

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

JULIANA TEODORA DE ASSIS REGES

**BIOLOGIA E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO
PATÓGENO DA BRUSONE DO TRIGO NO CENTRO-SUL DO BRASIL**

Ilha Solteira
2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

JULIANA TEODORA DE ASSIS REGES

**BIOLOGIA E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO
PATÓGENO DA BRUSONE DO TRIGO NO CENTRO-SUL DO BRASIL**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor.
Especialidade: Sistema de Produção.

Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini
Orientador

Dr. João Leodato Nunes Maciel
Co-orientador

Ilha Solteira
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

- R333b Reges, Juliana Teodora de Assis.
Biologia e estrutura genética de populações do patógeno da brusone do trigo no Centro-Sul do Brasil / Juliana Teodora de Assis Reges. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016
74 f. : il.
- Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidades: Sistemas de Produção, 2016
- Orientador: Dr. Paulo Cezar Ceresini
Coorientador: Dr. João Leodato Nunes Maciel
Inclui bibliografia
1. *Triticum aestivum*. 2. *Pyricularia graminis-tritici*. 3. Patogenicidade. 4. Hospedeiros. 5. Estudo genético-populacional.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Biologia e estrutura genética de populações do patógeno na brusone do trigo no centro-sul do Brasil

AUTORA: JULIANA TEODORA DE ASSIS REGES

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

CO-ORIENTADOR: JOÃO LEODATO NUNES MACIEL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA, especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. ALCEBIADES RIBEIRO CAMPOS

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Dr. MARCO ANTONIO BASSETO

Escritório de Defesa Agropecuária de Araçatuba / Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo

Profa. Dra. ANA CAROLINA FIRMINO

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas

Ilha Solteira, 23 de agosto de 2016

DEDICATÓRIA

A meu marido Reges, aos meus pais, Otaira e Wellington, pelo incentivo, compreensão, amor e por todos os ensinamentos de vida;

Às minhas irmãs, Fabiana e Tatiana, e a minha sogra Lauridia, avó Terezinha pelo carinho e companheirismo;

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Kemilly, Ana Flávia e Eduardo, com carinho e amor;

À memória da minha avó Erondina, e do meu avô Lacordario, sempre presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, sempre presente em minha vida, de quem tantas graças tenho recebido;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Agronomia em nível de Doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de estudos;

Ao orientador, Professor Doutor Prof. Paulo Ceresini, pelos ensinamentos, dedicação, disponibilidade e amizade durante todo o curso, e pela confiança a mim depositada;

Ao co-orientador Doutor João Leodato Nunes Maciel, pelo apoio, aprendizado e amizade, durante essa jornada;

A Dra. Vanina Castroagudin, pela cumplicidade e toda ajuda na obtenção e nas análises dos dados deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia, Giselle de Carvalho, Matheus Negrisoli, Adriano Dorigan, Edisson Chavarro, Danilo Pereira, Nadia Poloni, Priscila Casado, Tiago Calves, Diego Feitosa, Samara Campos, Samanta Oliveira por toda ajuda, disposição durante a implementação e condução dos experimentos.

Os mais sinceros agradecimentos aos colegas, amigos, professores, funcionários e todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta caminhada.

Ao meu pai Wellington de Assis e a minha mãe Otaira Teodora de Assis, pelo incentivo, amor, por acreditarem na minha capacidade para concluir este trabalho;

Por último e muito importante ao meu esposo Reges por todo amor, compreensão, por me apoiar em momentos difíceis, pelo incentivo, pelas orações e por nunca ter deixado de acreditar em mim.

"Por isso não tema, pois estou com você; não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei com a minha mão direita vitoriosa."

Isaías 41:10

RESUMO

Na primeira parte de nosso estudo descrevemos a associação de *Pyricularia pennisetigena* e *P. zingibericola* a gramíneas invasoras de áreas de trigo no centro-sul do Brasil. Desconhece-se, entretanto, qual o potencial de *P. pennisetigena* e *P. zingibericola* como patógenos de poáceas de interesse econômico para a agricultura brasileira. Dessa forma, objetivamos caracterizar o espectro de patogenicidade de *P. pennisetigena* e *P. zingibericola* a braquiária, cevada e trigo e compará-lo com *P. grisea* e com a espécie até recentemente descrita como *P. oryzae* patotipo *Triticum*, de ocorrência generalizada no agroecossistema brasileiro. Foram testados 20 isolados de *Pyricularia* spp. obtidos de amostras de folhas infectadas de plantas invasoras de campos de trigo. A classificação dos isolados em espécies distintas de *Pyricularia* foi efetuada usando-se filogenia molecular baseada nas sequências parciais dos genes actina e calmodulina. *Pyricularia pennisetigena* e *P. zingibericola* inoculadas em folhas, foram patogênicas a braquiária, cevada e trigo, com diferenças na agressividade entre as espécies. *Pyricularia zingibericola* foi a espécie mais agressiva a braquiária e cevada, enquanto *P. pennisetigena* foi a espécie mais agressiva em plantas jovens de trigo. Por outro lado, *P. grisea* isolada de *Digitaria sanguinalis* ou de *Urochloa* spp. não infectou trigo. A análise filogenética das regiões ACT e CAL concatenadas reproduziu as relações filogenéticas e a magnitude das diferenças descritas entre *Pyricularia zingibericola*, *P. pennisetigena*, *P. oryzae* patotipo *Triticum* e *P. grisea*. *Urochloa* spp. provavelmente representam fonte permanente de inóculo inicial dos patógenos da brusone do trigo entre as épocas de cultivo. Na segunda parte desta pesquisa, foi estudado a estrutura genética de populações do patógeno da brusone do trigo, o fungo Ascomiceto *Pyricularia graminis-tritici* sp. nov., no centro-sul do Brasil. Os objetivos foram responder às seguintes perguntas: As populações geograficamente distintas de *P. graminis-tritici* do trigo eram geneticamente subdivididas? Como se distribuía a diversidade gênica e genotípica entre as populações regionais de *P. graminis-tritici*, cerca de 30 anos após as primeiras epidemias de brusone no Brasil? Qual o sistema reprodutivo predominante de *P. graminis-tritici* no país? Conclui-se que não houve subdivisão na maioria das populações geográficas contemporâneas de *P. graminis-tritici* do trigo, indicando mecanismo eficiente de fluxo gênico. A magnitude e a extensão do fluxo gênico entre populações geográficas de *P. graminis-tritici* do trigo, o sistema reprodutivo predominantemente sexual, aliados a alta diversidade genética do fungo, indicam um patógeno com alto potencial evolutivo no agroecossistema brasileiro. Outras

espécies de poáceas hospedeiras com ampla distribuição geográfica no Brasil, como por exemplo, o capim-braquiária (*Urochloa brizantha*), podem ter importante papel no ciclo de vida e na biologia reprodutiva, na sobrevivência e na dispersão do inóculo de *P. graminis-tritici* a curta e longa distâncias, mantendo as populações geográficas do patógeno conectadas. Os padrões de fluxo gênico e genotípico entre populações hospedeiro-distintas do patógeno reforçam a hipótese de que a brusone do trigo pode ter tido origem *de novo* a partir de populações endêmicas de *P. graminis-tritici* que infectam outras espécies de poáceas (nativas ou invasoras de áreas de trigo) no país.

Palavra-chave: *Triticum aestivum*, *Pyricularia graminis-tritici*, Patogenicidade, Hospedeiros, Estudo genético-populacional.

ABSTRACT

In the first part of our study we described the association of *Pyricularia pennisetigena* and *P. zingibericola* with invasive grasses from wheat cropping areas in South-Central Brazil. However, the potential of *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* as pathogens to poaceous plants of economic interest for Brazilian agriculture is still unknown. Therefore, this study aimed to characterize the pathogenicity spectrum of *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* to signal grass, barley and wheat and compare with *P. grisea* and with the species until recently described as *P. oryzae* pathotype *Triticum*, of widespread occurrence in the Brazilian agroecosystem. Twenty isolates of *Pyricularia* spp. obtained from samples of infected leaves of weed species in wheat fields were tested. Classification of isolates into different species of *Pyricularia* was performed using molecular phylogeny based on the partial actin and calmodulin gene sequences. *Pyricularia pennisetigena* and *P. zingibericola* inoculated on leaves were pathogenic to signal grass, barley and wheat, with differences in aggressiveness between species. *Pyricularia zingibericola* was the most aggressive species to signal grass and barley, while *P. pennisetigena* was the most aggressive species to young plants of wheat. On the other hand, *P. grisea* isolated from *Digitaria sanguinalis* or *Urochloa* spp. did not infect wheat. Phylogenetic analysis of the concatenated regions ACT and CAL reproduced the phylogenetic relationships and the magnitude of the differences reported between *Pyricularia zingibericola*, *P. pennisetigena*, *P. oryzae* pathotype *Triticum* and *P. grisea*. *Urochloa* spp. probably represents a permanent source of initial inoculum of the wheat blast pathogens between growing seasons. In the second part of this research, we studied the genetic structure of populations of the wheat blast pathogen, the Ascomycete fungus *Pyricularia graminis-tritici* sp. nov., in the South-Central Brazil. The objectives were to answer the following questions: The geographically distinct populations of *P. graminis-tritici*wheat were genetically subdivided? How gene and genotypic diversity were distributed among regional populations of *P. graminis-tritici* about 30 years after the first outbreaks of wheat blast in Brazil? What is the predominant reproductive system of *P. graminis-tritici* in the country? We concluded that there was no subdivision among most of the contemporary geographical populations of *Pyricularia graminis-tritici* from wheat fields, indicating an efficient mechanism of gene flow. The magnitude and extent of gene flow among geographical populations of *P. graminis-tritici*, the predominantly sexual reproductive system, coupled

with high genetic diversity of the fungus, indicated a pathogen with high evolutionary potential in the Brazilian agro-ecosystem. Other species of poaceous hosts with wide geographic distribution in Brazil, for example, signal grass (*Urochloa brizantha*) can play an important role in the life cycle and reproductive biology, survival and spread of inoculum of *P. graminis-tritici* at short and long distances, keeping the geographical populations of the pathogen connected. The patterns of gene and genotypic flow between host-distinct populations of the pathogen reinforce the hypothesis that the wheat blast may have had a *de novo* origin from endemic populations of *P. graminis-tritici* infecting other poaceous species (native or invasive to wheat areas) in the country.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Pyricularia graminis-tritici*, Pathogenicity, hosts, population genetic study

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Espiga assintomática não inoculada (A), brusone em espiga de trigo (B) e lesões foliares em trigo cv. Anahuac (C), cevada cv. BRS Korbel (D) e braquiária cv. Piatã (E) inoculadas com *Pyricularia graminis-tritici* 22

Capítulo 1

- Figura 1** Reconstruction of the phylogenetic relationship among four species of the *Pyricularia* genus, based on sequences of the actin (ACT) and calmodulin (CAL) genes concatenated. Maximum likelihood (ML) implemented in the PhyML algorithm was used. The internode support for the branches was tested by 10,000 bootstrap resamplings of the data 34

- Figura 2** Boxplots representing the pathogenicity of *Pyricularia* species to signal grass (A), barley (B) and wheat (C). Pg = *Pyricularia grisea* (n = 3); Po-it = *Pyricularia oryzae* pathotype *Triticum* (n = 6); Pp = *Pyricularia pennisetigena* (n = 8); Pz = *Pyricularia zingibericola* (n = 3); C (control), with n = number of isolates per species) 36

- Figura 3** Photographs of leaf blast symptoms caused by different species of *Pyricularia* on the leaves of signal grass cv. Piatã (A), barley cv. BRS Korbel (B) and wheat cv. Anahuac 75 (C). Pg = *P. grisea*; Po-it = *P. oryzae* pathotype *Triticum*; Pp = *P. pennisetigena*; Pz = *P. zingibericola*; C=control 36

Capítulo 2

- Figura 1** Processo de isolamento e preservação de culturas monospóricas puras do patógeno da brusone do trigo e de plantas invasoras (*Pyricularia graminis-tritici*) no Centro-Sul do Brasil 47

- Figura 2** Estratégia de amostragem populacional de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* associados à brusone em espigas de trigo e em folhas de plantas poáceas invasoras no centro-sul do Brasil, nas safras de 2012 e 2013 54

- Figura 3** Rede mínima de expansão baseada em distância de Bruvo para comparação entre genótipos microssatélites de 219 genótipos de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras poáceas e de *P. oryzae* patótipo *Oryza* do arroz no Centro-Sul do Brasil 57

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1** Isolates and their respective *Pyricularia* species obtained from grass plants invasive to wheat fields in 2012 and 2013, as well as their accession number for the actin (ACT) and calmodulin (CAL) gene sequences deposited at the NCBI GenBank 32
- Tabela 2** Variance analysis table for testing the effects of the experiment, species and pathogen isolates on the aggressiveness of *Pyricularia* spp. to signal grass, barley and wheat 35

