretanto, a formação do apressório é regulada pelo *Pmk*, ativador da rota da proteína kinase (PARK et al., 2006; ZHAO et al., 2005). O mutante do *pmk1* é falho em formar apressório e não patogênico (PARK et al., 2002). O mutante do gene *mst12* forma apressório melanizado, com baixo poder de penetração. Acredita-se que este gene tenha uma atuação em conjunto com o anterior (PARK et al., 2004). Outros mutantes *PLS1* e *MPS1* que se conhecem, formam apressório melanizado, mas falham na penetração (CLERGEOT et al., 2001; XU; STAIGER; HAMER, 1998).

Além da importância da diferenciação das estruturas de infecção, é conhecido que a secreção de proteínas eliciadoras tem papel importante na patogênese de muitos fungos. A análise do genoma de *M. grisea* tem revelado a presença de 739 proteínas secretadas, duas vezes mais que as de *Neurospora crassa* (DEAN et al., 2005), um fungo não patogênico. É muito importante entender como estas proteínas são secretadas nas células do hospedeiro e

conhecer o mecanismo de regulação desta secreção pelo fungo (ZHENG et al., 2007).

Na interação planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou à resistência da hospedeira ocorre em nível celular, tanto do patógeno como da planta hospedeira. Detalhes de tais modificações têm sido obtidos por meio de estudos bioquímicos, enzimológicos e moleculares, mas sua visualização só tem sido possível por meio dos estudos morfológicos. Para se visualizar tais processos de infecção, os microscópios de luz (ML), microscópios laser confocal (MLC) e os microscópios eletrônicos de varredura (MEV) e transmissão (MET) têm proporcionado relevantes contribuições (ALVES; LEITE; KITAJIMA, 2008). Como exemplo, Bonde, Melching e Bromfiel (1976) e Koch, Ebrahin-Nesbat e Hoppe (1983) utilizaram ML, MEV e MET, para estudar o desenvolvimento de *P. pachyrhizi* em folhas de cultivares de soja suscetíveis e descreveram os vários eventos que ocorrem nesta interação. Posteriormente, Adendorff e Rijkenberg (2000) aplicaram a MEV no estudo do processo de infecção de outra espécie de *Phakopsora*, *P. apoda*, mostrando que o processo é bem semelhante aos de *P. pachyrhizi*. Teixeira et al. (2013) utilizaram a MEV para estudar os eventos iniciais de infecção de *Stenocarpella maydis* em folhas de milho, desde a germinação dos conídios, a formação de apressório e a penetração.

## **2.10 Biologia molecular aplicada aos estudos de patogenicidade e virulência**

O patossistema *M. oryzae*-arroz tem sido mostrado como um excelente modelo para o estudo da interação planta-patógeno (EBBOLE, 2007; TALBOT, 2003), devido ao sequenciamento do genoma, tanto do fungo como da planta (DEAN et al., 2005; YU et al., 2002) e do estudo do genoma funcional com a

identificação de vários genes relacionados à patogênese (JEONG; MITCHELL; DEAN, 2007).

Dentre os diversos mecanismos utilizados para estudar os processos de infecção dos patógenos em plantas, o silenciamento gênico tem sido uma importante ferramenta (FUGIER et al., 2011; PAN et al., 2012; SMACZYNSKA-DE-ROOIJ et al., 2012). Existem diferentes formas de anular o efeito de genes, dentre as quais a deleção de genes-alvo e a posterior avaliação fenotípica do comportamento dos mutantes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, têm apresentado inestimáveis contribuições para o entendimento da atuação de diversos genes relacionados à patogenicidade, inclusive em *M. Oryzae* (JEONG; MITCHELL; DEAN, 2007; LU et al., 2008; LV et al., 2013; SKAMNIOTI; GURR, 2007), com isso aumentando a possibilidade de se traçarem diferentes rotas capazes de explicar a forma e o local de atuação das proteínas resultantes desses genes.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os estudos relacionados ao patossistema *M. oryzae* x trigo apresentaram importantes descobertas. A transmissibilidade deste via sementes está intimamente relacionada com a quantidade de inóculo inicial, assim como os efeitos causados no desempenho das sementes quando plantadas.

O gene *Bin1* de *M. oryzae* pode desempenhar importante papel no processo infectivo deste patógeno, servindo como base, juntamente com outros genes, para o aprofundamento dos estudos, no intuito de desenhar uma rota metabólica capaz de explicar, de forma mais consistente, os caminhos utilizados pelo patógeno para infectar suas plantas hospedeiras.

## REFERÊNCIAS

ADACHI, K.; HAMER, J. E. Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 8, p. 1361-1374, Aug. 1998.

ADENDORFF, R.; RYKENBERG, F. H. J. Direct penetration from uredospores of *Phakopsora apoda*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 3, p. 317-324, 2000.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5<sup>th</sup>ed. Burlington: Elsevier Academic, 2005. 952 p.

ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.433-466.

ALVES, K.J.P.; FERNANDES, J.M.C. Influência da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulação de *Magnaporthe grisea* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 579-584, 2006.

ANGRA, D. C. **Transferência da resistência à ferrugem da folha através de cruzamentos intergenéricos entre *Triticum aestivum* e *Agropyron elongatum***. 1995. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1995.

ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

BONDE, M.R.; MELCHING, J.S.; BROMFIEL, K.R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 290-294, 1976.

BRAMMER, S. P. et al. Bases genéticas da resistência durável à ferrugem da folha do trigo e estratégias biotecnológicas para o melhoramento no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 5-20, 2000.

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.

CABRERA, M. G.; GUTIÉRREZ, S. A. Primer registro de *Pyricularia grisea* en cultivos de trigo del noreste de Argentina. In: JORNADA DE ACTUALIZACIÓN EN ENFERMEDADES DE TRIGO, 1., 2007, Buenos Aires. **Resúmenes...** Buenos Aires: Lavallol, 2007.1 CD-ROM.

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 1147-1153, May 2006.

CLERGEOT, P. H. et al. PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, Washington, v. 98, n. 12, p. 6963-6968, June 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamento de safras: grãos**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_02\\_11\\_15\\_22\\_20\\_boletim\\_graos\\_fevereiro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_11_15_22_20_boletim_graos_fevereiro_2014.pdf)>. Acesso em: 7 mar. 2014.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculation of bean seeds with *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* through restriction water technique. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.

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

COUTINHO, W. M. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

DEAN, R. A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, London, v. 434, n. 7036, p. 980-986, Apr. 2005.

DEZWAAN, T. M. et al. *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 10, p. 2013-2030, Oct. 1999.

DÍAZ, O. et al. (Ed.). **Guía de recomendaciones técnicas del cultivo de trigo**. Santa Cruz de la Sierra: ANAPO, 2004. 73 p.

EBBOLE, D. J. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 437-456, Jan. 2007.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistemas de produção: cultivo do trigo: doenças e métodos de controle**. Brasília: 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Trigo/CultivoDeTrigo/doencas.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

FAIAD, M. G. R. et al. Evaluation of fungi in seed germplasm before long term storage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 24, n. 3, p. 505-511, 1996.

FUGIER, C. et al. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. **Nature Medicine**, New York, v. 17, n. 6, p. 720-725, June 2011.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A. Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 167-173, 1993.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A. Perdas no rendimento de grãos de trigo causadas por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 26, n. 2, p. 279-282, 2000.

GREER, C. A.; WEBSTER, R. K. Occurrence, distribution, epidemiology, cultivar reaction, and management of rice blast disease in California. **Plant Disease**, Quebec, v. 85, n. 10, p. 1096-1102, Oct. 2001.

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

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

IGARASHI, S. Uma análise da ocorrência de “brusone” do trigo no Paraná. In: SEMINÁRIO SOBRE MELHORAMENTO PARA A RESISTÊNCIA A ENFERMIDADES, 1., 1988, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA, 1988. p. 1-19.

IGARASHI, S. et al. *Pyricularia* em trigo: ocorrência de *Pyricularia* sp. no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, n.2, p.351-352,1986.

JAUHAR, P. P. Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: DAMANIA, A. B. (Ed.). **Biodiversity and wheat improvement**. Chichester: J. Wiley, 1993. p. 103-119.

JEONG, J. S.; MITCHELL, T. K.; DEAN, R. A. The *Magnaporthe grisea* *snodprot1* homolog, MSP1, is required for virulence. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 273, n. 2, p. 157-165, Aug. 2007.



KATO, H. Biological and genetics aspects in the perfect state of rice blast fungus *Pyricularia oryzae* and its allies: mutation breeding for disease resistance. **Gamma Field Symposia**, Washington, v. 17, p. 1-22, 1978.

KOCH, E.; EBRAHIN-NESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*Syd.) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 106, p. 302-320, 1983.

KONSTANTINOVA, P. et al. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assay. **Mycological Research**, Praha, v. 106, n. 1, p. 23-33, Jan. 2002.

KULIK, T. et al. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. **FEMS Microbiological Letter**, Amsterdam, v. 239, n. 1, p. 181-186, Oct. 2004.

LAU, D. et al. Doenças do trigo. In: PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA G. R. (Ed.). **Trigo no Brasil: bases para produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2011. p. 283-324.

LEE, F. N.; SCOTT, H. A.; XIA, J. Q. **Serological detection and identification of rice blast**. Fayetteville: University of Arkansas. US n. 5789183, 4 Aug. 1998.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. Quantification of seedborne infection by *Rhynchosporium secalis* in barley using competitive PCR. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 51, n. 2, p. 217-224, Apr. 2002.

LEITE, B. et al. Mecanismos de adesão de bactérias e fungo às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 119-157, 2001.

LIMA, M. I. P. M. **Giberela ou brusone: orientações para identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo -

CNTP, 2004. (Documentos, 40). Disponível em:  
<[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do40.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

LU, Q. et al. Magnaporthe oryzae MTP1 gene encodes a type III transmembrane protein involved in conidiation and conidial germination. **Journal of Zhejiang University. Science B**, Hangzhou, v. 9, n. 7, p. 511-519, July 2008.

LUPTON, F. G. H. History of wheat breeding. In: \_\_\_\_\_. **Wheat breeding**. London: Chapman and Hall, 1987. p. 51-70.

LV, Q. et al. Functional analysis of Pid3-A4, an ortholog of rice blast resistance gene Pid3 revealed by allele mining in common wild rice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 6, p. 594-599, June 2013.

MACHADO, A. Q. et al. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 408-414, 2007.

MACHADO, J. da C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001a.

MACHADO, J. da C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.

MACHADO, J. da C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001b.

MACIEL, J. L. N. et al. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 1, p. 95-107, July 2014.

MACIEL, J. L. N. et al. **Reação à brusone de genótipos de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo no estágio de planta adulta**. Passo Fundo: EMBRAPA, 2008. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p\\_bp64\\_1.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp64_1.htm)>. Acesso em: 10 jan. 2014.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. et al. Cytogenetics and immature culture embryo at Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1051-1062, 2000.

MURRAY, T. D. Disease caused by fungi and fungus-like organisms. In: BOCKUS, W. W. et al. (Ed.). **Compendium of wheat diseases and pests**. 3<sup>rd</sup> ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2010. p. 15-16.

NEERGAARD, P.; LAMBAT, A. K.; MATHUR, S. B. Seed health testing of rice III: testing procedure for detection of *Pyricularia oryzae* Cav. **Proceedings International Seed Testing Association**, Vollebakk, v. 35, p. 165-168, 1970.

NUNES, C. D. M. et al. Ocorrência de brusone no azevém em diferentes locais do RS, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 231, 2002. Resumo. Suplemento.

PAGANI, A. P. da S. **Resistência do trigo à brusone, manejo químico e diversidade de Magnaporthe grisea**. 2011. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

PAN, K. et al. Characterization of bridging integrator 1 (BIN1) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma. **Molecular Medicine**, Cambridge, v. 18, p. 507-518, Jan. 2012.

PANDE, S. et al. Seedborne infection of *Eleusine coracana* by *Bipolaris nodulosa* and *Pyricularia grisea* in Uganda and Kenya. **Plant Disease**, Quebec, v. 78, n. 1, p. 60-63, Jan. 1994.

PARK, G. et al. Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 53, n. 6, p. 1695-1707, Sept. 2004.

PARK, G. et al. MST12 regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 15, n. 3, p. 183-192, Mar. 2002.

PARK, G. et al. Multiple upstream signals converge on the adaptor protein Mst50 in *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 10, p. 2822-2835, Oct. 2006.

PATNAIK, D.; KHURANA, P. Wheat biotechnology: a minireview. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 4, n. 1, p. 1-29, Feb. 2001.

PERELLÓ, A. et al. Enfermidades de *Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*. In: NOME, S. F. et al. (Ed.). **Atlas fitopatológico Argentino**. Córdoba: INTA, 2011. v. 4, p. 1851-8974.

PRABHU, A. S. et al. Fontes de resistência vertical a *Pyricularia oryzae* em arroz. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 8, n. 1, p. 78-90, 1982.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. **Brusone em arroz**: controle genético, progresso e perspectivas. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2006. 387p.

PUCHIO, A. F.; MUCHOVEJ, J. J. O gênero *Pyricularia* e seus teleomorfos. **RAAP - Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 175-208, 1994.

REIS, E. M.; BLUM, M. C.; FORCELINI, C. A. Sobrevivência de *Pyricularia oryzae*, associada as sementes de trigo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 1, p. 43-44, jan./mar. 1995.

RIBOT, C. et al. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 1, p. 114-124, Jan. 2008.

SKAMNIOTI, P.; GURR, S. J. Magnaporthe grisea cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 8, p. 2674-2689, Aug. 2007.

SMACZYNSKA-DE-ROOIJ, I. I. et al. Yeast dynamin Vps1 and amphiphysin Rvs167 function together during endocytosis. **Traffic**, Copenhagen, v. 13, n. 2, p. 317-328, Feb. 2012.

SWEIGARD, J. A. et al. Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1221-1233, Aug. 1995.

TALBOT, N. J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of Magnaporthe grisea. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 177-202, Jan. 2003.