Capítulo 2

- Tabela 1** Descrição de populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras plantas poáceas e de *Pyricularia oryzae* patótipo *Oryza* do arroz amostradas no Centro-Sul do Brasil 48
- Tabela 2** Medidas de diversidade genotípica e gênica em populações simpátricas de *Pyricularia graminis-tritici* e *P. oryzae* patótipo *Oryza* no Centro-Sul do Brasil 53
- Tabela 3** Número de genótipos multiloci microssatélites compartilhados entre populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo, de outras espécies poáceas e *P. oryzae* patótipo *Oryza* no Centro-Sul do Brasil 58
- Tabela 4** Compartilhamento de 11 genótipos multiloci entre populações de *Pyricularia graminis-tritici* amostradas de trigo e de outras poáceas invasoras de áreas de trigo no Centro-Sul do Brasil 59
- Tabela 5** Distribuição hierárquica da diversidade gênica entre populações de gene de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo, de outras poáceas e de *Pyricularia oryzae* de arroz no Centro-Sul do Brasil 61
- Tabela 6** Medidas de diferenciação entre populações de *Pyricularia* spp. do trigo, de outras poáceas e de arroz no Centro-Sul do Brasil, baseadas em R_{ST} 62

Tabela 7 Estimativa de desequilíbrio gamético em populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo, e de outras poáceas e *P. oryzae* patótipo *Oryza* de arroz no Centro-Sul do Brasil 66

Tabela 8 Desvios da frequência entre os tipos de acasalamento *MAT1-1* e *MAT1-2* detectados em populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras espécies de poáceas no Centro Sul do Brasil em função da resistência a fungicidas estrobirulinas (QoI) 67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REFERÊNCIAS	24
Capítulo 1: <i>Pyricularia pennisetigena</i> e <i>P. zingibericola</i> de gramíneas invasoras infectam braquiária, cevada e trigo	30
RESUMO	30
ABSTRACT	30
1. INTRODUCTION	30
2. MATERIAL AND METHODS	31
3. RESULTS AND DISCUSSION	33
4. CONCLUSIONS	37
5. ACKNOWLEDGMENTS	37
6. REFERENCES	37
Capítulo 2: Estrutura genética de populações contemporâneas do patógeno da brusone do trigo (<i>Pyricularia graminis-tritici</i> sp.nov) no centro-sul do Brasil	39
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Amostragem de populações geográficas de <i>Pyricularia graminis-tritici</i> (PoT) adaptadas ao trigo e a outras poáceas em lavouras do Centro-Sul do Brasil	45
2.2 Isolamento de <i>Pyricularia graminis-tritici</i>	45
2.3 Genotipagem de populações de isolados de <i>Pyricularia graminis-tritici</i> usando sequencias de DNA nuclear, alelos de idiomorfos de tipos de compatibilidade (<i>mating types</i>) e marcadores microssatélites	48
2.4 Análise da estrutura genética de populações de <i>Pyricularia graminis-tritici</i>	49
2.4.1 Diversidade genotípica e riqueza alélica	50
2.4.2 Rede mínima de expansão entre genótipos (RME)	50
2.4.3 Magnitude do fluxo gênico	51
2.4.4 Testes de equilíbrio gamético	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Diversidade genotípica e gênica.	52
3.2 Rede mínima de expansão entre genótipos e teste para mistura populacional	55

3.3 Diferenciação genética entre populações do patógeno	60
3.4 Predominância de equilíbrio gamético nas populações do patógeno	63
4. CONCLUSÕES	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os primeiros relatos sobre ocorrência de doença brusone datam de 1637 na cultura do arroz na China (OU, 1985). Por sua vez, no último século, emergiu como patógeno importante adaptado a cultura do trigo no sul do Brasil (IGARASHI et al., 1986) e espalhou-se para outros países que cultivam trigo na América do Sul, como Bolívia e Paraguai (DUVEILLER et al., 2010) e mais recentemente para Bangladesh, na Ásia (CALLAWAY, 2016). A brusone é uma doença extremamente importante que causa perdas elevadas à produção de culturas agrícolas de importância mundial (OU, 1985; GOULART; PAIVA, 2000; PRABHU et al., 2003). O patógeno da brusone do trigo está catalogado como um sério patógeno quarentenário que ameaça à agricultura americana (MADDEN; WHEELIS, 2003; STRANGE; SCOTT, 2005; KOHLI et al., 2010).

Os primeiros surtos da brusone do trigo no Brasil, com prejuízos significativos à produção, ocorrem no ano de 1986, nas regiões Norte e Oeste do Paraná (PR), assim como Noroeste de São Paulo e Sul do Mato Grosso do Sul. No ano de 1987, a doença atingiu proporções epidêmicas, e muitas lavouras apresentaram desde perdas parciais até perdas totais de produtividade. Naquele ano, setenta municípios somaram prejuízos entre 10 a 12% da produção (IGARASHI et al., 1986; IGARASHI, 1988). Em 1988, devido a fatores como a utilização de sementes infetadas pelo patógeno, a presença de inóculo da safra anterior no restos de cultura, a elevada suscetibilidade dos cultivares de trigo utilizados e as condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença, a brusone foi detectada já aos dez dias após o florescimento. Nesse ano detectou-se elevada ocorrência de brusone em campos de trigo nos Vales do Paranapanema, Ivaí e Tibagi, PR, especialmente em cultivares precoces, semeadas até a primeira quinzena de abril (IGARASHI, 1988).

Entre 1988 e 1992 foram avaliadas as perdas causados pela brusone do trigo no Mato Grosso do Sul, tendo sido constatado que o prejuízo econômico da doença decorria da redução na produção, na qualidade e no rendimento de grãos. Os altos prejuízos econômicos causados pela brusone voltaram a ocorrer na safra de 2004, com maior intensidade de ocorrência no Cerrado brasileiro, especialmente no Mato Grosso do Sul, e nas regiões Norte e Oeste do Paraná, resultando em alerta geral sobre a severidade da doença aos produtores de trigo e cevada destas regiões (PRABHU; FILIPPI, 2006).

A ocorrência de brusone em campos de trigo na Argentina foi relatada em 2007 com até 100% de plantas infectadas em toda a área de incidência (CABRERA; GUTIÉRREZ, 2007;

PERELLÓ et al., 2011). A brusone do trigo foi relatada, também, no Paraguai, Uruguai e Bolívia (URASHIMA, 2010).

Provavelmente devido a eventos climáticos extremamente favoráveis nas regiões produtoras, na safra de 2009/2010, epidemias de brusone do trigo ocorreram de forma generalizada no Brasil, tendo sido detectada desde o norte do Paraná até o Distrito Federal (TORRES, 2009), despertando a atenção dos serviços de extensão rural locais, bem como da comunidade científica nacional e internacional (DUVEILLER et al., 2010).

Em meados de fevereiro de 2016 ocorreu o primeiro relato de uma epidemia de brusone do trigo fora da América do Sul. A doença foi detectada em Bangladesh, no sudeste da Ásia, ocasionando perdas elevadas nas lavouras de trigo do país. Análises patogenômicas de amostras coletadas nos campos de trigo indicaram que o patógeno introduzido em Bangladesh possivelmente teve origem de populações do patógeno que infectam o trigo no Brasil (CALLAWAY, 2016; CROLL, 2016).

Novas alterações taxonômicas recentemente propostas, baseadas na combinação de dados biológicos e morfológicos pré-existentes com dados filogenéticos, foram usadas para reexaminar as relações entre espécies tipo *Pyricularia*, que pertencem à ordem Magnaporthales. A ordem Magnaporthales originalmente com uma única família, a Magnaporthaceae, era composta por 13 gêneros e mais de 100 espécies (ILLANA et al., 2013). As mudanças na ordem Magnaporthales foram relevantes e resultaram na definição de três famílias novas: Magnaporthaceae (baseada em *Nakataea* spp.), Pyriculariaceae (baseada em *Pyricularia* spp.) e Ophiocercaceae (baseada em *Ophioceras* spp.) (KLAUBAUER et al., 2014), sendo excluído o gênero *Magnaporthe* da família Magnaporthaceae (LUO; ZHANG, 2013). O reposicionamento da maioria das espécies alocadas no gênero “*Magnaporthe*” foram recepcionadas no gênero complexo polifilético *Pyricularia*, família Pyriculariaceae (LUO; ZHANG, 2013; KLAUBAUER et al., 2014). Procedeu-se à redefinição de novas combinações e novos taxa em todos os gêneros e propôs-se a mudança definitiva de nome para os fungos *Magnaporthe grisea* e *Magnaporthe oryzae*, respectivamente, para *Pyricularia grisea* (associado a *Digitaria* spp.) e *Pyricularia oryzae* (associado ao arroz). Com essa nova proposição, recomendou-se referir ao patógeno da brusone como pertencente ao gênero *Pyricularia*, tanto na fase assexuada como sexuada. Além disso, foram inseridas novas espécies de *Pyricularia* previamente não descritas como patógenos de poáceas no Brasil, como *P. pennisetigena* e *P. zingibericola* (KLAUBAUER et al., 2014) e que foram recentemente descritas como patógenos do trigo (REGES et al., 2016).

O gênero *Pyricularia* é composto por diversas espécies de fungos fitopatogênicos que estão associados com a brusone em mais de 50 espécies de plantas poáceas (OU, 1985). Entre

as espécies desse gênero, *Pyricularia oryzae* é possivelmente o patógeno mais importante em função de sua distribuição cosmopolita em plantas poáceas. A brusone ocasionada por *P. oryzae* é responsável por perdas severas, sob condições predisponentes, em culturas de importância econômica como arroz (*Oryza sativa*), aveia (*Avena sativa*), capim-braquiária (*Urochloa* spp.), centeio (*Secale cereale*), cevada (*Hordeum vulgare*), milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*) (ANJOS et al., 1996; BAILEY; EIJNATTEN, 1961; COUCH et al., 2005; COUCH; KOHN 2002; IGARASHI et al., 1986; GOULART et al., 2003; MARCHI et al., 2005; URASHIMA et al., 1993).

A adoção da designação de *P. oryzae* como espécie associada à brusone é recente em todo o mundo. Até o final dos anos 2000, considerava-se *Pyricularia grisea* como patógeno da brusone em arroz, braquiária, cevada e trigo (AVERNA-SACCA, 1912; IGARASHI et al., 1986; URASHIMA et al., 1993; GOULART et al., 2003; MARCHI et al., 2005). Após reclassificação filogenética molecular proposta em 2002 (COUCH; KOHN, 2002), *P. grisea* foi associada somente à brusone em gramíneas do gênero *Digitaria* e *P. oryzae* passou a ser associada ao arroz, trigo e outras gramíneas cultivadas ou invasoras, como capim-pé-de-galinha, razão pela qual adotou-se a nova classificação internacional.

O fungo *P. oryzae*, é considerado uma espécie complexa composta por subgrupos diferentes, agrupados por tipos de acasalamento (*mating types*), por características filogenéticas peculiares e pela gama restrita de hospedeiros ou patótipos (TOSA; CHUMA, 2014). Os patótipos representativos de *P. oryzae* e seus respectivos hospedeiros até então descritos são patótipo *Oryza*, patogênico ao arroz (*Oryza sativa*); patótipo *Panicum*, patogênico a milheto comum (*Panicum miliaceum*); patótipo *Setaria*, patogênico a painço (*Setaria italica*); patótipo *Triticum*, patogênico ao trigo (*Triticum aestivum*); patótipo *Avena*, patogênico à aveia (*Avena sativa*); patótipo *Eleusine*, patogênico a capim-pé-de-galinha (*Eleusine coracana*) e patótipo *Lolium*, patogênico a azevém perene (*Lolium perenne*) (TOSA; CHUMA, 2014). Considerando as diferenças filogenéticas entre os grupos, a designação de patótipo, poderia, perfeitamente dar lugar à definição de novas espécies de *Pyricularia* pertencentes ao complexo *P. oryzae* (KLAUBAUER et al., 2014; CASTROAGUDIN et al., 2016).

Até meados de 2016, a designação *P. oryzae* patótipo *Triticum* vinha sendo consistentemente associada com o patógeno da brusone do trigo na América do Sul (TOSA; CHUMA, 2014), mas uma nova proposta filogenética complementada com dados de genômica populacional indicou que o patógeno da brusone do trigo é a espécie *Pyricularia graminis-tritici* sp. nov. (CASTROAGUDIN et al., 2016; CROLL, 2016). Originalmente, com base em análises filogenéticas em 10 regiões do DNA nuclear: ACT, BAC6, β T-1, CAL, CH7-BAC7,

CH7-BAC9, CHS1, EF-1 α , MPG1 e NUT1, onde foram incluídos 105 isolados originalmente denominados *P. oryzae* patótipo *Triticum*, amostrados de populações simpátricas de trigo e de plantas invasoras e 23 isolados de *P. oryzae* patótipo *Oryza*, os isolados foram agrupados em três clados filogenéticos: clado 1, composto por isolados obtidos apenas de arroz (*P. oryzae* patótipo *Oryza*), clado 2, composto por isolados da espécie *P. oryzae* patótipo *Triticum* e clado 3, com isolados de plantas trigo e plantas invasoras. Identificou-se que o clado 3 é distinto de *P. oryzae* e representa uma nova espécie, a qual foi denominada *Pyricularia graminis-tritici* sp. nov. Com isso, sugeriu-se que a brusone em trigo e outras Poaceae, no Brasil, é causada por pelo menos duas espécies de *Pyricularia*, *P. graminis-tritici* e *P. oryzae* patótipo *Triticum*. Evidência adicional baseada em genômica populacional comparativa que incluiu a análise de sequências de genomas inteiros dos mesmos isolados do patógeno da brusone do trigo analisados por Castroagudin et al. (2016) sugere-se, entretanto, que *P. graminis-tritici* sp. nov. e *P. oryzae* patótipo *Triticum* devem representar uma única espécie, altamente diversa, *P. graminis-tritici*.