TEIXEIRA, G. A. et al. Essential oils on the control of stem and ear rot in maize. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 11, p. 1945-1951, nov. 2013.

TOLEDO, J.; ESCOBAR, R. **Piricularia o bruzone del trigo**. Santa Cruz: CIAT, 2002. 20p.

TORRES, G. A. M. et al. **Doenças da espiga causam perda de rendimento em trigo nos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, em 2009**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2009. 10 p. (Comunicado Técnico, 255).

TRINDADE, M. G. et al. **Danos causados por Magnaporthe grisea em trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2006. 9 p. (Comunicado Técnico, 202).

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Foreign agricultural service**: world agricultural production: office of global analyses. 2013. (Circular Series WAP). Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

URASHIMA, A. S. Blast. In: BOCKUS, W. W. et al. (Ed.). **Compendium of wheat diseases and pests**. 3<sup>rd</sup> ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2010. p. 238-245.

URASHIMA, A. S. et al. Effect of *Magnaporthe grisea* on seed germination, yield and quality of wheat. In: WANG, G. L.; VALENT, B. (Ed.). **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. Berlin: Springer, 2009. p. 267-277.

URASHIMA, A. S.; KATO, H. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, n. 2, p. 107-112, 1994.

VANDEMARK, G. J. et al. A PCR-based assay by sequence characterised DNA markers for the identification and detection of *Aphanomyces euteiches*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 10, p. 1137-1144, Oct. 2000.

WARD, E.; TAHIRI-ALAOUI, A.; ANTONIW, J. E. **Application of PCR in mycology**. London: CAB International, 1998. 376 p.

XU, J. R. MAP kinases in fungal pathogens. **Fungal Genetic Biology**, New York, v. 31, n. 3, p. 137-152, Dec. 2000.

XU, J. R.; STAIGER, C. J.; HAMER, J. E. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. **Proceedings of National Academy Science of the USA**, Washington, v. 95, n. 21, p. 12713-12718, Oct. 1998.

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

ZHAO, X. H. et al. A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 4, p. 1317-1329, Apr. 2005.

ZHENG, W. et al. A Rho3 homolog is essential for appressorium development and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. **Eukaryotic Cell**, Lawrence, v. 6, n. 12, p. 2240-2250, Dec. 2007.

## CAPÍTULO 2

Transmissibilidade de *Magnaporthe oryzae* por sementes de trigo e os efeitos dos potenciais de inóculo no desenvolvimento das plântulas

### RESUMO

A brusone, causada por *Magnaporthe oryzae*, é disseminada, principalmente, por sementes. No entanto, os efeitos de diferentes níveis de inoculação de *M. oryzae* nas sementes ainda são limitados. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar os efeitos dos potenciais de inóculo de *M. oryzae* no desenvolvimento inicial das plantas de trigo. Foram realizados o teste de germinação e de incidência (*blottertest*) e o teste de vigor. Para a visualização do interior das sementes, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura. Em ambas as cultivares, a germinação das sementes diminuiu com o aumento do tempo de exposição das sementes ao inóculo, enquanto a incidência de *M. oryzae* nas sementes aumentou. O índice de velocidade de emergência (IVE), o estande inicial (EI), o estande final (EF) e a diferença de estande (EI-EF) não diferiram entre si, para ambas as temperaturas de 20 e 25 °C. Porém, a altura das plantas e o peso seco foram maiores na temperatura de 25 °C. Para a cultivar MGS Brilhante, as sementes não inoculadas, o IVE diminuiu com o aumento do tempo de exposição das sementes ao meio osmoticamente modificado. Para as sementes inoculadas, o IVE aumentou até próximo ao tempo de 48 horas de exposição, a partir do qual começou a diminuir. EI e EF diminuíram com o aumento do tempo de exposição das sementes ao meio, inclusive na presença do fungo. No entanto, esta queda foi mais acentuada quando na presença apenas do meio osmoticamente modificado. EI e EF, a partir de 72 horas de exposição, foram maiores nas sementes inoculadas que nas não inoculadas com o fungo. A diferença nos estandes aumentou com a maior exposição das sementes, sendo mais acentuado para as sementes apenas em contato com o meio, sem a presença do fungo. Tanto a altura de plantas quanto o peso seco diminuíram com o aumento do tempo de exposição das sementes, mesmo na ausência do fungo. Ao contrário, a cultivar BRS 264 apresentou menor germinação, IVE, EI, EF e EF-EI e maior incidência nos tratamentos com sementes inoculadas, quando comparada com as não inoculadas. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que houve deformações nos tecidos das sementes de ambas as cultivares submetidas aos diferentes potenciais de inoculação, à medida que se aumentou o tempo de exposição, sendo esse efeito mais expressivo na BRS 264. Em tecidos foliares, observou-se maior padrão de colonização na cultivar BRS 264, não tendo sido observada diferença entre os isolados. Portanto, conclui-se que *M. oryzae* interfere negativamente no



desempenho das sementes de trigo e que a presença do restritor hídrico contribuiu para a queda do desempenho das mesmas.

#### ABSTRACT

The wheat blast, caused by *Magnaportheorizae*, is spread primarily by seeds. However, the effects of different inoculation levels of *M. oryzae* are still limited. This study investigated the effects of inoculum potential of *M. oryzae* in the early development of wheat plants. The germination test and incidence (blotter test) and vigor tests were performed. Viewing the inside of the seeds used the scanning electron microscope. In both cultivars, the germination decreased with increasing exposure time of the seeds to inoculum while the incidence of *M. oryzae* increased. The emergence rate index (ERI), initial stand (IS), final stand (FS) and difference (IS-FS) did not differ for both temperatures of 20 and 25°C. However, plant height and dry weight were higher at 25°C. For MGS Brillhantecultivar, the non-inoculated seeds, the ERI decreased with increasing time of exposure of seeds to osmotically modified medium, and for the inoculated seeds, the IVE increased until near the time of 48h exposure, from which has began to decline. The IS and FS decreased with increasing the time of exposure of the seeds to the medium, even in the presence of the fungus. However, this decrease was more pronounced only in the presence of osmotically modified medium. The IS and FS, from 72h of exposure were higher in inoculated seeds than in non-inoculated with the fungus. The difference in the stands increased with increased exposure time of seeds, more pronounced for seeds only in contact with the medium, without the presence of the fungus. Both plant height and the dry weight decreased with increasing time of exposition, even in the absence of the fungus. In contrast, BRS 264 showed lower germination, ERI, IS, FS and IS-FS and higher incidence in treatments with inoculated seeds compared with non- inoculated. Scanning electron microscopy showed that there were strains in the tissues of seeds of both cultivars subjected to different potentials of inoculation, as was increased exposure time, and this effect was larger in BRS 264. Tissues in leaf, we observed a higher colonization pattern on BRS 264, with no differences among the isolates. Therefore, it has been concluded that *M. oryzae* has impacted negatively on the performance of wheat seeds and the presence of water restrictor contributed to the decreasing in performance of the them.

## 1 INTRODUÇÃO

O trigo é uma cultura que apresenta grande potencial para integração nos sistemas produtivos da região do cerrado brasileiro. Entretanto, é uma planta exótica e, por isso, sensível a inúmeros estresses bióticos e abióticos nesta região produtora. Dentre os fatores que limitam seu cultivo no cerrado está a ocorrência de doenças fúngicas. Dentre as principais, destaca-se a brusone, que é causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr. [anamorph *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.] e tem causado grandes perdas nas lavouras de trigo, nos últimos anos. Em 2004, no estado de Minas Gerais, foram registrados danos de até 60% na ausência de medidas de controle. No ano de 2005, danos de até 40% na produção foram registrados em algumas lavouras do centro-oeste do país.

As perdas causadas pela brusone em algumas lavouras, na safra 2008/09, variaram de 35% a quase 100%. Enquanto na safra anterior atingiu-se uma produtividade de 96 sacas/ha, nesta safra, as médias variaram em torno de 55% a 70 sacas/ha, devido a danos causados pela doença e pelo excesso de chuva na colheita, afetando, principalmente, o peso específico dos grãos.

Os danos em rendimento de grãos ocasionados por doenças estão entre os fatores que mais têm contribuído para a limitação de rendimento da triticultura brasileira. Informações sobre a brusone do trigo são escassas e constituem uma necessidade primordial para o desenvolvimento de métodos integrados de controle da doença (TRINDADE et al., 2006).

O entendimento da interação semente e *M. grisea* representa a possibilidade do aperfeiçoamento das técnicas de manejo desta doença, principalmente no que tange ao tratamento de sementes, considerada uma das táticas de controle mais adotadas. Aliado a isso, tem sido cada vez mais importante procurar entender os efeitos dos potenciais de inóculo deste patógeno

nas sementes, bem como elucidar os mecanismos de transmissão de *M. oryzae* pelas sementes.

Para se visualizar essa interação, que vão desde a fase de pré-penetração até colonização de patógenos nos tecidos das plantas, os microscópios de luz (ML), os microscópios laser confocal (MLC) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições. Em alguns trabalhos mostra-se essa interação entre patógeno e tecidos de plantas (BONDE; MELCHING; BROMFIEL, 1976; BRUNELLI et al., 2005; KOCH; EBRAHINESBAT; HOPPE, 1983; MEDICE et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2013), no entanto, o conhecimento da relação entre *M. grisea* e sementes de trigo ainda é limitado. Com isso, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar os efeitos dos potenciais de inóculo de *M. oryzae* no desempenho inicial das plantas de trigo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) e de Patologia de Sementes, e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **2.1 Organismos e condições de crescimento**

Os isolados utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 1. Os isolados foram crescidos em meio completo (0,6% de extrato de levedura, 0,6% de caseína, 1% de glicose e 0,7% de ágar). A manipulação e o armazenamento das culturas e a produção de conídios foram feitos em placas contendo o meio aveia-ágar, conforme descrito por Valent, Farrall e Chumley (1991).

**Tabela 1** Isolados de *M. oryzae*

Código	Origem	Hospedeiro
6001	Embrapa Trigo – RS	Trigo
5031	Embrapa Trigo – RS	Trigo
472	Embrapa Trigo – RS	Trigo

Inicialmente, plantas de trigo da cultivar suscetível BRS 264, com 18 dias, foram inoculadas com os isolados 6001, 472 e 5031, com uma suspensão de conídios de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de culturas crescidas por 10 dias em aveia-ágar. A incidência da doença foi avaliada cinco dias após a inoculação. Os dois isolados mais virulentos foram selecionados para a realização dos experimentos.

## 2.2 Inoculação das sementes

Sementes das cultivares BRS 264, considerada suscetível, e MGS Brilhante, tida como moderadamente resistente, foram inoculadas com os isolados 6001 e 472, pela da técnica de condicionamento osmótico (MACHADO et al., 2004), com algumas modificações: ao meio completo (0,6% de extrato de levedura, 0,6% de caseína, 1% de glicose e 0,7% de ágar) foi adicionado manitol em quantidade suficiente para se obter o potencial osmótico de -1,2 MPa, calculado conforme o programa SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). Placas de Petri de 9 cm de diâmetro foram utilizadas para a inoculação, nas quais 15 mL do meio modificado osmoticamente foram adicionados e, posteriormente, transferido um disco de micélio da cultura, crescida por 10 dias, em meio completo. Decorridos mais 10 dias, quando a placa encontrava-se totalmente tomada pelo fungo, acrescentou-se, sobre a cultura fúngica, uma camada de sementes previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, por 2 minutos. As placas foram acondicionadas em estufa incubadora, a 25 °C, no

escuro. A cada 24 horas de incubação, foram retirados lotes de sementes correspondentes a cada potencial de inóculo e colocados para secar em papel germitest, à temperatura ambiente, por 24 horas. Da mesma forma, foi realizada a avaliação nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de exposição das sementes ao inóculo. Paralelamente, foram também incubadas sementes em placas de Petri contendo apenas o meio completo acrescido de manitol, na presença do fungo, para os mesmos potenciais e as duas cultivares. Após a secagem das sementes em papel germitest, cada tratamento foi armazenado individualmente em sacos de papel, à temperatura de 15 °C.

### **2.3 Transmissibilidade de *M. oryzae* de sementes de trigos para plântulas**

Para a avaliação da transmissão de *M. oryzae* das sementes artificialmente inoculadas para suas respectivas plântulas, foi montado um experimento em câmaras de crescimento, sob condições controladas. Para isso, foram utilizadas duas câmaras de crescimento, uma na temperatura de 20 °C e a outra, a 25 °C. Para cada temperatura, procedeu-se à mesma forma de cultivo e com os mesmos tratamentos. Foram utilizadas as cultivares MGS Brilhante e BRS 264, previamente inoculadas com os isolados 6001 e 472, tendo, para cada cultivar e isolado, as inoculações sido feitas nos potenciais de 24, 48, 72 e 96 horas de exposição das sementes ao inóculo. Estes mesmos tempos de exposição foram utilizados também para as duas cultivares, porém, apenas com o meio osmoticamente modificado, sem a presença do fungo.

Ambos os experimentos foram realizados de forma simultânea. Cada um correspondeu a um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $(2 \times 2 \times 4) + 1$ , sendo dois isolados, com e sem inoculação e quatro potenciais de inóculo, mais o controle, sem inoculação, totalizando quatro repetições para cada tratamento. A parcela experimental constituiu-se de 25 sementes,

acondicionadas em bandejas plásticas, contendo 50 orifícios de aproximadamente 100 mL cada, obtendo-se, portanto, duas parcelas por bandeja, aleatoriamente distribuídas. Foi utilizada como substrato a mistura de areia e substrato comercial na proporção de 2:1, previamente autoclavado a 121 °C, por 40 minutos. Três dias após o plantio, iniciou-se a contagem do número de plântulas emergidas para se obter o índice de velocidade de emergência (IVE), de acordo com a fórmula adaptada de Maguire (1962); o estande inicial, quando o número de plantas emergidas encontrava-se estável, aos 10 dias após a semeadura e, aos 28 dias, fez-se uma última contagem, obtendo-se, assim, o estande final.

Aos 28 dias após a inoculação, as plantas foram colhidas para medição da altura e do peso seco, e acondicionadas em sacos de papel correspondentes a cada parcela experimental. Os sacos foram levados para estufa de secagem, a 50 °C, por cinco dias, para, posteriormente, pesagem em balança de precisão.

#### **2.4 Detecção de *M. oryzae* em plântulas assintomáticas**

Durante a etapa de colheita, fragmentos da região do colo da planta e da inserção do primeiro par de folhas foram coletados, desinfestados e plaqueados em meio completo, para observação do crescimento de microrganismos. Os fungos com crescimento semelhante ao de *M. oryzae* foram repicados para o meio aveia-ágar, para a obtenção dos esporos e confirmação. Dentre as amostras nas quais não foi possível identificar a presença de *M. oryzae*, fez-se o congelamento destas em nitrogênio líquido, para posterior extração de DNA (Kit Primega®) e detecção por PCR, utilizando *primers* específicos previamente desenhados para *M. oryzae*.

## **2.5 Desempenho das sementes submetidas a diferentes potenciais de inóculo**

### **2.5.1 Germinação de sementes e incidência de *M. oryzae* em sementes de trigo inoculadas artificialmente sob diferentes tempos de exposição**

Após a inoculação das sementes, o material foi subdividido em nove amostras, de cada cultivar, cada amostra com duzentas sementes. Posteriormente, as sementes foram incubadas em substrato de papel (*blotter test*), por 8 dias e, em seguida, observadas sob microscópios estereoscópio e de luz, para a determinação da incidência de *M. oryzae*.

Foi realizado, em laboratório, o teste padrão de germinação (BRASIL, 2009), também para ambas as cultivares.

### **2.5.2 Coleta das amostras para microscopia eletrônica**

Sementes de cada tratamento descrito no item anterior foram coletadas para serem observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), colocadas em microtubos de 2 mL contendo fixador Karnovsky e, em seguida, armazenados em geladeira, a 4 °C, por um período mínimo de 24 horas.

#### **2.5.2.1 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Depois do material fixado em solução Karnovsky pH 7,2, as sementes foram transferidas para glicerol:água 30%, por 30 minutos. Após este tempo, as sementes de cada tratamento foram congeladas em N<sub>2</sub> líquido, seccionadas transversal e longitudinalmente, e transferidas para outro microtubo contendo água destilada. Posteriormente, adicionaram-se cinco gotas da solução de

tetróxido de ósmio 1,0%, para pós-fixação, por um período de 2 horas. Em seguida, todo material foi lavado em água destilada, por três vezes e desidratado em uma série de acetona (25%, 50%, 75% e 90%, uma vez cada e 100%, por três vezes). Após essa desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030, para substituição da acetona por CO<sub>2</sub> e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para observação em MEV LEO EVO 40. As imagens geradas foram registradas digitalmente, obtendo-se diversas imagens para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 7,5 mm. Estas foram gravadas e montadas em prancha, utilizando o software Corel Draw X5.

### **2.5.3 Eventos de pré-penetração, penetração e colonização de *M. oryzae* em folhas de trigo inoculadas artificialmente**

Folhas destacadas de trigo das cultivares MGS Brilhante e BRS 264, com 18 dias de idade, foram inoculadas com os isolados 472 e 6001. As inoculações foram feitas no interior de placas de Petri de 15 cm de diâmetro, com quatro fragmentos de folhas destacadas em cada placa. A suspensão de esporos foi ajustada para 10<sup>-6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>, acrescentada de Tween 20 a 1%, para emulsificação dos conídios. Foram aplicadas quatro gotas das respectivas suspensões em cada fragmento de folha. Os tratamentos constituíram-se de duas cultivares de trigo, dois isolados e nove tempos de coleta, formando um fatorial 2 x 2 x 9, totalizando 36 tratamentos com quatro repetições cada. Os tempos de coleta foram às 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas após a inoculação.



### **2.5.3.1 Preparo de amostras para a microscopia eletrônica de varredura**

Depois do material imerso em solução fixativa Karnovsky pH 7,2, por um período de no mínimo 24 horas, seis fragmentos de cada tratamento foram transferidos para solução de cacodilato de sódio 0,05M e lavados, por três vezes, por 10 minutos. As secções foram transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1,0% em água por 2 horas, lavadas em água destilada por três vezes e desidratadas em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez cada e 100%, por três vezes). Posteriormente, seguiu-se o protocolo conforme já descrito no item 2.5.2.1.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Transmissibilidade de *M. oryzae* por sementes**

A transmissão de *M. oryzae* pelas sementes de trigo foi avaliada sob diferentes condições de temperatura, potencial de inóculo (tempo de exposição das sementes ao inóculo) e cultivares.

Verificou-se que a cultivar MGS Brilhante, em ambas as temperaturas, não apresentou diferença quanto ao índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial (EI), estande final (EF) e para a diferença entre EI e EF (Figuras 1A, 2A, 2C e 2E).

Para as sementes não inoculadas, porém submetidas apenas ao restritor hídrico, na ausência do fungo, o IVE diminuiu com o aumento do tempo de exposição das sementes ao meio osmoticamente modificado. Isso indica que a utilização apenas do restritor hídrico foi suficiente para comprometer a qualidade das sementes de trigo. Para as sementes inoculadas submetidas ao

restritor hídrico, na presença do fungo, o IVE aumentou até próximo o tempo de 48 horas de exposição, a partir do qual começou a diminuir (Figura 1B).

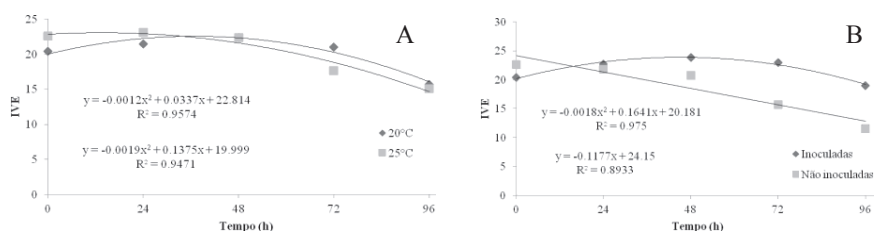


Figura 1 Índice de velocidade de emergência de plântulas de trigo ao longo dos tempos de exposição, da cultivar MGS Brilhante, em diferentes temperaturas (A), com e sem inoculação (B)

EI e EF diminuíram com o aumento do tempo de exposição das sementes ao meio, inclusive na presença do fungo. No entanto, esta queda foi mais acentuada quando na presença apenas do meio osmoticamente modificado. EI e EF, a partir de 72 horas de exposição, foram maiores nas sementes inoculadas que nas não inoculadas com o fungo. A diferença nos estandes aumentou com o aumento do tempo de exposição das sementes, sendo mais acentuado para as sementes apenas em contato com o meio, sem a presença do fungo (Figuras 2B, 2D e 2F).

Portanto, o fato de as sementes estarem diretamente em contato com o meio osmoticamente modificado (tratamentos na ausência da colônia fúngica) pode ter influenciado de forma que o desempenho destas sementes fosse inferior aos daquelas mantidas sobre a colônia fúngica (inoculadas).

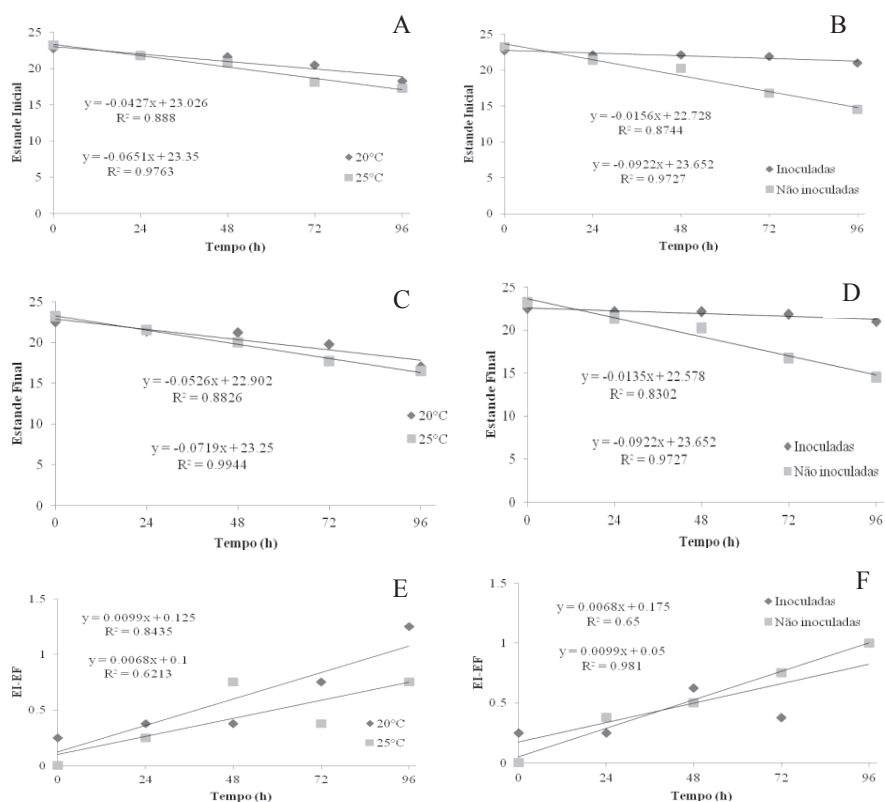


Figura 2 Estande inicial (EI) (A e B), estande final (EF) (C e D) e diferença de estandes (EI-EF) (E e F) de plantas de trigo MGS Brillhante, em diferentes temperaturas (A, C e E), com e sem inoculação (B, D e F), em diferentes tempos de exposição

A altura das plantas e o peso seco apresentaram maiores índices quando avaliados à temperatura de 25 °C. Além disso, essas duas variáveis diminuíram com o aumento do tempo de exposição das sementes, mesmo na ausência do fungo (Figuras 3A a 3D). Isso contribui para ratificar o fato de que a restrição

hídrica influenciou diretamente a qualidade das sementes de trigo, uma vez que as sementes submetidas apenas ao restritor hídrico, na ausência do fungo, mostraram comportamento semelhante ao daquelas na presença do fungo, para estas variáveis.

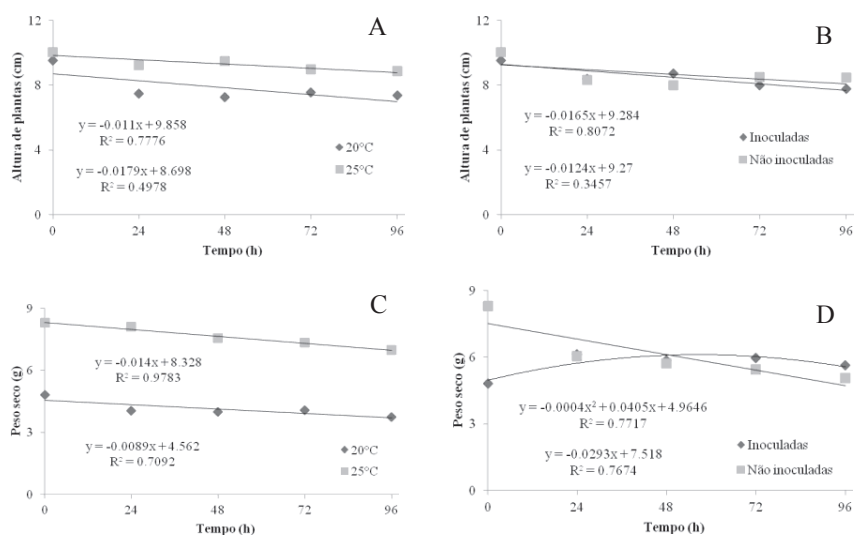


Figura 3 Altura (A e B) e peso seco da parte aérea (C e D) de plantas de trigo MGS Brilhante, em diferentes temperaturas (A e C), com e sem inoculação (B e D), em diferentes tempos de exposição

Por outro lado, para a cultivar BRS 264, tida como mais suscetível à brusone, foi possível confirmar sua maior sensibilidade à infecção por *M. oryzae* por meio das sementes, na maioria das variáveis analisadas. No entanto, assim como ocorreu com a MGS Brilhante, não houve influência da temperatura no desenvolvimento das plantas e na incidência do patógeno nas sementes (Figura 4A).

Observou-se, para a cultivar BRS 264, que o IVE diminuiu acentuadamente com o aumento do tempo de exposição das sementes, tanto na

presença quanto na ausência do fungo. Contudo, diferente da cultivar MGS Brilhante, as sementes inoculadas com o patógeno apresentaram uma queda no IVE estatisticamente maior que as não inoculadas, à medida que se aumentou o tempo de exposição (Figura 4B).

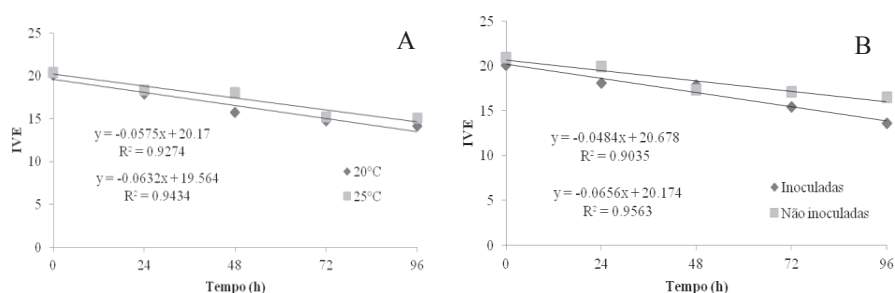


Figura 4 Índice de velocidade de emergência de plantas de trigo BRS 264, em diferentes temperaturas (A), com e sem inoculação (B), em diferentes tempos de exposição

A diminuição nos estandes com o aumento do tempo de exposição foi evidente tanto para sementes inoculadas quanto para as não inoculadas. Contudo, essa diminuição foi mais acentuada para as sementes inoculadas e o estande final apresentou maior diferença a partir do tempo zero até o tempo de 96 horas de exposição das sementes ao inóculo (Figuras 5B e 5D), enquanto a diferença de estande foi maior a partir do tempo de 48 horas de exposição das sementes ao inóculo (Figura 5F).