Com as descobertas recentes, reconhecer e nomear de forma apropriada o agente causal da brusone do trigo como *P. graminis-tritici*, não somente melhorará nossa compreensão da biologia e epidemiologia da doença, mas também capacitará o estabelecimento de medidas regulatórias quarentenárias adequadas, visando limitar a disseminação deste patógeno para áreas livres da doença onde cultivares suscetíveis de trigo são cultivadas, incluindo Ásia, Europa e América do Norte (MCTAGGART et al., 2016).

A biologia reprodutiva de fungos Ascomicetos, do gênero *Pyricularia*, tem sido exaustivamente estudada usando como modelo a espécie *Pyricularia oryzae* do arroz (TALBOT, 2003). Considerando que *P. oryzae* é considerado auto-incompatível, sua fase sexuada só se forma quando ocorre o cruzamento entre dois indivíduos de tipos sexualmente compatíveis e que sejam férteis. Isso ocorre quando a estrutura receptora, feminina, chamada ascogônio está apta a receber o(s) núcleo(s) do indivíduo compatível, doador, masculino, por meio de conídios ou hifas receptoras (KANG et al., 1994; MOREIRA et al., 2015;). O reconhecimento dos indivíduos sexualmente compatíveis é regulado por genes *mating type*, também denominados de tipos sexualmente compatíveis ou de acasalamento (TURGEON, 1998; MOREIRA et al., 2015). O gene que controla o tipo compatível em *P. oryzae* tem dois idiomorfos, denominados *MAT1-1* e *MAT1-2* (NOTTÉGHEN; SILUÉ, 1992; PEIXOTO, 2014).

O conhecimento sobre a biologia reprodutiva de *P. oryzae* existente na literatura foi gerado, basicamente, com cruzamentos controlados efetuados em laboratório, pois a fase

sexuada do patógeno raramente é encontrada no campo (SALEH et al., 2012). A detecção da distribuição equitativa dos dois tipos compatíveis, e observação de equilíbrio gamético em populações do patógeno, representam uma forma indireta de relacionar se o modo reprodutivo do patógeno, no campo, é essencialmente sexual ou predominantemente clonal (MACIEL et al., 2014). Durante o processo de reprodução sexuada, progênies de ambos “*mating types*” são produzidas em proporções semelhantes (NOTTÉGHM; SILUÉ, 1992; PEIXOTO, 2014). Se a distribuição detectada for equitativa de ambos “*mating types*”, supõe-se que há chances da reprodução sexuada ocorrer em populações de campo.

Diversas pesquisas que avaliaram a distribuição de “*mating types*” de *P. oryzae* confirmaram que a distribuição de frequência dos “*mating types*” é não equitativa na maioria das populações estudadas em diferentes países. Em alguns países foi observado predomínio de *MAT1-1*, como na Argentina (CONSOLO et al., 2005), no Brasil (MACIEL et al., 2014) e na Colômbia (KATO; YAMAGUCHI, 1982); em parte da União Européia (KATO; YAMAGUCHI, 1982; NOTTÉGHM; SILUÉ, 1992); na Costa do Marfim, no Egito, nas Filipinas, na Índia e no Japão (KATO; YAMAGUCHI, 1982; DAYAKAR et al., 2000). Enquanto isso, *MAT1-2* predominou na China, na Indonésia, na Malásia, e na Guiné (KATO; YAMAGUCHI, 1982; YAEHASHI; YAMADA, 1986).

A dispersão do patógeno acompanhando a expansão mundial do cultivo do arroz pode ter levado a fixação de um único “*mating type*” em áreas novas de rizicultura na África, América, Europa e até mesmo na Ásia, impondo um modo assexuado obrigatório de reprodução em populações do patógeno fora do centro de origem asiático (SALEH et al., 2012; PEIXOTO 2014).

Muito pouco se conhece sobre a ecologia de populações de *P. graminis-tritici*. Sabe-se que o patógeno da brusone do trigo pode ser eficientemente disperso a curta e a longa distância por inóculo aéreo, i.e. conídios (URASHIMA et al., 2007) e também por sementes infectadas (GOULART et al., 1995).

Em condições de laboratório, as amostras de *P. graminis-tritici* do trigo tem alta capacidade de cruzamento sexual formando quantidades abundantes de peritécios, ascas e ascósporos (URASHIMA et al., 2005). No entanto, o papel dos ascósporos nas epidemias de brusone do trigo é desconhecido, bem como a importância relativa dos ascósporos, em comparação com esporos assexuais (conídios), para os ciclos de infecção primária (URASHIMA et al., 2005).

Dentro do complexo de espécies do gênero *Pyricularia*, verifica-se uma vasta gama de plantas Poaceae hospedeiras que podem ser fontes de inóculo primário de *P. graminis-tritici*

(URASHIMA et al., 1993). Linhagens de *P. graminis-tritici* provenientes de trigo foram capazes de infectar plantas Poáceas de seis tribos distintas (URASHIMA et al., 1993; REGES et al., 2016). Notavelmente, as linhagens de *P. graminis-tritici* provenientes de plantas de trigo foram capazes de infectar gramíneas das tribos Hordeae, Festuceae, Avenae, Chlorideae, Agrostae e Paniceae. Peritécios maduros com meiosporos viáveis, evidência de cruzamentos férteis, foram produzidos quando as linhagens procedentes de trigo foram cruzadas com as linhagens de *Eleusine coracana* (Chlorideae), *Urochloa plantaginea* (Paniceae), e *Setaria indica* (Paniceae) (URASHIMA et al., 1993). Cruzamentos entre linhagens de *P. graminis-tritici* derivadas de plantas de trigo com linhagens de *P. oryzae* patótipo *Oryza* derivadas do arroz foram estéreis (URASHIMA et al., 1993). Além disso, em "Southern blots" usando sondas tipo retrotransposições MGR (URASHIMA et al., 1999), isolados do *P. graminis-tritici* do trigo apresentaram impressões digitais de DNA (*fingerprinting*) típicas de não patógenos do arroz, com ausência dos elementos MGR-586 (VALENT; CHUMLEY, 1991) e MGR-583 (URASHIMA et al., 1999; FARMAN, 2002). As linhagens de *P. oryzae* patótipo *Oryza*, normalmente têm número elevado de cópias do MGR-586. É mais provável que estes isolados que infectam trigo sejam derivados de patógenos de outras plantas poáceas que de arroz (HAMER, 1991).

Paradoxalmente em relação à *P. graminis-tritici*, *P. oryzae* do arroz, parece ter uma gama de hospedeiros mais restrita. Apesar da situação endêmica da brusone do arroz no Brasil desde 1912 (AVERNA-SACCA, 1912), *P. oryzae* do arroz só infectou cultivar de trigo suscetível sob condição altamente predisponentes, em casa de vegetação (CASTROAGUDIN et al., 2016). Por outro lado *P. graminis-tritici* proveniente do trigo não infecta arroz (URASHIMA et al., 1993; CASTROAGUDIN et al., 2016).

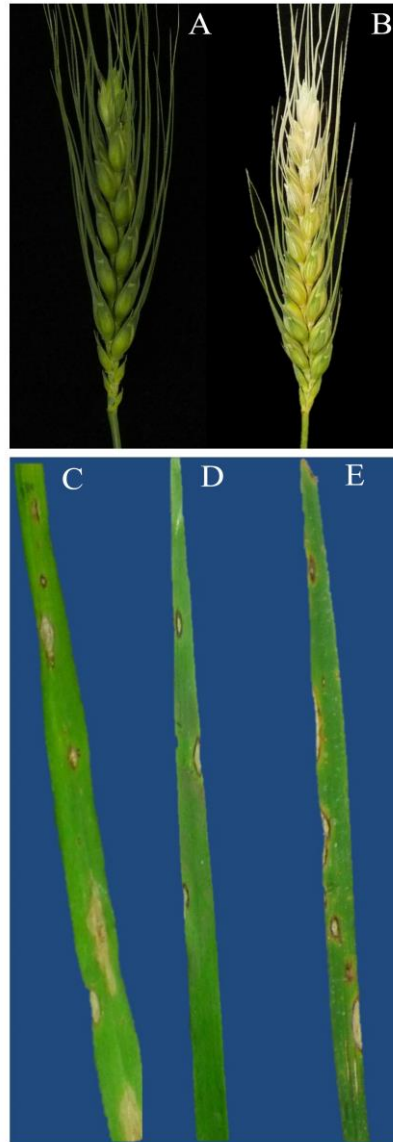
Pyricularia oryzae patótipo *Oryza* é considerado patógeno de alto potencial evolutivo (PRABHU et al., 1992; MEHTA; BAIER, 1998, URASHIMA et al., 2005). O patógeno *P. oryzae*, da brusone do arroz, é altamente variável, como já evidenciado por sua capacidade dinâmica de quebrar a resistência do hospedeiro ou de trocar por espécies hospedeiras novas. A durabilidade média de cultivares de arroz inicialmente resistentes é de dois a três anos (LEUNG et al., 1988) e diversas raças do fungo da brusone já foram relatadas mundialmente (CORREA-VICTORIA; ZEIGLER, 1993; LEVY et al., 1993; YAMADA, 1979; ZEIGLER et al., 1995). No Brasil, 16 raças foram detectadas em variedades de arroz de terras altas do Estado do Tocantins (FILIPPE E PRABHU, 2001) e 22 em áreas de produção de arroz no Estado de São Paulo (URASHIMA, 2002).

O potencial evolutivo de uma população de um patógeno qualquer é um reflexo de sua estrutura genética populacional (MCDONALD; LINDE 2002a). Populações de patógenos com alto potencial evolutivo têm maior probabilidade de vencer a resistência genética do hospedeiro. McDonald e Linde (2002a) propuseram um modelo flexível para se determinar o potencial evolutivo das populações de patógenos com base na análise de sua estrutura genética (MCDONALD; LINDE, 2002a; MCDONALD; LINDE, 2002b). De acordo com esse modelo, os patógenos que apresentam maior risco de quebra de genes de resistência das plantas têm um sistema reprodutivo misto, um elevado potencial para o fluxo gênico, grande tamanho efetivo populacional e alta taxa de mutação. Os patógenos de mais baixo risco são aqueles com reprodução assexuada estrita, baixo potencial de fluxo gênico, pequeno tamanho efetivo de população e baixas taxas de mutação. É plausível que *P. graminis-tritici* do trigo tenha potencial evolutivo semelhante ao descrito para *P. oryzae* patótipo *Oryza* (CERESINI, 2011).

A brusone do trigo foi descrita como doença predominantemente de espigas. Em espigas saudáveis, frequentemente nenhuma descoloração é observada (Figura 1A). Em espigas infectadas, os sintomas envolvem branqueamento parcial ou total (Figura 1B), em função do ponto de necrose inicial provocada pelo fungo na ráquis (IGARASHI, 1988). A predominância de sintomas em espigas e a rara incidência da brusone nas folhas do trigo leva à hipótese de que o inóculo primário do patógeno provém de lesões em outros hospedeiros (DUVEILLER et al., 2010), especialmente em espécies de poáceas cultivadas em larga escala como pastagens dos gêneros *Urochloa* (braquiária) e *Panicum* (REGES et al., 2016).

Em folhas, as lesões têm forma elíptica e alongada, acompanhando as nervuras, com dimensões de 1-2 por 21-25 mm, com coloração central que varia de branco a castanho claro e as bordas castanho-avermelhado (Figura 1C). O tamanho e a intensidade de descoloração da lesão variam com a idade da planta. Na ráquis, a lesão possui formato irregular e elíptico, com coloração mais escura que na folha, variando do castanho-claro ao castanho-escuro (IGARASHI, 1988). Em plantas jovens de trigo o sintomas foliares da brusone são semelhantes aos observados em outros hospedeiros, como em cevada e braquiária (Figura 1 D e E).

Figura 1 - Espiga assintomática não inoculada (A), brusone em espiga de trigo (B) e lesões foliares em trigo cv. Anahuac (C), cevada cv. BRS Korbel (D) e braquiária cv. Piatã (E) inoculadas com *Pyricularia graminis-tritici*.



Fonte : Elaboração do autor.

As lesões na base da espiga são frequentemente elípticas com coloração semelhante às lesões nas folhas. Quando os sintomas ocorrem nas espigas, a lesão na base tem de 1-2 a 3-10 mm de comprimento, podendo causar estrangulamento (IGARASHI, 1988). No ponto de infecção ocorre a interrupção da translocação de água e nutrientes para a espiga, impedindo o pleno enchimento dos grãos, deixando-os chochos. A infecção pode ocorrer em qualquer parte da ráquis, sendo que em ataques severos pode-se observar mais de um ponto de infecção por ráquis (TOLEDO, 2004).