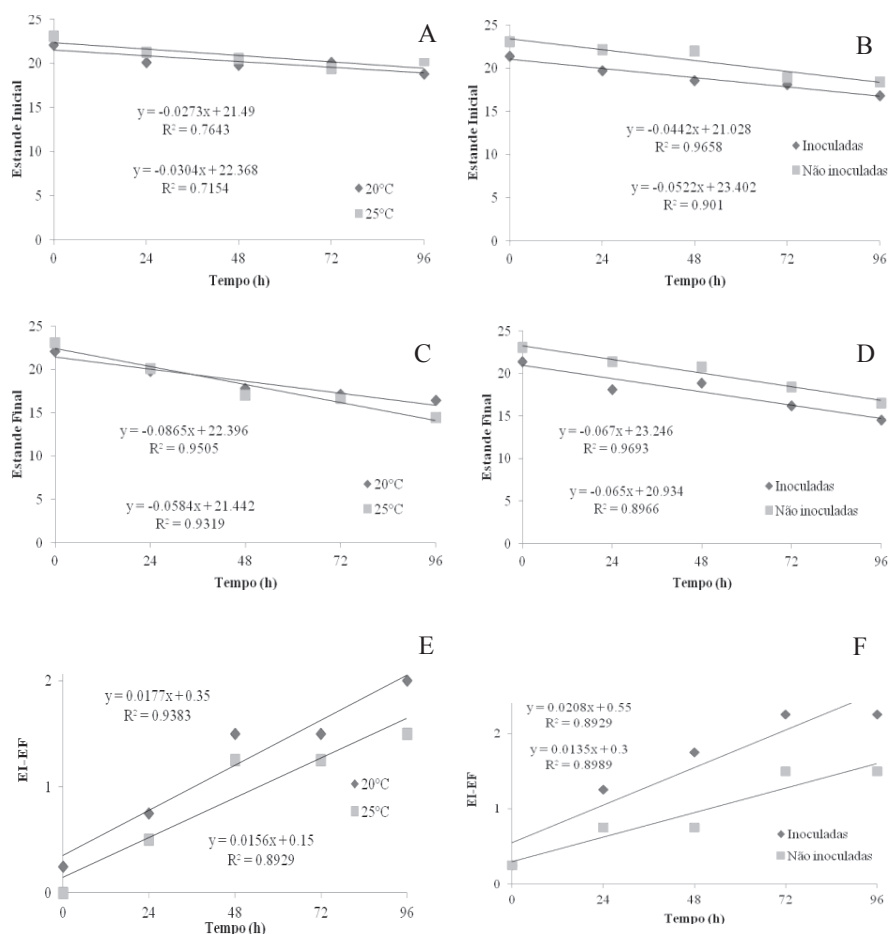


Figura 5 Estande inicial (EI) (A e B), estande final (EF) (C e D) e diferença de estandes (EI-EF) (E e F) de plantas de trigo BRS 264, em diferentes temperaturas (A, C e E), com e sem inoculação (B, D e F), em diferentes tempos de exposição

As variáveis altura de plantas e peso seco da parte aérea mostraram comportamento semelhante ao das variáveis IVE e estandes, diminuindo com o aumento de tempo de exposição das sementes ao inóculo. Essa diminuição, portanto, foi mais evidenciada nos tratamentos inoculados com o fungo (Figuras

6B e 6D). No entanto, apenas para o peso seco da parte aérea, houve diferença entre as temperaturas, sendo este maior que 25 °C (Figuras 6A e 6C).

Vários trabalhos mostraram diferenças no comportamento de cultivares de trigo, quando inoculadas com *M. oryzae* na variabilidade deste patógeno (CRUZ et al., 2010, 2012; KOHLI et al., 2011; MACIEL et al., 2008; MALAVOLTA; CARQUEIJO; MENDES, 2009). Cruz et al. (2012), avaliando o comportamento de cultivares norte-americanas, encontraram agrupamentos altamente suscetíveis, moderadamente suscetíveis, moderadamente resistentes e resistentes. No entanto, estes grupos modificavam-se de acordo com o isolado utilizado, fato que não foi observado em nosso estudo.

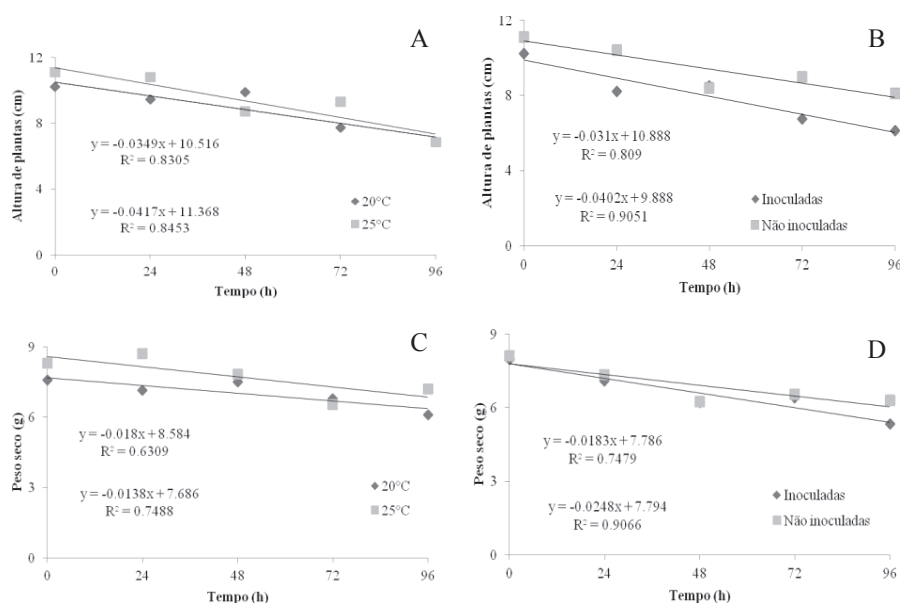


Figura 6 Altura (A e B) e peso seco da parte aérea (C e D) de plantas de trigo BRS 264, em diferentes temperaturas (A e C), com e sem inoculação (B e D), em diferentes tempos de exposição

Apesar das diferenças nas variáveis analisadas, não se observaram sintomas visuais de infecção de *M. oryzae* nas plântulas de trigo. Além disso, dentre os fragmentos plaqueados em meio de cultura, não foi detectada a presença de *M. oryzae* em nenhum dos tratamentos testados. Apesar de a transmissão de *M. oryzae* pelas sementes de trigo ter sido verificada (URASHIMA et al., 2004), não está claro qual seu papel na epidemiologia da doença, uma vez que não é frequente a identificação do patógeno em folhas ou colmos logo após o plantio. Isso sugere que *M. oryzae* é capaz de crescer endofiticamente em plantas de arroz (MARCEL et al., 2010), o que requer uma rota independente para a produção do conídio de infecção, porém, isso ainda não foi comprovado.

Apesar de não terem sido observadas plântulas de trigo com sintomas de brusone, Faivre-Rampant et al. (2012) verificaram que plântulas de arroz oriundas de sementes infestadas de variedades altamente suscetíveis frequentemente morrem e servem como inóculo para as plantas saudáveis vizinhas.

### **3.2 Detecção de *M. oryzae* em sementes de trigo inoculadas artificialmente**

Para a cultivar MGS Brilhante no tratamento controle, que não sofreu nenhum tipo de inoculação, não se detectou a presença de *M. oryzae*, assim como no tratamento com 24 horas de exposição. O fungo foi detectado nas sementes somente no tempo de 48 horas de exposição e, a partir deste, mais intensamente à medida que se aumentou o tempo de exposição das sementes ao inóculo (Figura 7). Não foi observada a presença do fungo no interior dos tecidos das sementes desta cultivar.



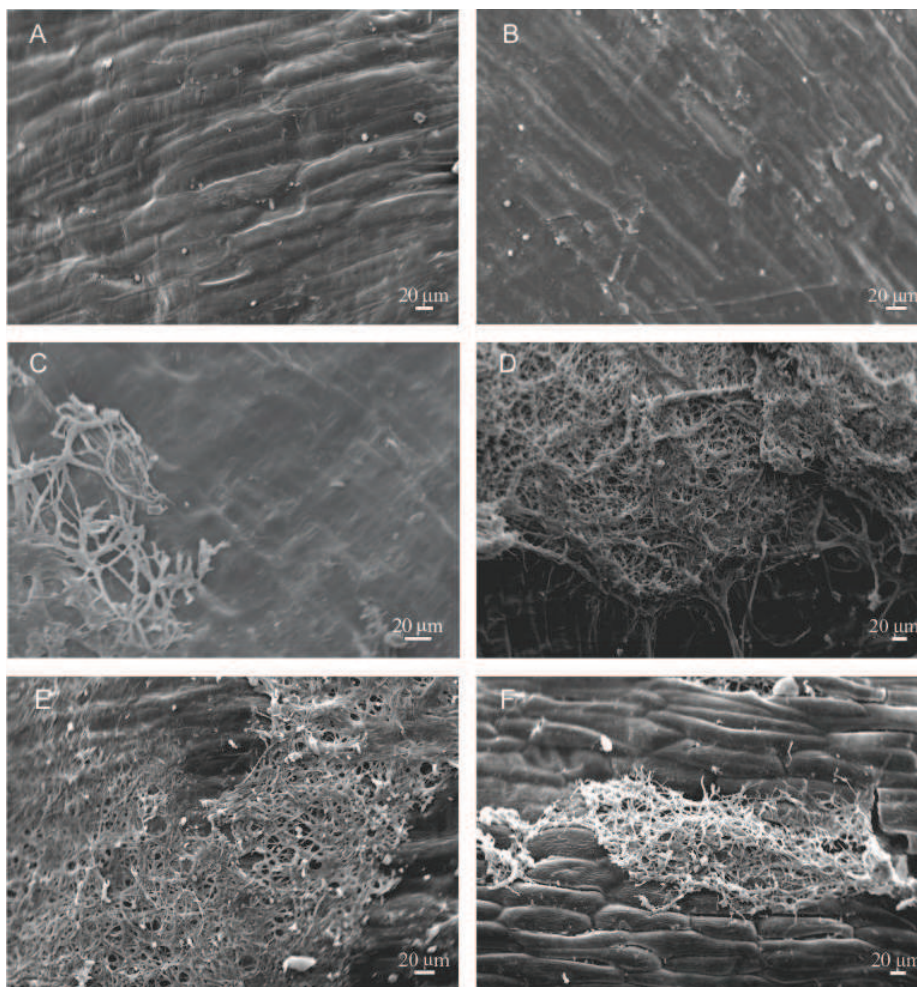


Figura 7 Eletromicrografia de varredura da superfície de sementes de trigo MGS Brilhante, inoculadas artificialmente com *M. oryzae*, em diferentes tempos de exposição. Controle (A), 24 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D) e 96 horas de exposição das sementes ao inóculo (E e F)

Para a cultivar BRS 264, observou-se também uma maior presença do fungo nas sementes. No tempo zero, controle, não se detectou a presença de *M.*

*oryzae*. No entanto, enquanto na MGS Brilhante observou-se a presença do fungo somente no tempo de 48 horas de exposição, na cultivar BRS 264, *M. oryzae* foi detectado já no tempo de 24 horas (Figura 8B), aumentando consideravelmente com o aumento do tempo de exposição (Figuras 8 C-E). Tais observações corroboram resultados obtidos das avaliações dos efeitos do tempo de exposição ao inóculo no desempenho das sementes de trigo.

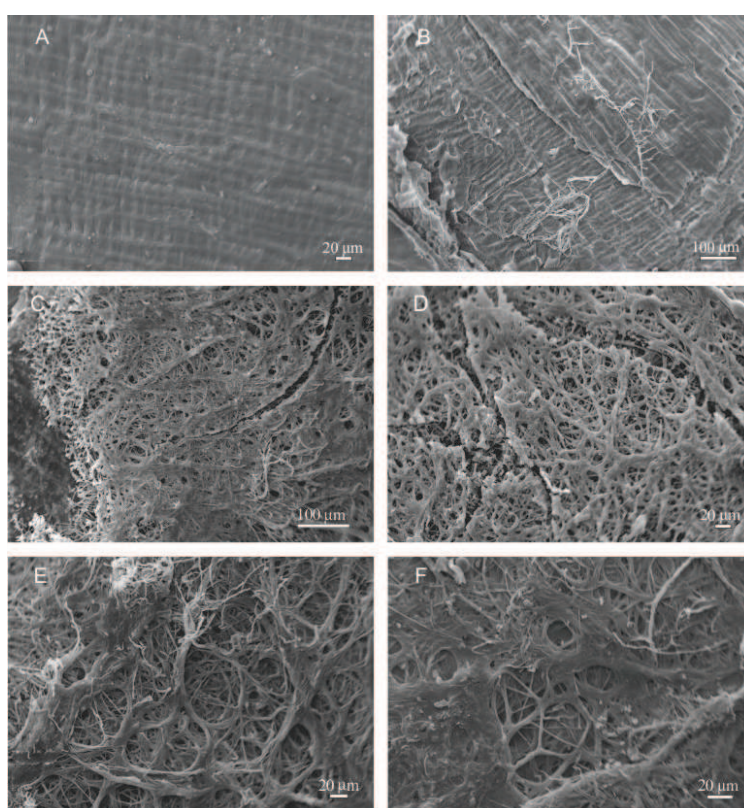


Figura 8 Eletromicrografia de varredura da superfície de sementes de trigo BRS 264, inoculadas artificialmente com *M. oryzae* sob diferentes potências. Controle (A), 24 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D) e 96 horas de exposição das sementes ao inóculo (E e F)

Ao contrário da cultivar MGS Brilhante, o patógeno foi encontrado também no interior das sementes de trigo da cultivar BRS 264, a partir do tempo de 48 horas de exposição das sementes ao inóculo (Figuras 9A, B, C e D). As maiores quantidades do micélio do fungo foram observadas somente no tempo de 96 horas após a inoculação (Figuras 9E e 9F), na cultivar BRS 264.