A brusone em espigas de trigo tornou-se uma doença importante, ocasionando perdas entre 40 a 100% na cultura (GOULART; PAIVA 2000, TORRES et al., 2009). Devido à falta de cultivares com altos níveis de resistência genética e de controle químico eficaz para o manejo da brusone, o patógeno tornou-se amplamente distribuído em todas as áreas de cultivo de trigo no Brasil (CASTROAGUDÍN et al., 2015; MACIEL et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ANJOS, J. R. N. D. et al. Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos cerrados do Brasil Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 79-82, 1996.
- AVERNA-SACCA, R. "Brusone" do arroz. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 13a, n. 4, p. 291-302, 1912.
- BAILEY, A. G.; EIJNATTEN, C. V. Corn gray spot caused by *Pyricularia grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 51, n. 2, p. 197- 198, 1961.
- CABRERA, M. G.; GUTIÉRREZ, S.A. **Primer registro de *Pyricularia grisea* en cultivos de trigo del noreste de Argentina. Jornada de actualización en enfermedades de trigo**. Lavallol: Buenos Aires, 2007. v. 60.
- CALLAWAY E. Devastating wheat fungus appears in Asia for first time. **Nature**, New York, v. 532, n.2, p. 421–422, 2016.
- CASTROAGUDÍN, V. L.; MOREIRA, S. I.; PEREIRA, D. A. S.; MOREIRA, S. S.; BRUNNER,P.C., MACIEL J.L.N, CROUS.P.W, MCDONALD.B.A, ALVES E., CERESINI. P. C. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. **Persoonia**, Leiden, v.37, p. 199–216, 2016.
- CERESINI, P. C. **Estrutura genética de populações do patógeno da brusone do trigo *Magnaporthe oryzae* no Brasil**. 2011. 116 f. Tese (Livres docência) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Ilha Solteira.
- CONSOLO, V. F.; CORDO, C. A.; SALERNO, G. L. Mating-type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 160, n.4, p. 285-290, 2005.
- CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast 'hot spot' site. **Plant disease**, St. Paul, v. 77, n.10, p. 1029-1034, 1993.
- COUCH, B. C. et al. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, Bethesda, v. 170, n. 2, p. 613-630, 2005.
- 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**, Lawrence, v. 94, n. 4, p. 683-693, 2002.
- CROLL, D. **The origin of wheat blast in Bangladesh**. [S. l.: s. n], 2016. Disponível em: <<https://github.com/crolllab/wheat-blast>>. Acesso em: 27 jul. 2016.
- DAYAKAR, B. V.; NARAYANAN, N. N.; GNANAMANICKAM, S. S. Cross-compatibility and distribution of mating type alleles of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in India. **Plant Disease**, Saint. Paul, v. 84, n.10, p. 700-704, 2000.

DUVEILLER, E.; HODSON, D.; TIEDMANN, A. Wheat blast caused by *Magnaporthe grisea*: a reality and new challenge for wheat research. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 8., 2010, Saint Petersburg. **Abstracts**. Saint Petersburg; St. Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry, 2010. p. 247-248.

FARMAN, M. L. *Pyricularia grisea* isolates causing gray leaf spot on perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in the United States: Relationship to *P. grisea* isolates from other host plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 3, p. 245-254, 2002.

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n.1, p. 27-35, 2001.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A.; ANDRADE, P. J. M. Relação entre a incidência da brusone em espigas de trigo e a presença de *Pyricularia grisea* nas sementes colhidas. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n.2, p. 184-189, 1995.

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**, Botucatu, v. 26, n.2, p. 279-282, 2000.

GOULART, A. C. P.; AMABILI, R. F.; NASSER, L. C. B.; FREITAS, M. A. Detecção de *Pyricularia grisea* em sementes de cevada produzidas em sistema irrigado por pivô central no Cerrado Brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n.5, p. 565-565, 2003.

HAMER, J. E. Molecular probes for rice blast disease. **Science**, Washington, v. 252, n.5006, p. 632-633, 1991.

IGARASHI, S. et al. *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 11, n.3, p. 351-352, 1986.

IGARASHI, S. Análise da ocorrência de brusone do trigo no Paraná. In: RENAPET – REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 15., Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: CNPT/EMBRAPA, 1988. p.1-19.

ILLANA, A.; RODRIGUEZ-ROMERO, J.; SESMA, A. Major plant pathogens of the *Magnaporthaceae* family. In: HORWITZ, B. A.; MUKHERJEE, P. K.; MUKHERJEE, M.; KUBICEK, C. P. (Ed.). **Genomics of soil- and plant-associated fungi**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. v. 36, p. 45-88.

KANG, S.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. Isolation of the Mating-Type Genes of the Phytopathogenic Fungus *Magnaporthe grisea* Using Genomic Subtraction. **Genetics**, Bethesda, v. 138, n. 2, p. 289-296, 1994.

KATO, H.; YAMAGUCHI, T.; Host ranges and interrelations of *Pyricularia* species from various cereals and grasses. **Proc. Kanto-Tosan Plant Prot. Soc.**, Tsukuba, v. 27, p. 14-15, 1982.

KLAUBAU, F S, THARREAU D, FOURNIER E, GROENEWALD JZ, CROUS PW, VRIES RP, LEBRUN MH. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). **Stud Mycol**, Netherlands, v. 79, n. 1, p. 85-120, 2014.

KOHLI, M. M. et al. Pyricularia blast: a threat to wheat cultivation. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 8. St. Petersburg. **Proceedings...** St. Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry, 2010. p. 273.

LEUNG, H.; BORRAMEO, E. S.; BERNARDO, M. A.; NOTTEGHEM, J. Genetic analysis of virulence in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 1227-1233, 1988.

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

LUO, J.; ZHANG, N. *Magnaporthiopsis*, a new genus in Magnaporthaceae (Ascomycota). **Mycologia**, Lawrence, v. 105, n.4, p. 1019–1029, 2013.

MACIEL, J. L. N.; CERESINI, P. C.; CASTROAGUDIN, V. L.; ZALA, M.; KEMA, G. H. J.; MCDONALD, B. A. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 1, p. 95-107, 2014. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO-11-12-0294-R>>. Acesso em: 08 nov. 2015.

MCTAGGART, A. R.; VANDERNEST, M. A.; STEENKAMP, E. T. Fungal genomics challenges the dogma of name-based biosecurity. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 5, 2016. Doi:10.1371/journal.ppat.1005475.

MADDEN, L. V.; WHEELIS, M. The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 41, n. 1, p. 155-176, 2003.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; JERBA, V. de F.; BORGES, M. de F.; LORENZETTI, E. R. *Brachiaria brizantha*: novo hospedeiro de *Magnaporthe grisea*. **Pasturas tropicales**, Cali, v. 27, n 2, p. 52-54, 2005. Disponível em: <www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf/paturastropicales-2005>. Acesso em: 30 nov. 2015.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002a.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Dordrecht, v. 124, n. 2, p. 163-180, 2002b.

MEHTA, Y. R.; BAIER, A. Variação patogênica entre isolados de *Magnaporthe grisea* atacando triticle e trigo no estado do Paraná. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 24, n. 2, p. 119-125, 1998.

MOREIRA, S. I.; CERESINI, P. C.; ALVES, E. Reprodução Sexuada em *Pyricularia oryzae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 175-182, 2015.

NOTTÉGUEM, J. -L.; SILUÉ, D. Distribution of mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n.4, p. 421-424. 1992.

OU, S. H. Blast. In: OU, S. H. (Ed.). **Rice diseases**. 2. Wallingford: CAB International, 1985. p.109-201.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; CASTRO, N. Pathogenic variation among isolates of *Pyricularia grisea* infecting rice, wheat, and grasses in Brazil. **Tropical Pest Management**, Abingdon, v. 38, n. 4, p. 367-371, 1992.

PRABHU, A. S. et al. Estimativa de danos causados pela brusone na produtividade de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 9, p. 1045-1051, 2003.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Resistência da cultivar no manejo integrado da brusone. In: FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. (Ed.). **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p. 321-387.

PERELLÓ A, ALBERIONE E, ANNONE J, CAMPOS P, CORDO CA, FORMENTO N, GONZÁLEZ M, KRIPELZ N, MELEGARI A, MONTERROSO L, PÉREZ BA, ROMERO AM, SAGADIN M, SISTERNA M, TRUOL G, COPIA P, NOME SF. Enfermidades de *Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*. In: LAGUNA, S. F.; DO CAMPO, D. M.; CONCI, L. R.; PÉREZ, B. A. (Ed.) **Atlas Fitopatológico Argentino**. Córdoba: [s. n.], 2011. v. 4, p. 1851-8974. Disponível em: <<http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante=1045>>. Acesso em: 01 dez. 2015.

PEIXOTO, L. F. **Identificação da compatibilidade, sexualidade, fertilidade e AVR1-CO39 em populações de *Magnaporthe oryzae*, coletadas em lavouras de arroz, no Brasil**. 2014. 75f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitossanidade) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

REGES, J. T. A.; NEGRISOLI, M. M.; DORIGAN, A. F.; CASTROAGUDÍN, V. L.; MACIEL, J. L. N.; CERESINI, P. C. *Pyricularia pennisetigena* and *P. zingibericola* from invasive grasses infect signal grass, barley and wheat. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 2, p. 206-214, 2016.

SALEH, D.; XU, P.; SHEN, Y.; LI, C.; ADREIT, H.; MILAZZO, J. L.; RAVIGNÉ, V.; BAZIN, E.; NOTTÉGUEM, J. -L.; FOURNIER, E.; THARREAU, D. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. **Molecular Ecology**, Malden, v. 21, n. 6, p. 1330-1344, 2012.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: a threat to global food security *Annu. Rev. Phytopathology*, St. Paul, n. 43, p. 83-116, 2005. Doi:10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839.

TALBOT, N. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 177-202, 2003.

TOLEDO, J. F. F de; ALMEIDA, L. A. de; KIIHL, R. A. S.; KASTER, M.; ARIAS, C. A. A.; PÍPOLO, A. E.; CARNEIRO, G. E. de S. Soybean genetic breeding in Brazil. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguassu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soybean, 2004. p. 209-215.

TORRES, G. A. M.; SANTANA, F. M.; FERNANDES, J. M. C.; SILVA, M. **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. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 255.) Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co255.htm> Acesso em: 19 jan. 2016.

TOSA, Y.; CHUMA, I. Classification and parasitic specialization of blast fungi. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 80, n. 3, p. 202-209, 2014.

TURGEON, B. G. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 115-137, 1998.

URASHIMA, A. S.; IGARASHI, S.; KATO, H. Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. **Plant disease**, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1211-1216, 1993.

URASHIMA, A. S. et al. Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homolog of retrotransposon MGR583. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 65, n. 4, p. 429-436, 1999.

URASHIMA, A. S. Variation in virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in São Paulo State. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 109-115, 2002.

URASHIMA, A. S.; GALBIERI, R.; STABILI, A. DNA fingerprinting and sexual characterization revealed two distinct populations of *Magnaporthe grisea* in wheat blast from Brazil. **Czech journal of genetics and plant breeding**, Prague, v. 41, p. 238-245, 2005.

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

URASHIMA, A. S.; BLAST, I. N.; BOCKUS, W. W.; BOWDOWN, R. L.; HUNGER, R. M.; MORRIL, W. L.; MURRAY, T. D.; SMILEY, R. W. Compendium of wheat diseases and pests. 3. ed. **The American Phytopathological Society**: Minnesota, 2010. v. 55, 121 p.

VALENT, B.; CHUMLEY, F. G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 443-467, 1991.

YAMADA, M. Distribution and population change in races of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, in Japan. **Review of plant protection**, Tokyo, v. 12, p. 64-79, 1979.

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

ZEIGLER, R. S.; CUOC, L. X.; SCOTT, R. P.; BERNARDO, M. A.; CHEN, D. H.; VALENT, B.; NELSON, R. J. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 443-451, 1995.

Capítulo 1: *Pyricularia pennisetigena* e *P. zingibericola* de gramíneas invasoras infectam braquiária, cevada e trigo

Artigo da própria autora. Fonte: Pesquisa Agropecuária Tropical.

e-ISSN 1983-4063 - www.agro.ufg.br/pat - Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, v. 46, n. 2, p. 206-214, Apr./Jun. 2016

Pyricularia pennisetigena and *P. zingibericola* from invasive grasses infect signal grass, barley and wheat¹

Juliana Teodora de Assis Reges², Matheus Mereb Negrisoni²,
Adriano Francis Dorigan², Vanina Lilián Castroagudín², João Leodato Nunes Maciel³, Paulo Cezar Ceresini²

ABSTRACT

Fungal species from the *Pyricularia* genus are associated with blast disease in plants from the Poaceae family, causing losses in economically important crops such as rice, oat, rye, barley, wheat and triticale. This study aimed at characterizing the pathogenicity spectrum of *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* to signal grass, barley and wheat, as well as comparing them with those from the species *P. grisea* and *P. oryzae* pathotype *Triticum*, which occur widely in the Brazilian agroecosystem. Twenty isolates of *Pyricularia* spp. were obtained from infected leaf samples of invasive plant species from wheat field. The isolates classification into distinct *Pyricularia* species was done using molecular phylogeny based on actin and calmodulin genes. *Pyricularia pennisetigena* and *P. zingibericola* inoculated on plant leaves, at a concentration adjusted to 10^5 conidia mL⁻¹, were pathogenic to signal grass, barley and wheat, with varying levels of aggressiveness.

KEY-WORDS: *Pyricularia grisea*; *Pyricularia oryzae*; blast disease; invasive plant species; inoculum sources.

RESUMO

Pyricularia pennisetigena e *P. zingibericola* de gramíneas invasoras infectam braquiária, cevada e trigo

Espécies de fungos do gênero *Pyricularia* estão associadas com a doença brusone, em plantas da família Poaceae, causando perdas em culturas de importância econômica como arroz, aveia, centeio, cevada, trigo e triticale. Objetivou-se caracterizar o espectro de patogenicidade de *P. pennisetigena* e *P. zingibericola* em braquiária, cevada e trigo, bem como compará-los com os das espécies *P. grisea* e *P. oryzae* patótipo *Triticum*, de ocorrência generalizada no agroecossistema brasileiro. Foram testados 20 isolados de *Pyricularia* spp. obtidos de amostras de folhas infectadas de plantas invasoras de campos de trigo. A classificação dos isolados em espécies distintas de *Pyricularia* foi efetuada utilizando-se filogenia molecular baseada nos genes actina e calmodulina. *Pyricularia pennisetigena* e *P. zingibericola* inoculados em folhas, à concentração ajustada para 10^5 conídios mL⁻¹, foram patogênicos a braquiária, cevada e trigo, com índices variáveis de agressividade.

PALAVRAS-CHAVE: *Pyricularia grisea*; *Pyricularia oryzae*; brusone; plantas invasoras; fontes de inóculo.

INTRODUCTION

The *Pyricularia* genus includes several pathogenic fungi species that are associated with blast disease in more than 50 Poaceae plants (Ou 1985). Among these species, *Pyricularia oryzae* is the most important pathogen, due to its global distribution on plants from the Poaceae family. The blast disease caused by *P. oryzae* is responsible for severe losses in crops of high economic importance such as rice (*Oryza sativa*), oat (*Avena sativa*), signal grass (*Urochloa* spp.), rye (*Secale cereal*), barley (*Hordeum vulgare*), maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*) (Bailey & Eijnatten 1961, Igarashi et al. 1986, Urashima et al. 1993, Anjos et

al. 1996, Couch & Kohn 2002, Goulart et al. 2003, Couch et al. 2005, Marchi et al. 2005).

The adoption of the *Pyricularia oryzae* designation as the species associated with blast disease is recent. Until the early 2000s, *Pyricularia grisea* was considered the pathogen of blast disease on rice, signal grass, barley and wheat (Urashima et al. 1993, Marchi et al. 2005). A molecular phylogenetic reclassification proposed by Couch & Kohn (2002) showed that *P. grisea* was exclusively associated with blast disease on grasses from the *Digitaria* genus, whereas *P. oryzae* was associated with rice, wheat and other cultivated grasses or invasive plants (e.g. goosegrass). Based on this study, a new international classification became necessary.

1. Manuscript received in May/2016 and accepted for publication in Jun./2016 (<http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632016v4641335>).

2. Universidade Estadual Paulista, Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, Ilha Solteira, SP, Brazil.

E-mail: juliana.teodora@bol.com.br, matheusmnegrisoni@gmail.com, agrofeis@gmail.com, vcastroagudin@agr.feis.unesp.br, paulo.ceresini@bio.feis.unesp.br.

3. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo), Passo Fundo, RS, Brazil. E-mail: joao.nunes-maciel@embrapa.br.

The *P. oryzae* fungus is considered a complex species composed of different subgroups distinguished by their distinct mating types, particular phylogenetic characteristics and restricted host range or pathotypes (Tosa & Chuma 2014). The representative pathotypes of *P. oryzae* and their respective range of hosts described so far are: *Oryza* pathotype, pathogenic to rice (*Oryza sativa*); *Panicum* pathotype, pathogenic to common millet (*Panicum miliaceum*); *Setaria* pathotype, pathogenic to foxtail millet (*Setaria italica*); *Triticum* pathotype, pathogenic to wheat (*Triticum aestivum*); *Avena* pathotype, pathogenic to oat (*Avena sativa*); *Eleusine* pathotype, pathogenic to finger millet (*Eleusine coracana*); and *Lolium* pathotype, pathogenic to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) (Tosa & Chuma 2014).

The *Triticum* pathotype of *P. oryzae* is associated with wheat blast in South America, especially in Brazil (Tosa & Chuma 2014). Since it was first reported in 1985, in the Paraná State (Igarashi et al. 1986, Goulart et al. 2007), blast disease on wheat ears has become a very important disease, causing crop losses of 40-100 % (Goulart & Paiva 2000, Torres et al. 2009). Due to the lack of varieties with high levels of genetic resistance and efficient chemical control to manage the disease, the pathogen has become widely distributed in all wheat growing fields in Brazil (Maciel et al. 2013, Castroagudín et al. 2014). This disease has also been detected in wheat fields in northern Argentina, Bolivia and Paraguay (Duveiller et al. 2010), but it had never been reported outside South America until 2016. Recently, wheat blast disease was considered one of the most important quarantine diseases and a threat to the wheat crop in the USA (Duveiller et al. 2010) and in Bangladesh (Callaway 2016, Malaker et al. 2016).

In the survey of invasive Poaceae species infected with blast disease described in this study, carried out in wheat fields of the Mato Grosso do Sul and Paraná States, during the 2012 and 2013 growing seasons, an association of *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* with several of the grass species sampled, besides *P. grisea* and *P. oryzae*, was detected. Despite the recent report in the Brazilian agroecosystem (Klaubauf et al. 2014), the occurrence of the *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* species could be more common and older than assumed. However, the potential of *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* as pathogens to economically

important Poaceae hosts in the Brazilian agriculture is still unknown.

Therefore, this study aimed at characterizing the pathogenicity spectrum of *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* to signal grass, barley and wheat, as well as comparing them with those from the *P. grisea* and *P. oryzae* species, which occur widely in the Brazilian agroecosystem. The role of invasive plants as possible additional hosts of *P. oryzae* on wheat was also described.

MATERIAL AND METHODS

For the comparative study of the pathogenicity spectrum of *Pyricularia* species, 20 isolates were obtained from leaves or ears of invasive plants sampled from wheat fields in South-Central Brazil (8 isolates of *P. pennisetigena*; 3 isolates of *P. zingibericola*; 5 isolates of *P. oryzae* from invasive plants and 1 from wheat; and 3 isolates of *P. grisea*) (Table 1). The samplings of diseased plants were conducted in wheat fields in the Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG) and Paraná (PR) States and Brasília (DF), between May and August, during the 2012 and 2013 growing seasons (Table 1).

For fungal genomic DNA extraction, the isolates were grown on potato dextrose broth containing streptomycin (0.050 g L⁻¹) and chloramphenicol (0.050 g L⁻¹), and incubated for 7 days at 25 °C, with constant stirring at 75 rpm. The mycelium obtained from each isolate was filtered, frozen at -20 °C and lyophilized for 24 h. The genomic DNA extraction from the fungal mycelium was performed using a Genelute Plant Genomic DNA Mini Kit (Sigma-Aldrich, Brazil), following the manufacturer's instructions.

The *Pyricularia* species sampled were identified based on amplification via polymerase chain reaction (PCR), and sequencing of ACT (part of actin gene) and CAL (part of calmodulin gene) regions was performed according to Klaubauf et al. (2014). The primers used for the PCR reaction were: ACT: ACT-43F: 5'-CGTCTTCCGTAAGTGCCC-3 and ACT-322R: 5'-GCCCATACCAATCATGATAC-3; CAL: CAL-35F: 5'-CTTACCGAAGAGCAAGTTTCCG -3 and CAL-607R: 5'-TYTTCCTGGCCATCATGGTS-3'.

The amplification program used in the Mastercycler Nexus PCR thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) included initial denaturation at 95 °C, for 5 min; followed by 35 cycles at 95 °C,

for 45 s; annealing at 58 °C for the ACT gene and at 55 °C for the CAL gene, for 1 min, with extension at 72 °C, for 1 min; and a final extension at 72 °C, for 8 min. The PCR products were sent for sequencing at the MacroGen Inc. company (Seoul, South Korea), which used the automated PE Applied Biosystems ABI-3730 sequencer. The sequences obtained were analyzed and aligned using the Geneious R 6.7.1 software (Biomatters, New Zealand). The experimental sequences of ACT and CAL genes obtained from the isolates in this study were submitted to the NCBI GenBank (Table 1).

The following DNA sequences were retrieved from the GenBank and used as references to compare with the sequences obtained experimentally: a) for the ACT gene, DQ240877 (*P. grisea*), KJ599796 (*P. oryzae* pathotype *Oryza*, isolated from rice), KM485189 (*P. oryzae* pathotype *Triticum*, isolated from wheat), KM485226 (*P. pennisetigena*) and AB274440 (*P. zingibericola*); b) for the CAL gene, KM485254 (*P. grisea*), AF104986 (*P. oryzae* pathotype *Oryza*, isolated from rice), KM485260

(*P. oryzae* pathotype *Triticum*, isolated from wheat), KM485292 (*P. pennisetigena*) and KM485297 (*P. zingibericola*).

Prior to the phylogenetic analysis, the JModelTest version 2.1.7 software (Darriba et al. 2012) was used to determine the nucleotide substitution model that best fitted the data. The model adopted was K80 + invariable sites. The phylogenetic analysis was performed based on the actin and calmodulin gene sequences aligned and concatenated, based on the maximum likelihood method (ML), using the PhyML algorithm and heuristic searches (Guindon & Gascuel 2003) implemented in the Geneious R 6.7.1 software (Biomatters, New Zealand). The support for the internode branches of the maximum likelihood (ML) tree was tested by bootstrapping the data with 10,000 resamplings.

The isolates of *Pyricularia* spp. were grown on Petri dishes containing oatmeal agar medium and kept under photoperiods of 12 h and at a temperature of 25 °C, for 5 days. Subsequently, 5 mm discs containing mycelium and conidia of *Pyricularia* spp.

Table 1. Isolates and their respective *Pyricularia* species obtained from grass plants invasive to wheat fields in 2012 and 2013, as well as their accession number for the actin (ACT) and calmodulin (CAL) gene sequences deposited at the NCBI GenBank.

Species, isolate	Host	Location	Accession number to the NCBI GenBank	
			ACT	CAL
<i>Pyricularia zingibericola</i> (Pz)				
12.0.149	Signal grass (<i>Urochloa</i> spp.)	Amambai, MS	KX524119	KX524100
12.0.212	Guinea grass (<i>Panicum maximum</i>)	Aral Moreira, MS	KX524120	KX524101
12.0.595i	Weeping finer grass (<i>Chloris distichophylla</i>)	Londrina, PR	KX524121	KX524102
<i>Pyricularia grisea</i> (Pg)				
12.0.264	Crabgrass (<i>Digitaria sanguinalis</i>)	Aral Moreira, MS	KX524130	KX524111
13.0.002i	<i>D. sanguinalis</i>	Londrina, PR	KX524129	KX524110
13.0.020i	<i>Urochloa</i> spp.	Londrina, PR	KX524131	KX524112
<i>Pyricularia oryzae</i> pathotype <i>Triticum</i> (Po-it) from invasive Poaceae and wheat				
12.0.222	<i>P. maximum</i>	Aral Moreira, MS	KX524118	KX524099
13.0.033i	Star grass (<i>Cynodon</i> spp.)	Londrina, PR	KX524113	KX524094
13.0.017i	Wire grass (<i>Elionurus candidus</i>)	Londrina, PR	KX524114	KX524095
13.0.029i	Natal grass (<i>Rhynchelytrum repens</i>)	Londrina, PR	KX524117	KX524098
12.0.006	Undefined Poaceae species	Brasília, DF	KX524115	KX524096
12.1.005	<i>Triticum aestivum</i>	Patrocínio, MG	KX524116	KX524097
<i>Pyricularia pennisetigena</i> (Pp)				
12.0.002i	<i>Urochloa</i> spp.	Londrina, PR	KX524128	KX524109
12.0.100	Southern sandbur (<i>Cenchrus echinatus</i>)	Amambai, MS	KU963214	KU963216
12.0.324	<i>C. echinatus</i>	Aral Moreira, MS	KX524127	KX524108
12.0.402	<i>C. echinatus</i>	Aral Moreira, MS	KX524125	KX524106
13.0.012i	<i>C. echinatus</i>	Londrina, PR	KX524123	KX524104
13.0.024i	<i>C. echinatus</i>	Londrina, PR	KX524122	KX524103
13.0.001i	<i>C. echinatus</i>	Londrina, PR	KX524124	KX524105
12.0.358	<i>P. maximum</i>	Aral Moreira, MS	KX524126	KX524107

were transferred to ten other Petri dishes with oatmeal agar medium, aiming at the production of fungal inoculum. The fungal colonies were kept for 15 days under the same incubation conditions (Maciel et al. 2013).