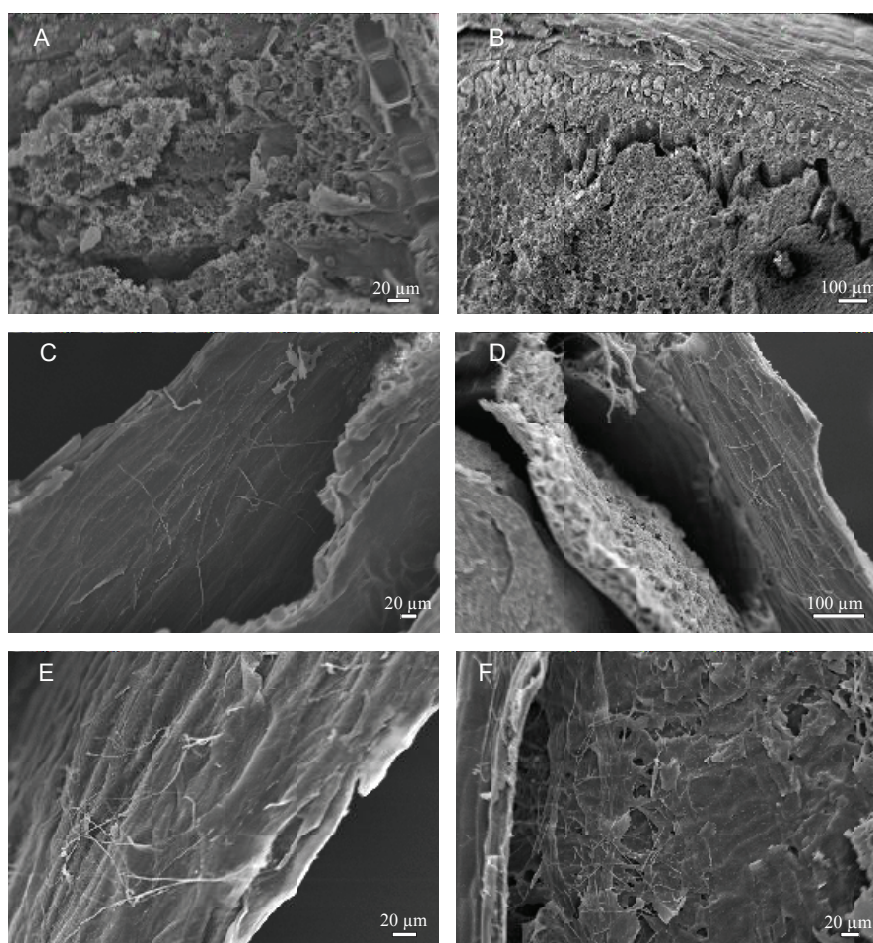


Figura 9 Eletromicrografia de varredura do interior de sementes de trigo BRS 264, inoculadas artificialmente com *M. oryzae* sob diferentes potencias. Controle (A), 24 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D) e

### 96 horas de exposição das sementes ao inóculo (E e F)

Portanto, verifica-se que, em cultivares mais suscetíveis, ocorre a infecção por *M. oryzae* em sementes de trigo. Entretanto, esse processo pode ser mais bem evidenciado com, no mínimo, 48 horas de exposição das sementes ao inóculo fúngico.

Estudos mostrando a infecção de *M. oryzae* em sementes de trigo ainda são escassos. No entanto, em sementes de arroz inoculadas com um isolado expressando a proteína verde fluorescente, observou-se que o fungo, primeiramente, está localizado no tegumento e que os esporos foram produzidos logo após estas sementes germinarem (FAIVRE-RAMPANT et al., 2012). Estes autores também reportaram que sementes infestadas foram obtidas após a inoculação de plantas de arroz no estágio de maturação, espigamento ou, mesmo, após a inoculação na folha bandeira, antes do espigamento.

Plântulas de sementes infestadas de variedades de arroz altamente suscetíveis frequentemente morrem e servem como inóculo para as plantas saudáveis vizinhas (FAIVRE-RAMPANT et al., 2012).

### **3.3 Germinação de sementes e incidência de *M. oryzae* em sementes de trigo inoculadas artificialmente sob diferentes tempos de exposição**

A germinação das sementes de trigo, em condições naturais, apresentou diferença significativa entre as cultivares testadas, com 89,5% na cultivar MGS Brilhante e 80,0% na BRS 264, nos tratamentos controle.

Em se tratando das sementes inoculadas com os isolados 6001 e 472, para ambas as cultivares, estas não apresentaram diferença entre si quanto à germinação, em nenhum dos tempos de exposição. Além disso, estes mesmos

isolados, em ambas as cultivares, comportaram-se de forma semelhante em relação à variável tempo de exposição, tendo sido observado que a germinação das sementes diminuiu, de forma linear, à medida que aumentou o tempo de exposição das mesmas ao inóculo, com ou sem a presença do fungo (Figuras 10A e B). Além disso, para a cultivar BRS 264, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos com e sem o fungo, a partir do tempo de 72 horas de exposição, o que não foi observado na cultivar MGS Brilhante (Figuras 10C e D).

Esses resultados corroboram os encontrados por Costa et al. (2003), que verificaram um decréscimo linear na germinação de sementes de feijão artificialmente inoculadas com *Fusarium oryzae* f. sp. *phaseoli*, sob diferentes tempos de exposição, pela técnica da restrição hídrica, utilizando também o manitol como restritor. Entretanto, Urashima et al. (2009), testando duas cultivares de trigo (BRS 208 e CD104), não observaram correlação entre a infecção nas sementes e a germinação, para nenhuma das cultivares.

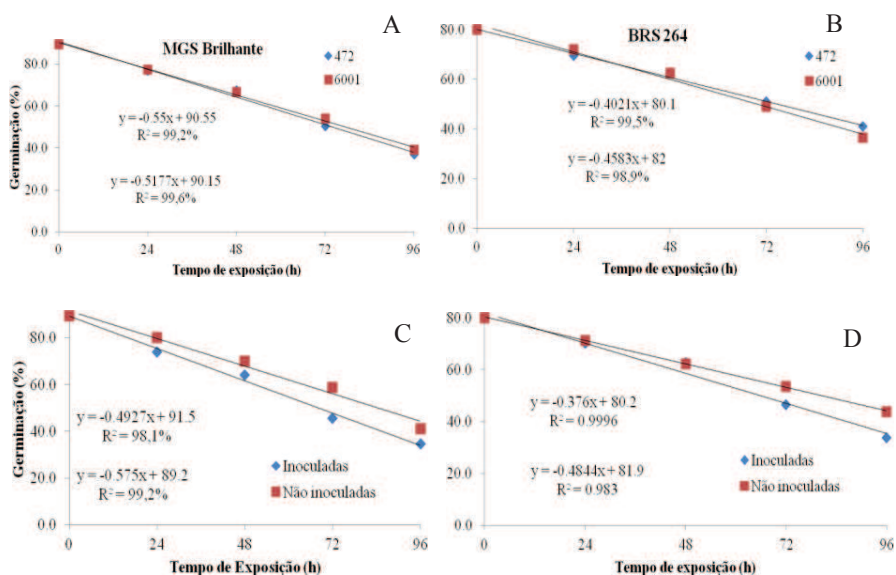


Figura 10 Germinação de sementes de trigo, cultivares MGS Brilhante (A e C) e BRS 264 (B e D), inoculadas com diferentes isolados (A e B) e não inoculadas (C e D), sob diferentes tempos de exposição

A incidência dos isolados de *M. oryzae* em sementes de trigo previamente inoculadas e incubadas em substrato de papel, apesar de não ter apresentado diferença significativa entre os isolados (dados não mostrados), comportou-se de forma distinta nas duas cultivares testadas (Figura 11). A cultivar BRS 264, considerada mais suscetível à brusone, apresentou incidência do patógeno variando de 15,3% a 36%, dependendo do tempo de exposição, ao passo que na cultivar MGS Brilhante, classificada como moderadamente resistente, a incidência variou de 3,5% a 28% (Figuras 11A e B). Além disso, para ambas as cultivares, observou-se que a incidência aumentou à medida que se aumentou o tempo de exposição das sementes ao inóculo. No entanto, para a cultivar BRS 264, houve uma tendência de estabilização a partir de 96 horas de exposição (Figuras 11A e 11B).

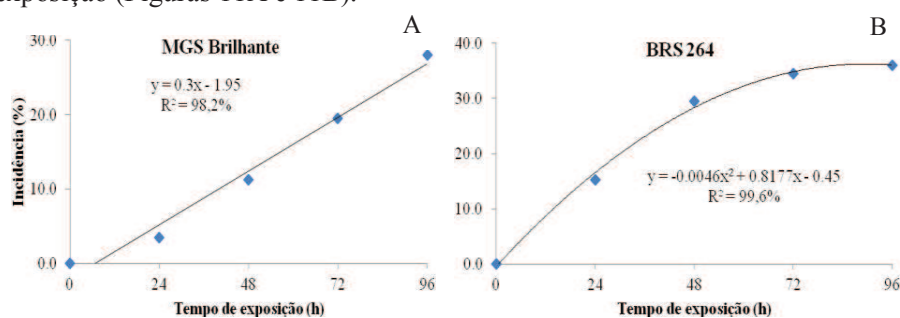


Figura 11 Incidência de *M. oryzae* em sementes de trigo, cultivares MGS Brilhante (A) e BRS 264 (B), em diferentes tempos de exposição

Cultivares que apresentaram resistência à brusone nas espigas também apresentaram menor incidência deste patógeno nas sementes (ARRUDA et al., 2005).

Em sementes de feijão inoculadas artificialmente com *Fusarium oryzae* f. sp. *phaseoli* pela técnica da restrição hídrica, utilizando-se manitol, foi observado que a incidência do patógeno aumentou de forma linear com o aumento do tempo de exposição (COSTA et al., 2003), concordando com os resultados aqui apresentados. Sementes de trigo apresentaram diferentes níveis de incidência de *P. oryzae*, sendo 76,2% na cultivar BRS 208 e 32% na cultivar CD104, em condições de campo, no estado de São Paulo (URASHIMA et al., 2009).

### **3.4 Influência da restrição hídrica em sementes de trigo e seus efeitos no desenvolvimento das plântulas**

Baseado nos efeitos negativos do restritor hídrico observados principalmente na cultivar MGS Brilhante, fez-se a observação, em microscopia eletrônica de varredura, das possíveis alterações nos tecidos das sementes de trigo.

Estas sementes submetidas a diferentes tempos de exposição ao meio osmoticamente modificado com manitol, no potencial de -1,2 MPa, na ausência do fungo, apresentaram queda significativa tanto no vigor quanto na germinação, conforme discutido anteriormente. Resultados semelhantes foram observados por Costa et al. (2004) em sementes de soja, que verificaram um decréscimo na germinação a partir do potencial hídrico de -0,52 MPa, até próximo de zero no potencial de -1,8 MPa. A restrição hídrica induzida por NaCl, KCl e monitol inibiu ou retardou a germinação de sementes de feijão, nos potenciais de -0,6 e -0,7 MPa, e de arroz, nos potenciais de -0,8 e -0,9 (COUTINHO et al., 2001).

Além disso, por microscopia eletrônica de varredura, foram observadas alterações morfológicas na conformação dos tecidos externos e internos das sementes.

Ambas as cultivares apresentaram deformação dos tecidos, principalmente nas camadas mais externas da semente. Enquanto a cultivar MGS Brilhante apresentou danos a partir do tempo de 24 horas de exposição (Figuras 12A-E), a cultivar BRS 264 começou a sofrer alguma deformação na membrana externa a partir do tempo de 48 horas de exposição (Figuras 13A-E). Observaram-se também, na cultivar MGS Brilhante, alterações no endosperma, ocorridas no tempo de 96 horas de exposição (Figura 12E), o que não foi verificado na cultivar BRS 264 (Figura 13). Diante disso, possivelmente, a cultivar MGS Brilhante apresenta maior sensibilidade ao restritor hídrico, o que contribui para explicar o fato de estas sementes terem apresentado menor desempenho, quando submetidas a estas condições.