For inoculum preparation, the mycelium was scraped with the help of a sterile spatula and the fungal colonies were washed with distilled water plus the spreader-sticker Tween 80 (2 drops L⁻¹). The concentration of conidial suspensions was determined in a Neubauer chamber, adjusting it to 10⁵ conidia mL⁻¹ for inoculation (Maciel et al. 2013). The conidial suspension volume for the inoculation of young plants was 50 mL, for a total of 15 pots (five for each host).

The pathogenicity spectrum of *Pyricularia* spp. isolates was determined by the inoculation on signal grass (*U. brizantha*) cv. Piatã, barley (*H. vulgare*) cv. BRS Korbel and wheat (*T. aestivum*) cv. Anahuac 75. These plants were sown in two seasons under screenhouse conditions, firstly on June 8 and secondly on June 18, in 2015. About 10 to 12 seeds were sown in 300 mL plastic pots containing Tropstrato HT Hortaliças plant substrate (Vida Verde, Campinas, SP). Prior to the inoculation, the plants were kept in a screenhouse at temperatures ranging 25-30 °C, with a 12 h regimen of light and daily irrigation. A fertilization (2.6 g pot⁻¹) with the N-P-K formula (10-10-10) was performed 10 days after sowing.

Two weeks after emergence, when the plants tested were at the phenological stage of four leaves, thinning was performed, so that only six plants per pot were left. Each experimental plot consisted of one pot with six plants, totaling 30 plants per host. The inoculation was performed subsequently. With the assistance of an air pressure pump spray, the conidial suspension was sprayed onto each plant, until the leaf surface (adaxial and abaxial) was completely wet. After inoculation, the plants were incubated for 24 h in the dark, in a phytotron chamber, at a temperature of 24 °C, under nebulization. The experimental plots were then transferred to an acclimatized greenhouse with automatic control of air temperature (25 °C) and relative humidity (90 %), and with 12 h of natural sunlight. The pots were irrigated daily.

The experimental design adopted for the three host species tested was completely randomized, with five replicates. For each host species, the

experimental treatments were represented by 20 isolates and one check (negative control). This experiment was replicated once and conducted in two seasons.

The plants were assessed 7 days after inoculation. Five leaves with blast symptoms per pot were photographed using an Alpha 5000 Sony digital camera, with 16-50 mm interchangeable lens, attached to a monopod, at a fixed distance of 20 cm. The pathogenicity spectrum of the isolates and the levels of aggressiveness were determined based on the percentage of infected leaf area of plants with the symptoms of leaf blast. The infected leaf area was determined using the Assess Image Analysis Software for Plant Disease Quantification version 2.0 of the American Phytopathological Society (Lamari, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada).

Analysis of variance was performed using the SAS software version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, US). The PROC MIXED procedure was used to analyze the treatment effect, and the Scott-Knott test ($p < 0.05$) was used for comparison between the groups of isolates.

RESULTS AND DISCUSSION

In general, this study resulted in the phylogenetic identification and in the elucidation of the pathogenicity spectrum of *P. pennisetigena* and *P. zingibericola*, identified by surveying fungi associated with blast disease in invasive plants from wheat fields in Southern Brazil.

New taxonomic alterations have been recently proposed, such as the definition of the new Pyriculariaceae family, designation of new genera, introduction of new species and the allocation of species previously described in the *Magnaporthe* genus to the *Pyricularia* genus. The *Magnaporthe* genus, previously used to designate the sexual phases of *P. grisea* and *P. oryzae* (i.e. *M. grisea* and *M. oryzae*), has been less used. Furthermore, there was the inclusion of new species of *Pyricularia* previously not described as pathogens of Poaceae, such as *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* (Klaubauf et al. 2014).

In the phylogenetic analysis, branch I, with 99.9 bootstrap support, grouped the isolates of *Pyricularia oryzae* obtained from invasive plants [13.0.033i (from *Cynodon* spp.), 13.0.017i (from

Elionurus candidus), 12.0.029i (from *Rhynchelytrum repens*), 12.0.006 (from undefined Poaceae) and the isolate 12.0.222 (from *Panicum maximum*), the isolate of *P. oryzae* from wheat (12.1.005) and two other isolates of *P. oryzae*, whose sequences were retrieved from the GenBank, with one being isolated from wheat (*Triticum* pathotype) and the other from rice (*Oryza* pathotype).

In fact, the latest study elucidating the phylogenetic relationship between several *Pyricularia* species has indicated that isolates obtained from rice and wheat were grouped into the clade *P. oryzae* (Klaubauf et al. 2014). These isolates, although specific to those hosts, potentially have a common evolutionary origin (Tosa & Chuma 2014). Our observations indicated that *P. oryzae* pathotype *Triticum* could also be associated with other Poaceae plant species invasive to wheat fields (Figure 1).

Branch II, with 88.1 bootstrap support, grouped the isolates of *P. zingibericola* obtained from invasive plants [12.0.149 (from *Urochloa* spp.), 12.0.212 (from *Panicum maximum*) and 12.0.595i (from *Chloris distichophylla*)] and the isolate

P. zingibericola, whose sequences were obtained from the GenBank. Only *Zingiber officinale* had been reported as a host of *P. zingibericola*, in the Réunion Island (Klaubauf et al. 2014), and, so far, there have been no reports of this pathogen infecting invasive plant species in Brazil.

Branch III, with 100.0 bootstrap support, grouped the isolates of *P. pennisetigena* (13.0.024i; 13.0.012i; 13.0.001i; 12.0.402; 12.0.358; 12.0.324; 12.0.002i; 12.0.100) and the isolate whose DNA sequences were obtained from the GenBank. The *P. pennisetigena* group was found in the invasive plant species *Urochloa* spp., *Cenchrus echinatus* and *Panicum maximum*. The Poaceae *C. echinatus* had already been described by Klaubauf et al. (2014) as a host of *P. pennisetigena*, as well as *C. ciliaris*, *Echinochloa colona* and pearl millet (*Pennisetum glaucum*).

Branch IV grouped the species *P. grisea*, which included the isolates 13.0.002i, 12.0.264 (from *D. sanguinalis*) and 13.0.020i (from *Urochloa* spp.), with 100.0 bootstrap support, all presenting identical sequences.

Significant differences were detected among *Pyricularia* species according to the blast severity observed in signal grass cv. Piatã (Table 2; Figure 2).

Pyricularia zingibericola was the most aggressive species to signal grass (Figure 3A), causing, on average, 24.1 % of infected leaf area. Among the other species, in decreasing order of aggressiveness, *P. oryzae* from invasive plants and wheat caused an average of 14.8 % disease severity, differing from *P. grisea* (8.8 %) and *P. pennisetigena* (5.2 % of infected leaf area).

One of the factors that could explain the higher aggressiveness of *P. zingibericola* to signal grass is the origin of a few isolates that came from this same host, thereby explaining its better adaptability to this plant species.

All four species of *Pyricularia* tested were pathogenic to barley cv. BRS Korbel (Figures 2B and 3B; Table 2), but *P. zingibericola* was the most aggressive one (mean of 18.7 % of diseased leaf area). There was no significant difference among the groups of isolates from *P. pennisetigena*, *P. grisea* and *P. oryzae*, regarding the disease severity on young barley plants, with an average leaf blast severity corresponding to 12.6 %, 12.0 % and 11.4 %, respectively. Indeed, innumerable barley cultivars have been considered susceptible to pathogens of the *Pyricularia* genus, especially *P. oryzae* (Marangoni et

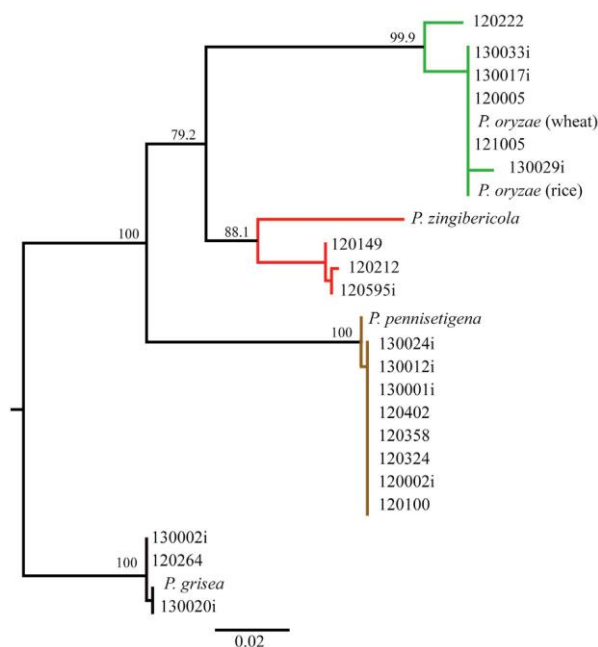


Figure 1. Reconstruction of the phylogenetic relationship among four species of the *Pyricularia* genus, based on sequences of the actin (ACT) and calmodulin (CAL) genes concatenated. Maximum likelihood (ML) implemented in the PhyML algorithm was used. The internode support for the branches was tested by 10,000 bootstrap resamplings of the data.

al. 2013). However, there is variation in the level of blast resistance among genotypes, with some having high levels of resistance to *P. oryzae* (Marangoni et al. 2013).

For wheat cv. Anahuac 75, *P. pennisetigena* was the most aggressive species to young plants, with an average of 26.6 % of diseased leaf area. On the other hand, the group of *P. oryzae* and *P. zingibericola* caused similar damage, with an average disease severity of 20.0 % and 18.3 % of infected leaf area, respectively. *Pyricularia grisea* was not pathogenic to wheat cv. Anahuac 75 (Figures 2 and 3C; Table 2).

Possibly, this is the first report suggesting that *P. pennisetigena* and *P. zingibericola* may cause leaf blast on signal grass, barley and wheat. However, from an evolutionary point of view, it is unknown how recent the adaptation of the two *Pyricularia* species to these distinct hosts is. Yet, from an ecological point of view, it is still unknown the relative importance of *P. pennisetigena* and *P. zingibericola*, in relation to the other species associated with blast disease already described for signal grass, barley and wheat, in the Brazilian agroecosystem.

Finally, this study has also shown that the *P. oryzae* pathotype *Triticum* has a host range wider than wheat, barley, rye and oat (Igarashi et al. 1986, Urashima et al. 1993, Anjos et al. 1996, Goulart et al. 2003).

In particular, considering the host range of the *P. oryzae* pathotype *Triticum*, it is possible to highlight the importance of invasive plants to wheat fields as an initial inoculum source of wheat pathogens, thereby confirming the observations by Urashima et al. (1993). Although ear infection is the most destructive form of wheat blast disease (Goulart & Paiva 2000, Torres et al. 2009), little is known about the origins of the initial inoculum source. It is plausible that the initial inoculum of the pathogen produced in the leaves of invasive grasses has an important epidemiological role in the incidence of wheat blast on ears.

Among the invasive plant species, whether native or not, *Urochloa* spp., *Panicum* spp. and *Cynodon* spp. stood out as important additional hosts, due to their wide geographical distribution as cultivated forages in Brazil (Zimmer et al. 2012). *Urochloa* spp., the most cultivated forage in Brazil, was the host of *P. grisea*, *P. pennisetigena* and *P. zingibericola*, and presented high susceptibility to the *P. oryzae* pathotype *Triticum*. Therefore, extensive grass pasture fields cultivated with plants of the *Urochloa* genus, especially in the Brazilian Savannah, would represent a potential permanent source of initial inoculum between the wheat growing seasons, thereby keeping the inoculum of the *P. oryzae* pathotype *Triticum* active.

Table 2. Variance analysis table for testing the effects of the experiment, species and pathogen isolates on the aggressiveness of *Pyricularia* spp. to signal grass, barley and wheat.

Host	Source of variation	df	SQ	F	p
<i>U. brizantha</i> cv. Piatã	Experiment	1	163.06	2.87	0.0920**
	Isolate (pathogen species)	16	601.04	10.57	< 0.001***
	Experiment * species	4	45.41	0.80	0.5274**
	Error	184	56.85		
	Species	4	2,514.65	4.18	0.0166*
	Error for the species factor	16	601.04		
Barley cv. BRS Korbel	Experiment	1	166.35	3.18	0.0764**
	Isolate (pathogen species)	16	218.61	4.17	< 0.001***
	Experiment * species	4	75.27	1.44	0.2235**
	Error	184	52.38		
	Species	4	694.46	3.18	0.0423*
	Error for the species factor	16	218.61		
Wheat cv. Anahuac 75	Experiment	1	30.15	0.37	0.5435**
	Isolate (pathogen species)	16	233.43	2.87	< 0.001***
	Experiment * species	4	137.38	1.69	0.1546**
	Error	184	81.40		
	Species	4	4,761.41	20.40	< 0.001***
	Error for the species factor	16	233.43		

***, * and ** Significant at $p \leq 0.001$, $p \leq 0.05$ and non-significant, respectively, by the F test.

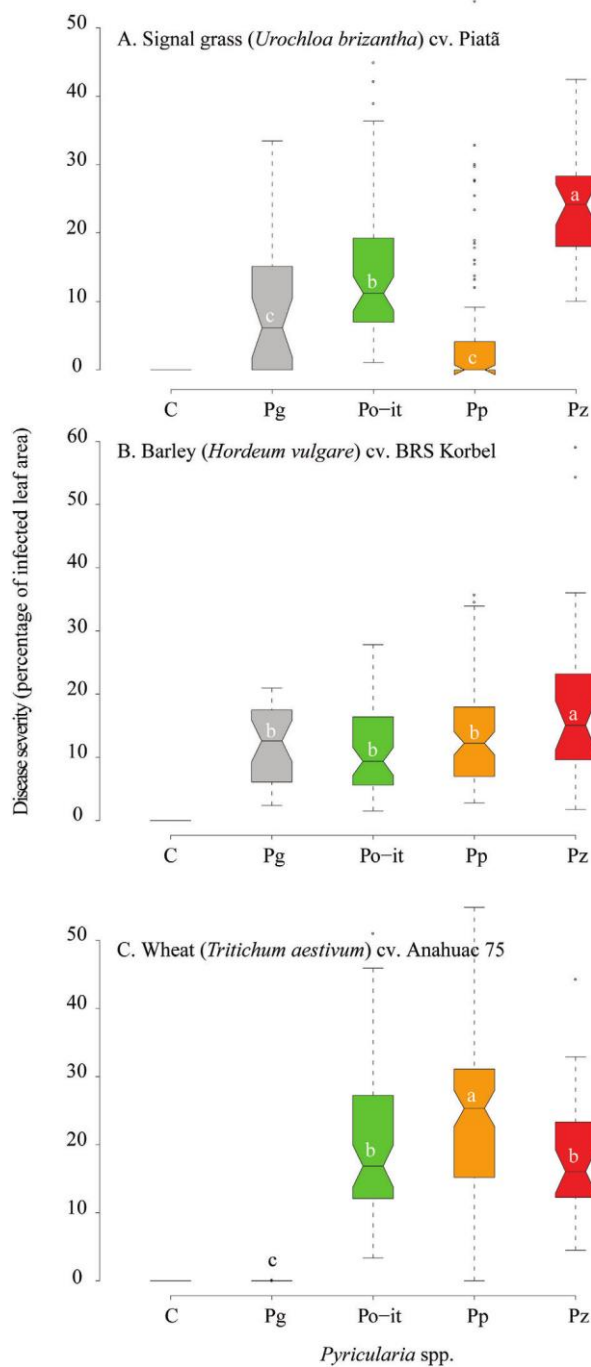


Figure 2. Boxplots representing the pathogenicity of *Pyricularia* species to signal grass (A), barley (B) and wheat (C). Pg = *Pyricularia grisea* (n = 3); Po-it = *Pyricularia oryzae* pathotype *Triticum* (n = 6); Pp = *Pyricularia pennisetigena* (n = 8); Pz = *Pyricularia zingibericola* (n = 3); C (control), with n = number of isolates per species. Each boxplot represents the mean of ten repetitions, combining the two replicas of the experiment. Means followed by the same letter do not differ from each other ($p < 0.05$), by the Scott-Knott test.

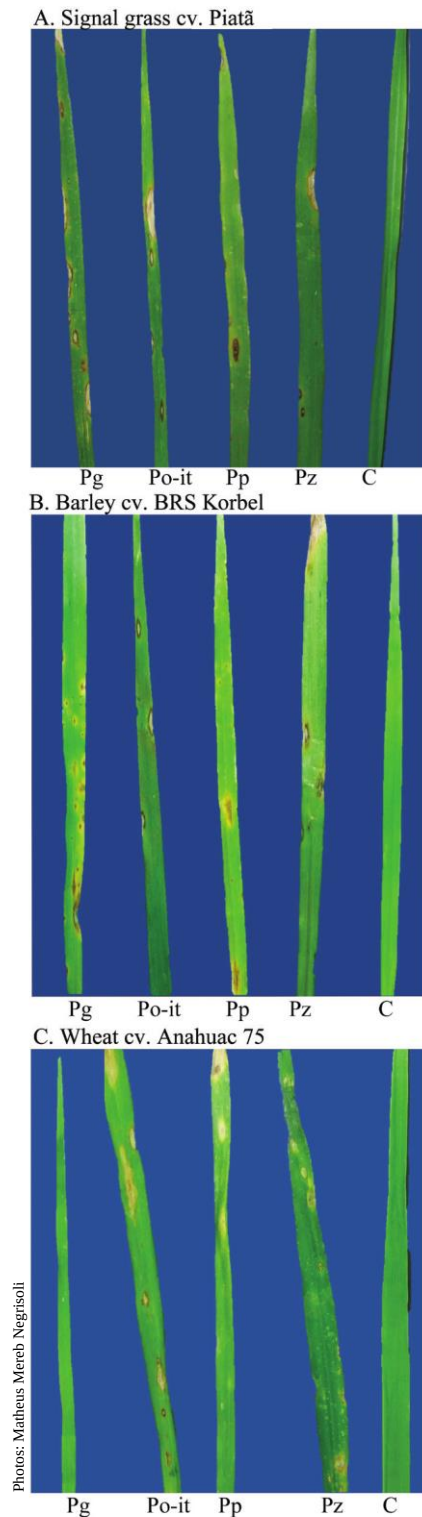


Figure 3. Photographs of leaf blast symptoms caused by different species of *Pyricularia* on the leaves of signal grass cv. Piatã (A), barley cv. BRS Korbel (B) and wheat cv. Anahuac 75 (C). Pg = *P. grisea*; Po-it = *P. oryzae* pathotype *Triticum*; Pp = *P. pennisetigena*; Pz = *P. zingibericola*; C = control.

CONCLUSIONS

1. *Pyricularia zingibericola* and *P. pennisetigena* are pathogenic to signal grass, barley and wheat, with varying levels of aggressiveness between the species. *Pyricularia zingibericola* is the most aggressive species to signal grass and barley.
2. For young wheat plants, *P. pennisetigena* is the most aggressive species, followed by the *P. oryzae* pathotype *Triticum*. On the other hand, *P. grisea* from *D. sanguinalis* or from *Urochloa* spp. do not infect wheat.
3. The phylogenetic analysis of the concatenated ACT and CAL regions sustains the genetic differences among *Pyricularia zingibericola*, *P. pennisetigena*, the *P. oryzae* pathotype *Triticum* and *P. grisea*.
4. *Urochloa* spp. represents a permanent source of initial inoculum of the *P. oryzae* pathotype *Triticum* between wheat growing seasons.

ACKNOWLEDGMENTS

The first author is grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), for the PhD studentship granted. This study was funded by a research grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), to P. C. Ceresini (2013/10655-4 and 2015/10453-8); a research grant from the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)/ Monsanto (Macroprograma II), to J. L. N. Maciel; and by scholarships (307361/2012-8 and 307295/2015-0) and a grant (454543/2013-1) from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), to P. C. Ceresini. V. L. Castroagudín received postdoctoral scholarships from CNPq (PDJ 150490/2013-5, from 2012 to 2014) and FAPESP/Capes (PDJ 2014/25904-2, from 2015 to 2016). We thank the Embrapa Trigo and Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), for providing the seeds that were used in all the experiments.

REFERENCES

- ANJOS, J. R. N. D. et al. Ocorrência de brusone (*Pyricularia grisea*) em trigo e centeio na região dos Cerrados do Brasil Central. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 31, n. 1, p. 79-82, 1996.
- BAILEY, A. G.; EIJNATTEN, C. V. Corn gray spot caused by *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*, v. 51, n. 2, p. 197-198, 1961.
- CALLAWAY, E. Devastating wheat fungus appears in Asia for first time. *Nature*, v. 532, n. 2, p. 421-422, 2016.
- CASTROAGUDÍN, V. L. et al. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology*, v. 105, n. 3, p. 284-294, 2014.
- COUCH, B. C. et al. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics*, v. 170, n. 2, p. 613-630, 2005.
- 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*, v. 94, n. 4, p. 683-693, 2002.
- DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- DUEVILLER, E. et al. Wheat blast caused by *Magnaporthe grisea*: a reality and new challenge for wheat research. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 8., 2010, Saint Petersburg. *Abstracts*. Saint Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry, 2010. p. 247-248.
- GOULART, A. C. P. et al. Detecção de *Pyricularia grisea* em sementes de cevada produzidas em sistema irrigado por pivô central no Cerrado brasileiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 5, p. 565-565, 2003.
- 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*, v. 26, n. 2, p. 279-282, 2000.
- GOULART, A. C. P. et al. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. *Summa Phytopathologica*, v. 33, n. 4, p. 358-363, 2007.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.
- IGARASHI, S. et al. *Pyricularia* em trigo: 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, n. 3, p. 351-352 1986.
- KLAUBAU, S. et al. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). *Studies in Mycology*, v. 79, n. 1, p. 85-120, 2014.
- 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*, v. 104, n. 1, p. 95-107, 2013.

- MALAKER, P. K. et al. Occurrence of wheat blast in Bangladesh. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON WHEAT BLAST, 2., 2016, Florianópolis. *Anais...* Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2016. p. 128.
- MARANGONI, M. S. et al. *Pyricularia* blast on white oats: a new threat to wheat cultivation. *Tropical Plant Pathology*, v. 38, n. 3, p. 198-202, 2013.
- MARCHI, C. E. et al. *Brachiaria brizantha*: new host of *Magnaporthe grisea*. *Pasturas Tropicais*, v. 27, n. 2, p. 52-54, 2005.
- OU, S. H. *Rice diseases*. 2. ed. Wallingford: CAB International, 1985.
- 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.
- TOSA, Y.; CHUMA, I. Classification and parasitic specialization of blast fungi. *Journal of General Plant Pathology*, v. 80, n. 3, p. 202-209, 2014.
- URASHIMA, A. S. et al. Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. *Plant Disease*, v. 77, n. 12, p. 1211-1216, 1993.
- ZIMMER, A. H. et al. *Degradação, recuperação e renovação de pastagens*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2012.

Capítulo 2: Estrutura genética de populações contemporâneas do patógeno da brusone do trigo (*Pyricularia graminis-tritici* sp. nov.) no centro-sul do Brasil

RESUMO

Foi estudada a estrutura genética de populações do patógeno da brusone do trigo no centro-sul do Brasil, causada pelo fungo Ascomiceto *Pyricularia graminis-tritici* sp. nov. O principal objetivo desse estudo foi responder às seguintes perguntas: As populações geograficamente distintas de *P. graminis-tritici* do trigo eram geneticamente subdivididas? Como se distribuía a diversidade gênica e genotípica entre as populações regionais de *P. graminis-tritici*, cerca de 30 anos após as primeiras epidemias de brusone no Brasil? Qual o sistema reprodutivo predominante de *P. graminis-tritici* no país? Para abordar estas questões, foram determinados os padrões contemporâneos de fluxo gênico, a diversidade genética das populações, o equilíbrio gamético e a distribuição de idiomorfos dos tipos de acasalamento (*mating types* *MAT1-1* e *MAT1-2*). Conclui-se que não há subdivisão na maioria das populações geográficas contemporâneas de *P. graminis-tritici*, em trigo, indicando mecanismo eficiente de fluxo gênico. A magnitude e a extensão do fluxo gênico entre populações geográficas de *P. graminis-tritici* do trigo, o sistema reprodutivo predominantemente sexual, aliados a alta diversidade genética do fungo, indicam um patógeno com alto potencial evolutivo no agroecossistema brasileiro. Os padrões de fluxo gênico e genotípico entre populações hospedeiro distintas do patógeno reforçam a hipótese de que a brusone do trigo pode ter tido origem a partir de populações endêmicas de *P. graminis-tritici* que infectam outras espécies de poáceas (nativas ou invasoras de áreas de trigo) no país. Outras espécies de poáceas hospedeiras com ampla distribuição geográfica no Brasil, como por exemplo, o capim-braquiária (*Urochloa brizantha*), podem ter importante papel no ciclo de vida e na biologia reprodutiva, na sobrevivência e na dispersão do inóculo de *P. graminis-tritici* a curta e longa distâncias, mantendo as populações geográficas do patógeno conectadas.

Palavras-chave: Fluxo gênico. *Mating types*. Genótipos. Poáceas. *Triticum aestivum*.

Chapter 2: Genetic structure of contemporary populations of the wheat blast pathogen (*Pyricularia graminis-tritici* sp. nov.) from central-southern Brazil

ABSTRACT

We studied the population genetic structure of the wheat blast pathogen in South-Central Brazil, caused by the ascomyceteous fungus *Pyricularia graminis-tritici* sp. nov. The main objective of this study was to answer the following questions: The geographically distinct populations of *P. graminis-tritici* from wheat were genetically subdivided? How was gene and genotypic diversity distributed among regional populations of *P. graminis-tritici* about 30 years after the first outbreaks of wheat blast in Brazil? What was the predominant reproductive system of *P. graminis-tritici* in the country? To address these questions, we determined the contemporary patterns of gene flow, the genetic diversity of populations, the gametic equilibrium and the distribution of idiomorphs of *mating types* (*mating types* MAT1-1 and MAT1-2). We concluded that there was no subdivision among most of the contemporary geographical populations *Pyricularia graminis-tritici* from wheat, indicating efficient mechanism of gene flow. The magnitude and extent of gene flow among geographic populations of *P. graminis-tritici* from wheat, the predominantly sexual reproductive system, coupled with high genetic diversity of the fungus, indicated a pathogen with high evolutionary potential in the Brazilian agro-ecosystem. The patterns of gene and genotypic flow between different host pathogen populations reinforce the hypothesis that the wheat blast may have originated from endemic populations of *P. graminis-tritici* infecting other species poaceae (native or invasive areas of wheat) in the country. Other poaceae species hosts with wide geographic distribution in Brazil, for example, signal grass (*Urochloa brizantha*) can play an important role in the life cycle and reproductive biology, survival and spread of inoculum of *P. graminis-tritici* at short and long distances, keeping the geographical populations of the pathogen connected.