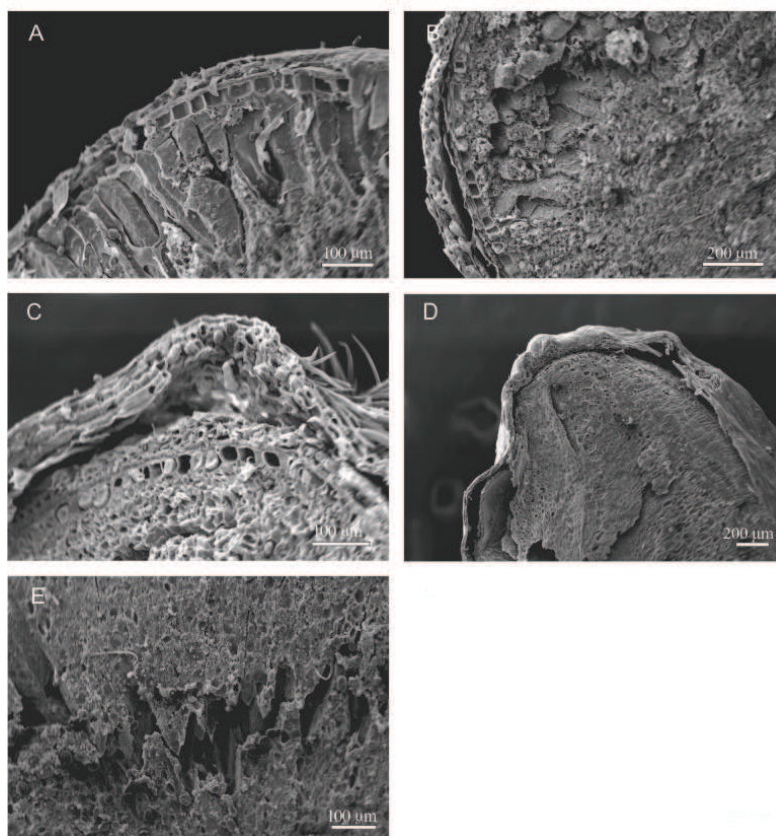




Figura 12 Eletromicrografia de varredura de sementes de trigo MGS Brilhante, inoculadas artificialmente com *M. oryzae* sob diferentes potencias. Controle (A), 24 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D) e 96 horas de exposição das sementes ao inóculo (E)

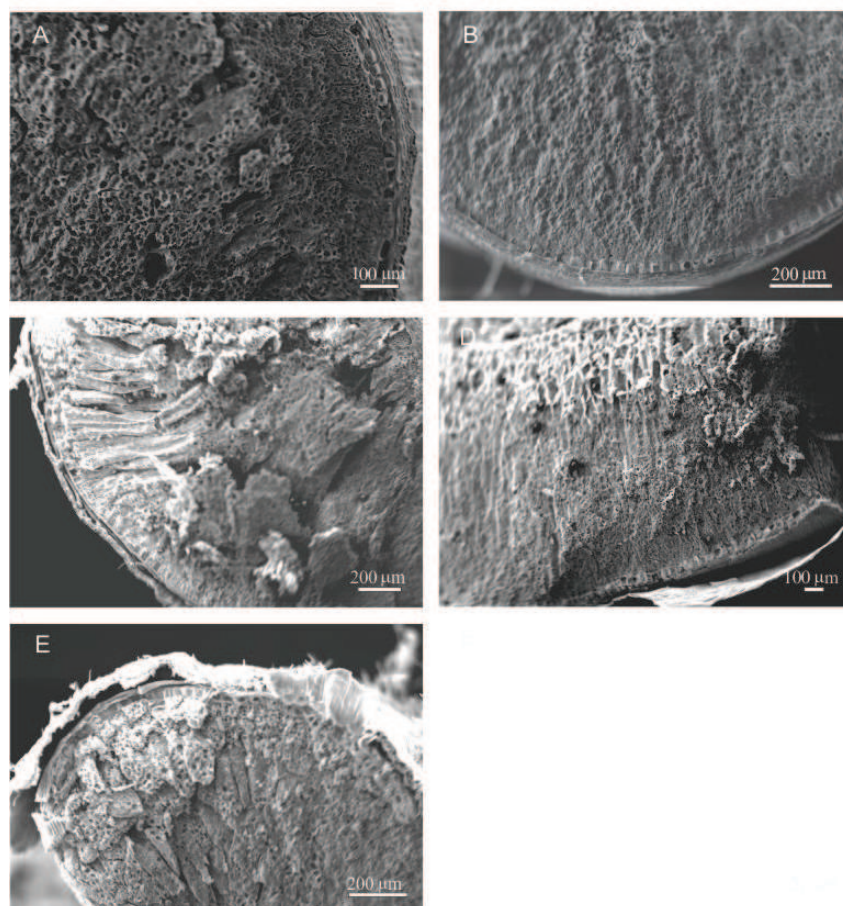


Figura 13 Eletromicrografia de varredura de sementes de trigo BRS 264, inoculadas artificialmente com *M. oryzae* sob diferentes potencias. Controle (A), 24 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D) e 96 horas de exposição das sementes ao inóculo (E)

### 3.5 Eventos de pré-penetração, penetração e colonização de *M. oryzae* em tecidos foliares de trigo

Os isolados 6001 e 472 comportaram-se de forma semelhante nos processos iniciais de infecção de folhas de trigo, para ambas as cultivares (Figuras 14 e 15). No entanto, para a cultivar BRS 264, observou-se maior colonização do fungo, desde o início da infecção (Figura 14).

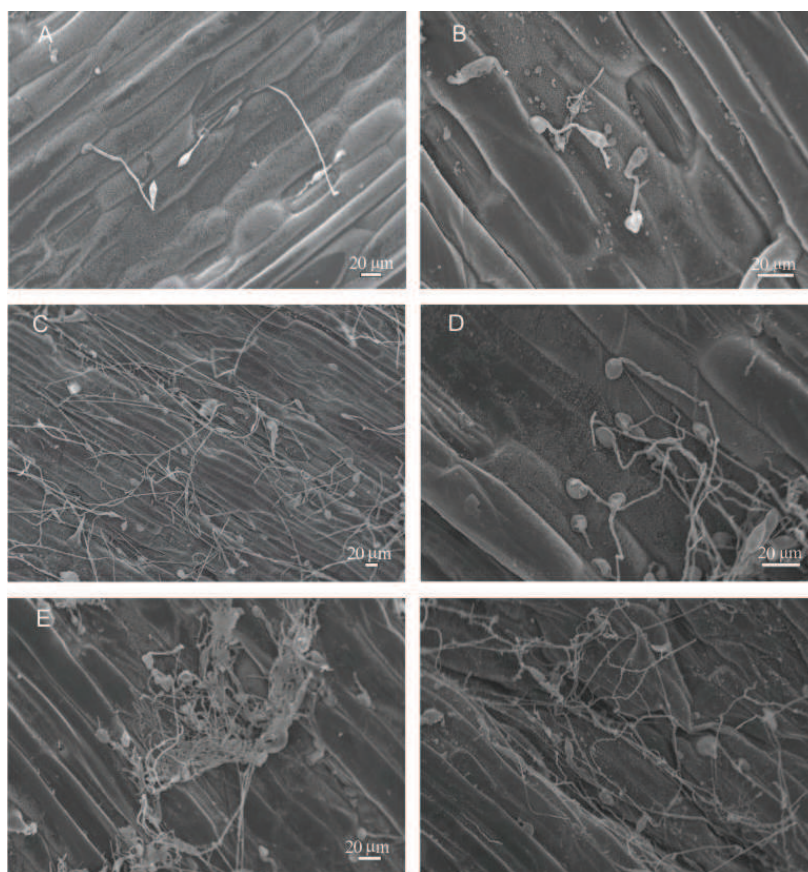


Figura 14 Eletromicrografia de varredura de folhas de trigo cultivar BRS 264, inoculadas com *M. oryzae*. Isolado 6001 (A, C e E), isolado 472 (B, D e F). 12 horas após a inoculação (h.a.i.) (A e B), 24 h.a.i. (C e D)

e 36 h.a.i. (E e F)

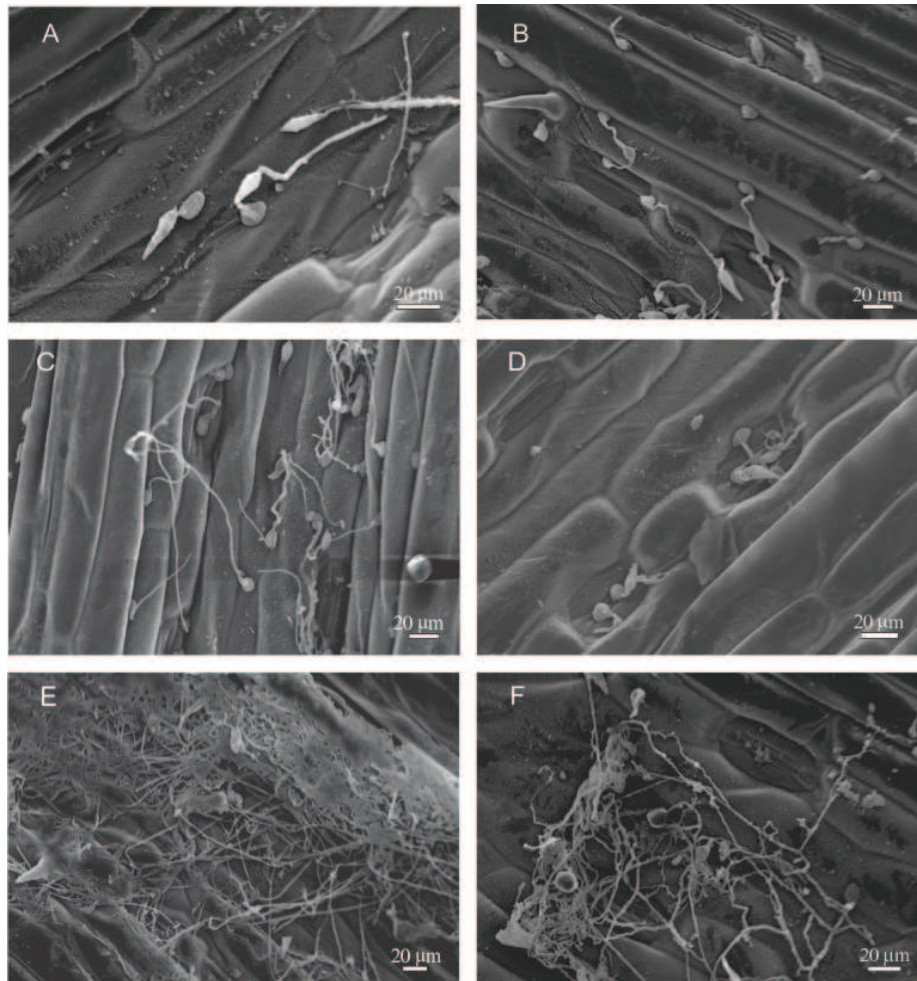


Figura 15 Eletromicrografia de varredura de folhas de trigo cultivar MGS Brilhante, inoculadas com *M. oryzae*. Isolado 6001 (A, C e E), isolado 472 (B, D e F). 12 horas após a inoculação (h.a.i.) (A e B), 24 h.a.i. (C e D) e 48 h.a.i. (E e F)

Esses dados suportam aqueles apresentados anteriormente, contribuindo para explicar a maior suscetibilidade da cultivar BRS 264 aos isolados testados. Características intrínsecas da cultivar MGS Brilhante, sejam elas bioquímicas ou estruturais, a condicionam como moderadamente resistente à infecção por *M. oryzae*. Com base nos resultados, pode-se inferir que o processo infectivo de *M. oryzae* em trigo está sendo limitado pela resistência genética da cultivar MGS Brilhante. Estudos moleculares e bioquímicos poderão, futuramente, contribuir para a descoberta dos genes, enzimas e proteínas participantes dos mecanismos de defesa das plantas de trigo contra este importante patógeno.

#### **4 CONCLUSÃO**

A inoculação de *M. oryzae* em sementes de trigo, na cultivar BRS 264, proporcionou redução no desempenho das mesmas.

As sementes de trigo inoculadas artificialmente com *M. oryzae*, pela técnica do condicionamento osmótico, apresentam efeitos decrescentes quanto à germinação e ao vigor, diminuindo seu desempenho.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, M. A. et al. Reação do trigo à magnaporthe grisea nos diferentes estádios de desenvolvimento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 121-126, 2005.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIEL, K. R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 290-1294, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento de Produção Vegetal. Divisão de Sementes e Mudanças. **Regras para análises de sementes (RAS)**. Brasília, 2009. 365 p.

BRUNELLI, K. R. et al. Germinação e penetração *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 187-190, mar./abr. 2005.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculation of bean seeds with *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli through restriction water technique. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.

COSTA, P. R. et al. Estresse hídrico induzido por manitol em sementes de soja de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 105-113, 2004.

COUTINHO, W. M. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

CRUZ, C. D. et al. Preliminary assessment of resistance among U.S. wheat cultivars to the triticum pathotype of *Magnaporthe oryzae*. **Plant Disease**, Quebec, v. 96, p. 1501-1505, Oct. 2012.

CRUZ, M. F. A. et al. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 24-31, 2010.

FAIVRE-RAMPANT, O. et al. Transmission of rice blast from seeds to adult plants in a non-systemic way. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 62, n. 4, p. 879-887, 2012.

KOCH, E.; EBRAHIN-NESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*Syd.) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 106, p. 302-320, 1983.

KOHLI, M. M. et al. Pyricularia Blast: a threat to wheat cultivation. **Czech Journal of Plant Breeding**, Praha, v. 47, p. 130-134, 2011. Special issue.

MACHADO, J. da C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.

MACIEL, J. L. N. et al. **Reação à brusone de genótipos de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo no estádio de planta adulta**. Passo Fundo: EMBRAPA, 2008. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p\\_bp64\\_1.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp64_1.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MALAVOLTA, V. M. A.; CARQUEIJO, A. D. P.; MENDES, L. Variabilidade patogênica do fungo *Pyricularia grisea* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 49-51, 2009.

MARCEL, S. et al. Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 9, p. 3177-3187, Sept. 2010.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd.& P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, jan./fev. 2007.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 126-130, 1995.

TEIXEIRA, G. A. et al. Essential oils on the control of stem and ear rot in maize. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 11, p. 1945-1951, nov. 2013.

TRINDADE, M. G. et al. **Danos causados por *Magnaporthe grisea* em trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2006. 9 p. (Comunicado Técnico, 202). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p\\_co202.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co202.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

URASHIMA, A. S. et al. Effect of *Magnaporthe grisea* on seed germination, yield and quality of wheat. In: WANG, G. L.; VALENT, B. (Ed.). **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. Berlin: Springer, 2009. p. 267-277.

VALENT, B.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. **Genetics**, Austin, v. 127, n. 1, p. 87-101, Jan. 1991.

### CHAPTER 3

Characterization and target deletion of *Bin1* in *Magnaportheorhyzae* and its effect on fungal development and plant infection process

#### ABSTRACT

*Bin1* has been implicated in endocytosis, programmed cell death, and infection process, but its precise role is obscure. Therefore, the goal of this work was knocking out the *Bin1* (bridging integrator 1) gene and check the behavior of the mutants in vitro and when inoculated in barley plants. The *Bin1-Guy11* *Magnaportheorhyzae* wild type was transformed using protoplasts technique and the mutants were selected on complete medium containing 300 µg/mL hygromycin B. Specific primers were used to obtain the construct and the plasmid pCB1004 was used as a hygromycin-gene-resistant. Mycelial growth, spore germination, and appressorium formation were evaluated. Standard infection assay were performed using barley plants. According to PCR results of the *Bin1* gene, 5' Flank + HPH, and 3' Flank+HPH fragments, it were confirmed three knockouts (*bin1-13*, *bin1-19*, and *bin1-23*) and an ectopic (*bin1-24*). *Bin1-Guy11* wild type has shown higher mycelial growth rate (MGR) than all strains (*bin1-13*, *bin1-19*, *bin1-23*, and *bin1-24*) in complete medium and *Bin1-Guy11* wild type and the *bin1-24* (ectopic) have shown MGR higher than the others, in minimum medium. Conidial germination was similar among the treatments. However, *Bin1-Guy11* wild type and the *bin1-24* ectopic have presented more formed appressorium than the *bin1-23*, which has been more than the *bin1-19* and *bin1-13*. *Bin1-Guy11* wild type has shown more lesions per leaf than the mutants and was observed no difference between the strains when the size lesions were evaluated. Also, we observed similarity in *Bin1* sequences



between *M. oryzae* and other species, such as *Neurospora crassa*. Thus, rice blast disease symptoms were strongly reduced when *Bin1* gene has been deleted.

### RESUMO

*Bin1* tem sido relacionado à endocitose, à morte celular programada e ao processo de infecção, mas o seu papel preciso é obscuro. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de nocautear o gene *Bin1* e verificar o comportamento dos mutantes *in vitro* e quando inoculados em plantas de cevada. O tipo selvagem *Bin1-Guy11* de *Magnaporthe oryzae* foi transformado pela técnica de protoplastos e os mutantes foram selecionados em meio completo contendo 300 µg/mL de higromicina B. *Primers* específicos foram utilizados para obter o fragmento e o plasmídeo pCB1004 foi usado como gene de resistência à higromicina. Crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios foram avaliados. O ensaio padrão de patogenicidade foi realizado utilizando-se plantas de cevada. Com base nos resultados das PCRs do gene *Bin1*, região 5' + Hph e região 3' + Hph, confirmaram-se três mutantes (*bin1-13*, *bin1-19* e *bin1-23*) e um *ectopic* (*bin1-24*). O tipo selvagem *Bin1-Guy11* apresentou maior taxa de crescimento micelial (TCM) do que os isolados *bin1-13*, *bin1-23*, *bin1-19* e *bin1-24*, em meio completo, e o tipo selvagem *Bin1-Guy11* e o *bin1-24* (ectopic) mostraram TCM maior do que os outros isolados, em meio mínimo. Na germinação de conídios não houve diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, o tipo selvagem *Bin1-Guy11* e o isolado *bin1-24* apresentaram mais apressórios formados do que o mutante *bin1-23*, e este mais do que os mutantes *bin1-19* e *bin1-13*. O tipo selvagem *Bin1-Guy11* produziu mais lesões por folha do que os mutantes e não houve diferença entre os isolados quanto ao tamanho das lesões avaliadas. Além disso, observou-se similaridade entre sequências de *Bin1* de *M. oryzae* e outras espécies, como, por

exemplo, *Neurospora crassa*. Portanto, os sintomas da brusone foram fortemente reduzidos quando o gene *Bin1* foi deletado.

## 1 INTRODUCTION

*Magnaportheoryzae* is the causal agent of the rice blast disease, which is considered the most devastating disease of cultivated field. It has been importantly reported in different countries around the world. Due the availability of the whole *M. oryzae* genome sequence, studies have been conducted to find determinants genes of the disease (JEONG; MITCHELL; DEAN, 2007).

Knocking out suspects genes has been a way to know what are its probable functions in the plant-pathogen interaction (ALEXANDER; HOWLETT, 2001). Some authors have presented this technique in remarkable researches (DEZWAAN et al., 1999; SWEIGARD et al., 1998). Bar (Bin, amphiphysin, Rvs) domain superfamily of proteins are central regulators of the membrane dynamics, in special in the generation of the membrane curvature, formation of plasma membrane protrusions, and invaginations and shaping intracellular organelles (GRAHAM; KOZLOV, 2010; SAARIKANGAS et al., 2009; SUETSUGU et al., 2010). Furthermore, *Bin1* has been implicated in endocytosis, programmed cell death, and infection process, but its precise role are obscure (MULLER et al., 2003; ROUTHIER; DONOVER; PRENDERGAST, 2003).

*M.oryzae* infection begins when the germ tube differentiates into an infect structure, the appressorium (BOURETT;HOWARD, 1990). Then occur the appressorialmelanization which, once mature, generates enormous hydrostatic pressure that mediates direct penetration of a narrow penetration peg through the host cuticle and epidermal layer. The intracellular hypha ramify throughout the host tissue and form conidiophores which will produce conidia

into the environment (HOWARD et al., 1991). Furthermore, we hypothesis is that *MagnaportheBin1* has a role in binding the membrane of the appressorium, which can be regulated by the Bar domain complex. Therefore, the goal of this work was knocking out the *Bin1* gene and check the behavior of the mutants in vitro and when inoculated in barley plants.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Fungal strains, growth conditions, and transformation

The study was conducted in the Molecular Plant Pathology Lab at the University of Delaware, USA. The *Magnaportheoryzae* strains used in this study are described in Table 1. All strains were cultured and stored as described by Valent, Farrall and Chumley (1991). Transformation of *M. oryzae* protoplasts was performed as described by Sweigard et al. (1995). Mutants were selected on complete medium (0.6% yeast extract, 0.6% casein hydrolysate, 1% glucose, and 1.7% agar) containing 300 µg/mL hygromycin B (Sigma). Transformation plates were incubated for 4 to 5 days at 25°C in the dark, then they were transferred to oatmeal agar plates (CRAWFORD et al., 1986) and purified by monoconidiation.

**Table 1** Fungal strains used in this study<sup>a</sup>

Name <sup>a</sup>	MT <sup>b</sup>	Description/Reference
Guy11 7015	1-2	French Guyana field isolate (LEUNG et al., 1988)

<sup>a</sup>All strains belong to mitochondrial DNA haplotype I.

<sup>b</sup> MT, mating type.

### 2.2 Plasmids, DNA Libraries, and DNA Manipulations

The plasmid used in this assay was the pCB1004 (CARROLL; SWEIGARD; VALENT, 1994). A DNA library was constructed from 7015 strain in that vector, as described by Sweigard et al. (1995). MGG\_11497 - reduced viability upon starvation protein 167 (*Bin1*) was knocked out. The selectable marker was the Hygromycin gene resistant, governed by the Hph gene (hygromycin phosphotransferase) (CARROLL; SWEIGARD; VALENT, 1994). Firstly, it was designed the primers to build the construct which have been used for knocking out the selected gene. The deletion amplicon was generated through primer sequences that were modified from the yeast protocol (REID; LISBY; ROTHSTEIN, 2002). The hygromycin cassette was amplified using primers HphFor (5'-CCGCTGCTAGGCGCGCCGTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCA) and Hph Rev (5'-GTCAGCGGCCGCATCCCTGCGGTCGGCATCTACTCTATTC) in pCB1004 DNA (CARROLL; SWEIGARD; VALENT, 1994). The 5' flanking sequence was generated using SPL F (5'-CCCTGCACATCTTGCCAATTTCT) and SPL R (CACGGCGCGCCTAGCAGCGGTTGGCCATGAACAGAAAGCCGATG). The 3' flanking sequence was amplified using SPR F (GCAGGGATGCGGCCGCTGACCGAGGGAGTTCTGTCAGGTTCAAA) and SPR R (TGTCCGCCTAAACATCAAATGCCC). The nested primer sequences CAGGCAGGTACGTGACCTCAAAGC and ATCCCTTCCAATGTCGAGGCTGAA were used to create the 5'::Hph::3' vector. The PCR conditions for Nested PCR were 95°C for 3min, followed by 40 cycles of 95°C for 30s, 58°C for 30s, and 72°C for 3min, with a final extension at 72°C for 10min. Transformants were selected in complete medium with 300 µg.mL<sup>-1</sup> of hygromycin B. Integration of the hygromycin cassette was confirmed by PCR using hygromycin-specific primers, *Bin1* specific primers, and the

outside regions Hph and 5' plus Hph and 3' binding each other. The tests were performed in triplicate, and the data were pooled.

### **2.3 Mycelial growth, conidia germination, and appressorium formation**

First, for the evaluation of mycelial growth, 10 mL of autoclaved complete medium (CM) plus hygromycin was added to Petri dishes. In the center of each dish, a 6-mm diameter disk containing 10-days-old mycelium developed on CM was deposited, corresponding to the experimental plot. This assay was conducted in a completely randomized design (CRD). The dishes were placed in an incubator at 25°C under the dark. The colony diameters in the Petri dishes were measured daily, during 7 days. The results were converted to mycelial growth rate (MGR) to be adapted to the formula described by Maguire (1962).

Then, the conidial germination was assessed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plates and by examining individual conidia under a light microscope. The treatments were conducted in 8 replicates in a CRD. In each ELISA plate well, 80 µL each of 0.02% gelatin water were added. The plates were incubated at 25°C for 15h under light. In all, 50 conidia were examined per experimental plot, totaling 400 conidia per treatment. It was counted both conidia germination and appressorium formation number.

### **2.4 Plant infection assay**

Standard infection assays were performed with aerosolized conidia, as described previously (SWEIGARD et al., 1998), using barley (*Hordeum vulgare*) cultivar Lacey. Briefly, 8 to 12-day-old conidia were harvested and resuspended in 0.02% gelatin to a concentration of  $10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>. Plants were sprayed inoculated with the suspension using an artist's airbrush. Barley plants

were 18-days-old at the time of inoculation, and virulence was assessed 4 days after inoculation. For quantification of fungal virulence, 4-inch pots containing 4-barley plants were grown for 18 days before inoculation. The experiment was performed in duplicate, and the results from both tests were pooled.

Barley plants were cultivated in growth chamber at  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  and 12 h of photoperiod. The *bin1-13*, *bin1-19*, *bin1-23*, *bin1-24*, and *Bin1-Guy11* wild type, and the control were inoculated, totaling six treatments with four replicates each one. The number of lesions per leaf and the size of lesions have been evaluated. The data were submitted to variance analyze and means were tested by Tukey's test ( $p < 0.01$ ) using the Sisvar Statistic Program (FERREIRA, 2000).

### 3 RESULTS

#### 3.1 Obtaining the construct and the mutants

The construct was made through the amplification of the three fragments (5' and 3' region, both from *Bin1-Guy11* wild type DNA, and the hyg gene that came from pCB1004 plasmid (Figure 1a). Then, the Nested PCR was carried to nestle the fragments shown in Figure 1b. It has been found 42 potential transformants grown in complete medium plus hygromycin. According to the PCR results of the *Bin1* gene, 5' Flank + Hph, and 3' Flank + Hph fragments, have been confirmed three knockouts (*bin1-13*, *bin1-19*, and *bin1-23*) and an ectopic (*bin1-24*) (Figures 1c,d,e,f).

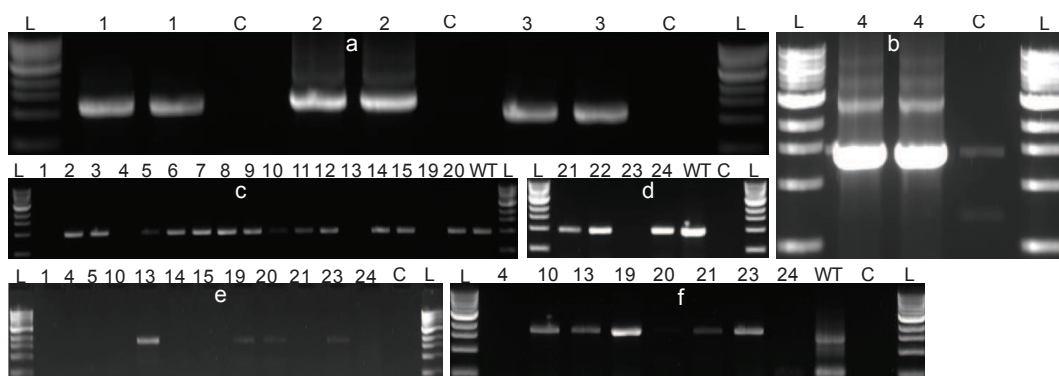


Figure 1 5'Flank region (a1), hygromycin gene (a2), 3'Flank region amplifications (a3), Nested PCR (b), *Bin1* gene amplification (e), and 3'+Hph amplification (f).

L = ladder or marker (1kb), wt = wild type positive control, c = negative control, numbers = strains

### 3.2 Mycelial growth, conidia germination, and appressorium formation

The *Bin1-Guy11* wild type has shown higher mycelial growth rate (MGR) than all strains (*bin1-13*, *bin1-23*, *bin1-19*, and *bin1-24*), and the *bin1-24* ectopic was higher than the *bin1-13*, *bin1-19*, and *bin1-23* mutants in complete medium. *Bin1-Guy11* wild type and the *bin1-24* (ectopic) have shown the highest MGR and the *bin1-13* the smallest MGR, when the minimum media was used as substrate (Table 2).

Table 2 Mycelial growth index for the *Bin1* mutants and its wild type. Complete medium (CM) and Minimum medium (MM)

Strains	MGI - CM	Strains	MGI - MM
<i>bin1-13</i>	0.5200 a	<i>bin1-13</i>	0.3067 a
<i>bin1-23</i>	0.5600 b	<i>bin1-19</i>	0.3833 b
<i>bin1-19</i>	0.5733 b	<i>bin1-23</i>	0.4233 c
<i>bin1-24*</i>	0.5767 b	<i>Bin1-Guy11</i>	0.4600 d
<i>Bin1-Guy11</i>	0.6433 c	<i>bin1-24*</i>	0.4600 d

Means followed by the same letter in the columns do not differ for the Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

\* ectopic

Conidial germination assay has shown no significant difference between the treatments. However, the appressorium formation has been consistently different. The *Bin1-Guy11* wild type and the *bin1-24* ectopic have presented well formed appressorium than the *bin1-23*, which has been more than the *bin1-19* and *bin1-13* (Table 3).



Table 3 Conidia germination and appressorium formation

Strains	Germination (%)	Strains	Apressoria (%)
<i>bin1-13</i>	86.50 a	<i>bin1-13</i>	16.84 a
<i>bin1-23</i>	85.66 a	<i>bin1-19</i>	20.16 a
<i>bin1-19</i>	85.84 a	<i>bin1-23</i>	66.84 b
<i>bin1-24*</i>	90.50 a	<i>Bin1-Guy11</i>	82.00 c
<i>Bin1-Guy11</i>	85.00 a	<i>bin1-24*</i>	81.16 c

Means followed by the same letter in the columns do not differ for the Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

\* ectopic

### 3.3 Plant infection assay

*Bin1-Guy11* wild type has shown an average of 14 lesions per leaf and the mutants have shown up to 4.5. The *bin1-24* ectopic was intermediate between the wild type and the *bin1-mutants* in number of lesions per leaf (Figure 2).

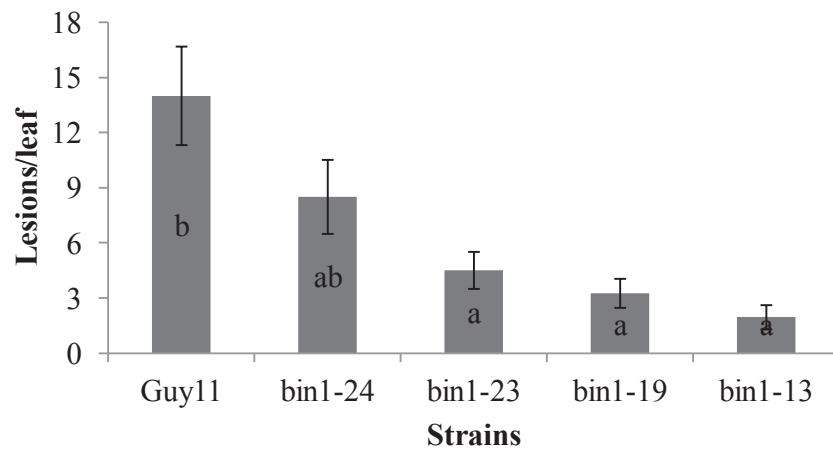


Figure 2 Number of lesions/leaf of barley cv. Lacey spray inoculated by *Magnaportheoryzae* 4 days after inoculation. Means followed by the same letter are similar according to Tukey's test ( $p < 0.01$ )

It has shown no difference between the strains for the size lesion (Figure 3). This suggests that once the infection has been established, the infection process continues similarly between the wild type and the mutants strains.

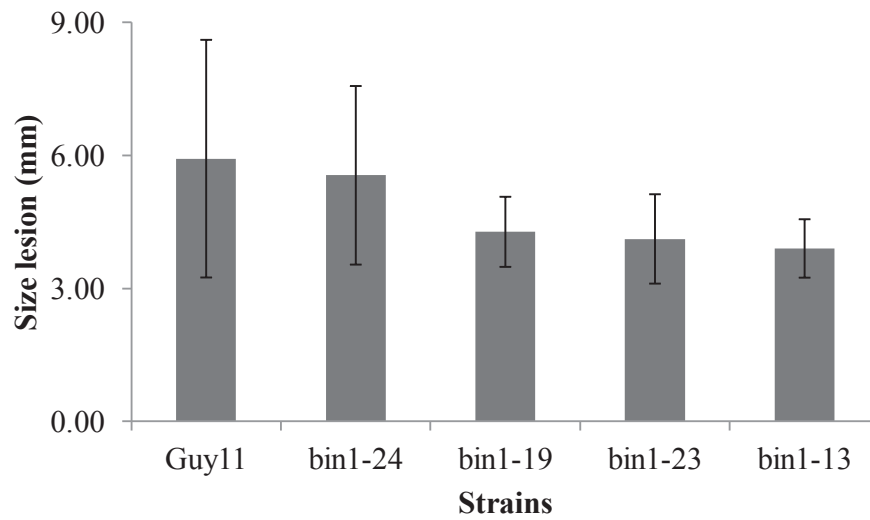


Figure 3 Size lesions of barley leaves cv. Lacey spray inoculated by *M. oryzae* at five days after inoculation. Means followed by the same letter are similar according to Tukey's test ( $p < 0.01$ )

The incidence and severity of the disease in the wild type can be observed in the Figure 4, when compared with the mutants and the ectopic strains.

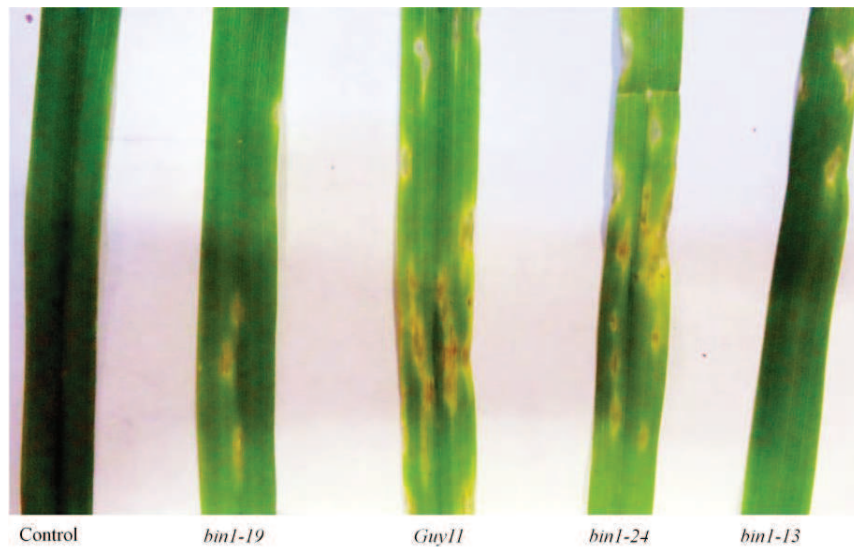


Figure 4 *M. oryzae* symptoms in barley leaves cv. Lacey at five days after inoculation. *bin1-13*, *bin1-19*, *bin1-24* ectopic, and *Bin1-Guy11* wild type

### 3.4 Comparing *Bin1* sequences in close species

Alignment of the similar *Bin1* sequences from *Magnaporthe oryzae* with other species (*Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Ashbya gossypii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Homo sapiens*, and *Mus musculus*). In Table 5 we observed that *N. crassa* was more related of *M. oryzae* in both protein and mRNA sequences, followed by the yeasts and *A. gossypii* and *K. lactis*, which has yeast growth mold. Also, it has been shown that this gene is found in mammalian and present more than 48% of identity in mRNA and more than 22% of identity in protein sequences in both humans and mice (Table 4).

Table 4 Sequence Identities for *Bin1* Homologues

<i>M.oryzae</i>	MGG_11497	Identity (%)	
		Protein	mRNA
vs. <i>N.crassa</i>	NCU04637	70.9	69.74
vs. <i>S.pombe</i>	hob1	56.7	57.09
vs. <i>A.gossypii</i>	AGOS_AFR140C	51.7	56.79
vs. <i>S.cerevisiae</i>	RVS167	51.4	55.65
vs. <i>K.lactis</i>	KLLA0E03059g	49.6	55.17
vs. <i>H.sapiens</i>	myc box iso 5	<i>bin1-23.3</i>	49.22
vs. <i>M.musculus</i>	myc box iso 1	22.1	48.94

Source: Genbank data.

#### 4 DISCUSSION

Studies have shown that mutation in genes encoding BAR domain proteins have been linked to many diseases, including in mammalian (MULLER et al., 2003; NICOT et al., 2007). Also, altered membrane dynamics have been resulted in severe phenotypes in both plants and animals, caused by inactivation of some BAR domain proteins (FUGIER et al., 2011; DI PAOLO et al., 2002; SWEIGARD et al., 1998).

In this study, bridging integrator 1 associated with cellular membrane curvature might be related with the fungus infection and development due its effect on the appressorium formation and the plant infection process. Thus, even though the mutants have grown less in both complete and minimum medium and have shown less lesions per leaf than the ectopic and wild type strain, we observed that strains have presented no significant difference in lesion size. Balhadère, Foster and Talbot(1999) have found significant reductions in

mycelial growth from corresponding wild type and the conidiogenesis was similar to the wild type, however, the conidial germination was delayed significantly in mutants.

Also, based on the plant infection assay, the results suggested that the *Bin1* is related to infection and did not to virulence. Once the plant is infected, the disease progress did not change once lesion size have presented no difference between the treatments. It has not been found studies comparing *Bin1* target deletion, however, other genes such as PTH have resulted in more disease in 40bin1-19-5-8 *M. oryzae* wild type when compared to its mutants (SWEIGARD et al., 1998). In the similar way, Balhadère, Foster and Talbot(1999), studying five *M. oryzae* transformants, have found reduced disease symptoms on barley and rice, comparing them to the wild type. It suggests that the knocking out of *Bin1* gene is strongly related to the fungus infection process, which is directly dependent on appressorium formation. In the same way, Zheng et al. (2007) have found that MGRho3 is essential for appressorium development and pathogenicity of *M. oryzae*. Also, CUT2 is responsible for mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence in rice (SKAMNIOTI; GURR, 2007). However, Park et al. (2002) have shown that MST12 regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *M. oryzae*.

Several studies have been shown that the BAR domain complex is related with important process in many species (CHANG et al., 2007; NICOT et al., 2007; SMACZYNSKA-DE-ROOIJ et al., 2012; WECHSLER-REYA et al.,1997). Muller et al.(2003) related that two BAR adapter genes which are analogous to mammalian *Bin1* and *Bin3*, are also conserved in both the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* (RVS 167 and RVS 161) and the fission yeast *Schyzosaccharomycespombe* (hob1 and hob3).

Development of *M. oryzae* mutants in vitro has been shown some differences of its wild type. Thus, rice blast disease symptoms were strongly reduced when *Bin1* gene has been deleted. In this way, many studies like this also can be done with other genes, mainly those belonging to BAR domains complex to improve the knowledge about its infection on this disease and then helping to find new strategic of management for this and other important plant diseases worldwide.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Project - CNPq 479816/2011-5 and PhD Scholarship for the first author), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – Project - CAG - APQ-02536-1 and CAG – PPM – 00248-13) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

## REFERENCES

- ALEXANDER, I.; HOWLETT, B. J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 4, p. 241-255, 2001.
- BALHADÈRE, P. V.; FOSTER, A. J.; TALBOT, N. J. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 2, p. 129-142, 1999.
- BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, n. 2, p. 329-342, Feb. 1990.
- CARROLL, A. M.; SWEIGARD, J. A.; VALENT, B. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. **Fungal Genetics Newsletter**, Orlando, v. 41, n. 1, p. 1-22, 1994.
- CHANG, M. Y. et al. Bin1 ablation increases susceptibility to cancer during aging, particularly lung cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v. 67, n. 16, p. 7605-7612, Aug. 2007.
- CRAWFORD, M. S. et al. Characterization of the heterokariotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. **Genetics**, Austin, v. 114, p. 1111-1129, 1986.
- DEZWAAN, T. M. et al. *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 10, p. 2013-2030, Oct. 1999.
- DI PAOLO, G. et al. Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. **Neuron**, Maryland, v. 33, p. 789-804, Feb. 2002.



FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. Software.

FUGIER, C. et al. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. **Nature Medicine**, New York, v. 17, n. 6, p. 720-725, June 2011.

GRAHAM, T. R.; KOZLOV, M. M. Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 22, n. 4, p. 430-436, Aug. 2010.

HOWARD, R. J. et al. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. **Proceedings of National Academy Science of the USA**, Washington, v. 88, n. 24, p. 11281-11284, 1991.

JEONG, J. S.; MITCHELL, T. K.; DEAN, R. A. The Magnaporthe grisea snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 273, n. 2, p. 157-165, Aug. 2007.

LEUNG, H. et al. Genetic analysis of virulence in the rice blastfungusMagnaporthegrisea. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1227-1233, 1988.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MULLER, A. J. et al. Targeted disruption of the Murine Bin1: Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 23, n. 12, p. 4295-4306, 2003.

NICOT, A. S. et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1134-1139, Sept. 2007.

PARK, G. et al. MST12 regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 15, n. 3, p. 183-192, Mar. 2002.

REID, R. J.; LISBY, M.; ROTHSTEIN, R. Cloning-free genome alterations in *Saccharomyces cerevisiae* using adaptamer-mediated PCR. **Methods in Enzymology**, New York, v. 350, p. 258-277, 2002.

ROUTHIER, E. L.; DONOVER, P. S.; PRENDERGAST, G. C. *hob1+*, the fission yeast homolog of Bin1, is dispensable for endocytosis or actin organization, but required for the response to starvation or genotoxic stress. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 5, p. 637-648, Feb. 2003.

SAARIKANGAS, J. et al. Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. **Current Biology**, London, v. 19, n. 2, p. 95-107, Jan. 2009.

SKAMNIOTI, P.; GURR, S. J. *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 8, p. 2674-2689, Aug. 2007.

SMACZYNSKA-DE-ROOIJ, I. I. et al. Yeast dynamin Vps1 and amphiphysin Rvs167 function together during endocytosis. **Traffic**, Copenhagen, v. 13, n. 2, p. 317-328, Feb. 2012.

SUETSUGU, S. The proposed functions of membrane curvatures mediated by the BAR domain superfamily proteins. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 148, n. 1, p. 1-12, July 2010.

SWEIGARD, J. A. et al. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1221-1233, Aug. 1995.

SWEIGARD, J. A. et al. Magnaporthe grisea pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 5, p. 404-412, May 1998.

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

WECHSLER-REYA, R. et al. Structural analysis of the human BIN1 gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, n. 50, p. 31453-31458, 1997.

ZHENG, W. et al. A Rho3 homolog is essential for appressorium development and pathogenicity of Magnaporthe grisea. **Eukaryotic Cell**, Lawrence, v. 6, n. 12, p. 2240-2250, Dec. 2007.

(PRELIMINAR)