Keywords: Gene flow. Mating types. Genotypes. Poáceae. *Triticum aestivum*.

1 INTRODUÇÃO

Linhagens divergentes de parasitas podem emergir por adaptações ecológicas (COUCH et al., 2005; HUYSE et al. 2005). Para fungos parasitas de plantas, essas adaptações ecológicas incluem troca de hospedeiro ou alterações na patogenicidade (COUCH et al., 2005). Detectar os efeitos das adaptações ecológicas sobre a divergência populacional requer comparações entre populações com ancestralidade comum recente e sob condições contrastantes. Eventos de adaptação ecológica podem resultar na emergência de espécies de fungos hospedeiro-especializadas a partir de populações selvagens ancestrais. Exemplos de especiação ocorridos após especialização a hospedeiro são comuns em agroecossistemas onde se cultiva cereais, e foram descritos para diversas espécies de fungos fitopatogênicos como *Pyricularia oryzae* (COUCH; KOHN, 2002; COUCH et al., 2005), *Mycosphaerella graminicola* (STUKENBROCK et al 2007), *Rhynchosporium secalis* (ZAFFARANO et al., 2008), *Ceratocystis fimbriata* (BAKER et al., 2003), *Microbotryum violaceum* (BUCHELI et al., 2000) e *Rhizoctonia solani* (CERESINI et al., 2007; BERNARDES de ASSIS et al., 2008).

Dentre as espécies de *Pyricularia*, o fungo *Pyricularia oryzae*, em particular, tem importância mundial como patógeno da brusone do arroz (OU,1985; PRABHU et al., 2003). Já a nova espécie *Pyricularia graminis-tritici* emergiu, no último século, como patógeno da brusone em espigas de trigo no Sul do Brasil (IGARASHI et al., 1986). Até junho de 2016, o patógeno da brusone do trigo era denominado de *Pyricularia oryzae* patótipo *Triticum*. Proposta filogenética adotada em 2016, complementada com dados de genômica populacional, indicou que o patógeno da brusone do trigo é a espécie *P. graminis-tritici* sp. nov. (CASTROAGUDIN et al., 2016; CROLL, 2016).

Desde sua descoberta em 1985 no Estado do Paraná (IGARASHI et al., 1986; GOULARD et al., 2007), a brusone em espigas de trigo tornou-se uma doença importante, ocasionando perdas entre 40 e 100% na cultura (GOULARD et al., 2000; TORRES et al., 2009). Devido à falta de cultivares com altos níveis de resistência genética e de controle químico eficaz para o manejo da brusone, o patógeno tornou-se amplamente distribuído em todas as áreas de cultivo de trigo no Brasil (CASTROAGUDIN et al., 2014; MACIEL et al., 2014). A doença foi, também, detectada em campos de trigo no Norte da Argentina, na Bolívia e no Paraguai (DUVEILLER et al., 2010), mas nunca havia sido relatada fora da América do Sul. Recentemente, a brusone do trigo foi considerada uma das principais doenças quarentenárias e uma ameaça à cultura de trigo nos EUA (DUVEILLER et al., 2010) e em Bangladesh, no Sudeste da Ásia (CALLAWAY, 2016; CROLL, 2016; MALAKER et al., 2016).

Para populações de *P. oryzae* do arroz, além do cenário co-evolutivo de acompanhamento do hospedeiro (STUKENBROCK; MCDONALD, 2008), há evidências de que linhagens que infectavam arroz emergiram por adaptação ecológica [via troca de hospedeiro, de milheto (*Setaria* sp.) para arroz] durante o período de domesticação das duas culturas na China, a cerca de 7.000 AC. A proximidade entre plantas cultivadas e suas invasoras pode facilitar a troca ou o salto de hospedeiros por patógenos associados com uma ou outra das espécies (STUKENBROCK; MCDONALD, 2008). Propoz-se que processo semelhante foi responsável pela emergência da brusone do trigo no Brasil, ainda que se desconheça, até então, o hospedeiro original de *P. graminis-tritici* adaptado ao trigo (CERESINI, 2011).

Um estudo com o objetivo de determinar se a emergência da brusone do trigo ocorreu por adaptação ecológica deve considerar o potencial evolutivo de *P. graminis-tritici* para adaptação ecológica e, conseqüentemente, para troca ou salto de hospedeiros, bem como a suscetibilidade dos “novos” hospedeiros (COUCH et al., 2005). Deste modo o conhecimento sobre o potencial evolutivo de um fungo fitopatogênico permitiria prever os padrões de mudança evolutiva e de dispersão destes patógenos para novos agroecossistemas geograficamente contíguos ou descontínuos (COUCH et al., 2005).

Conhecer o potencial evolutivo de populações de *P. graminis-tritici* do trigo é também imprescindível para se prever a durabilidade da resistência genética à brusone (MACIEL et al., 2014). A busca por resistência à brusone tem sido intensa desde o primeiro relato da doença no final da década de 80, porém seus resultados são considerados erráticos e inconsistentes (GOULART; PAIVA, 1992; GOULART et al., 1995; CRUZ et al., 2010). Cultivares de trigo aparentemente resistentes se comportam como suscetíveis em outras regiões do país, indicando interação entre cultivar e ambiente (URASHIMA et al., 2004). Considerando que *P. graminis-tritici* está presente em todos os agroecossistemas tritícolas brasileiros (DUVEILLER et al., 2010; MACIEL et al., 2014), é provável que tanto a incidência quanto a severidade da brusone sejam dependentes da variante do fungo predominante naquele agroecossistema. Esta interação tripla entre hospedeiro, variante do patógeno e ambiente é indício de variabilidade genético-fenotípica em *P. graminis-tritici*. De fato, Maciel et al. (2014) detectaram tanto resistência completa quanto parcial ao patógeno da brusone do trigo em sete cultivares brasileiros de trigo e entre oito a quatorze grupos de virulência. Esse cenário de alta variabilidade genético-fenotípica no patógeno provavelmente resultaria em baixa durabilidade da resistência de cultivares de trigo à brusone no país.

O potencial evolutivo de uma população de um patógeno qualquer é um reflexo de sua estrutura genética populacional. Populações de patógenos com alto potencial evolutivo têm

maior probabilidade de vencer a resistência genética do hospedeiro. Há proposta de um modelo flexível para se determinar o potencial evolutivo das populações de patógenos com base na análise de sua estrutura genética de populações (MCDONALD; LINDE 2002a; MCDONALD; LINDE 2002b). De acordo com este modelo, os patógenos que apresentam maior risco de quebra de genes de resistência das plantas têm um sistema reprodutivo misto, um elevado potencial para o fluxo gênico, grande tamanho efetivo populacional e alta taxa de mutação. Os patógenos de mais baixo risco são aqueles com reprodução assexuada estrita, baixo potencial de fluxo gênico, pequeno tamanho efetivo de população e baixas taxas de mutação. Observações sobre a biologia de populações de *P. graminis-tritici* feitas tanto nas últimas décadas (MEHTA; BAIER, 1998) assim como recentemente (CERESINI, 2011; MACIEL et al., 2014) sugerem que este patógeno tem um alto potencial evolutivo.

De forma bastante peculiar dentro do complexo de espécies de *Pyricularia*, *P. graminis-tritici* do trigo apresenta uma vasta gama de plantas Poaceae hospedeiras que podem ser fonte de inóculo primário do patógeno (URASHIMA et al., 1993; REGES et al., 2016). Linhagens de *P. graminis-tritici* provenientes de trigo foram capazes de infectar plantas poáceas de seis tribos distintas (URASHIMA et al., 1993; REGES et al., 2016). Paradoxalmente em relação a *P. graminis-tritici*, *P. oryzae* do arroz parece ter uma gama de hospedeiros mais restrita. Apesar da situação endêmica da brusone do arroz no Brasil desde 1912 (AVERNA-SACCA, 1912), *P. oryzae* do arroz só infectou cultivar de trigo suscetível sob condição altamente predisponentes, em casa de vegetação (CASTROAGUDIN et al., 2016). Por outro lado, *P. graminis-tritici* derivado do trigo não infectou arroz (CASTROAGUDIN et al., 2016; URASHIMA et al., 1993).

A presença funcional do gene de avirulência *Avr1-CO39* no fungo *P. graminis-tritici* potencialmente impede a infecção de arroz, pois este carrega o gene de resistência *Pi-CO39(t)*. O *Avr1-CO39* é um gene de avirulência caracterizado no fungo *P. oryzae* da brusone do arroz que corresponde ao gene de resistência *Pi-CO39(t)* em cultivares de arroz. O gene *Pi-CO39(t)* é raro ou ausente em populações de plantas amostradas de *Avena*, *Urochloa*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Lolium*, *Panicum*, *Setaria*, *Triticum* e, também, de algumas espécies de *Oryza* (TOSA et al., 2005). O gene de avirulência *Avr1-CO39* correspondente ocorre de forma generalizada em populações do patógeno que não infectam arroz, as quais incluem isolados de *Pyricularia* spp. da maioria dos hospedeiros citados (COUCH et al., 2005), incluindo *P. graminis-tritici*. Em contraste, isolados virulentos a *Oryza* não carregam *Avr1-CO39* funcional (COUCH et al., 2005).

Poucos estudos procuraram elucidar o nível de diversidade genética do patógeno da brusone do trigo no Brasil (CERESINI, 2011). Estudos pioneiros indicaram a ocorrência de populações do patógeno com alta diversidade genética (URASHIMA et al., 1999; URASHIMA et al., 2005). Evidências genético - populacionais recentes obtidas pela análise de três populações regionais do patógeno amostradas entre 2005 e 2008, do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, indicaram habilidade para fluxo gênico a longa distância e a predominância de um sistema reprodutivo misto, colocando *P. graminis-tritici* entre os patógenos de maior potencial evolutivo (CERESINI, 2011; MACIEL et al., 2014).

Nesse contexto, nosso estudo teve por objetivos procurar soluções para as questões como: As populações contemporâneas geograficamente distintas de *P. graminis-tritici* do trigo e de outras poáceas hospedeiras são geneticamente subdivididas? Como se distribui a diversidade gênica e genotípica entre as populações regionais de *P. graminis-tritici*, cerca de 30 anos após as primeiras epidemias no Brasil? Objetivou-se, também, determinar o modo reprodutivo predominante do patógeno com base na ocorrência de equilíbrio gamético entre marcadores microsatélites e na distribuição de idiomorfos dos tipos de acasalamento (*mating types MAT1-1 e MAT1-2*) nas populações estudadas, e por fim comparar, o nível de subdivisão entre as populações de *P. graminis-tritici* do trigo e uma populacional de *P. oryzae* patótipo *Oryza*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem de populações geográficas de *Pyricularia graminis-tritici*, adaptadas ao trigo e a outras poáceas, em lavouras do Centro-Sul do Brasil

Para estudar a estrutura genética predominante em populações brasileiras de *P. graminis-tritici*, populações geograficamente distintas do patógeno, adaptadas ao trigo foram amostradas em lavouras com ocorrência natural da brusone no Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Goiás (GO) e Distrito Federal (DF), que incluem a maior parte das áreas de cultivo de trigo, no Brasil.

Para a determinação da suposta população de origem de *P. graminis-tritici* entre espécies de Poaceae hospedeiras do fungo foram realizadas amostragens em nove lavouras de trigo. Três localizadas no município de Londrina (PR) e as outras seis em municípios da região de Dourados (Amambaí e Aral Moreira, MS). O município de Londrina é considerando, historicamente, o local de origem da brusone do trigo no Brasil (IGARASHI et al., 1986), enquanto em Dourados, a brusone ocorreu de forma epidêmica em época coincidente (GOULART et al., 1990). Foram amostradas populações simpátricas (das mesmas áreas) de trigo e de outras plantas poáceas invasoras com sintomas de brusone.

As populações de *P. graminis-tritici* foram obtidas por amostragem de transectos. Já, a amostragem de outras plantas poáceas invasoras foi tomada em um raio às margens do campo de trigo. A coleta das plantas invasoras foi efetuada em locais que não excederam 100 m da lavoura de trigo de referência. De cada campo foram amostradas 50 espigas de plantas de trigo infectadas e cerca de 100 plantas poáceas invasoras infectadas. As plantas foram colocadas em sacos de papel, secas ao ar e mantidas à -20 °C até o momento do isolamento de *P. graminis-tritici*.

2.2 Isolamento de *Pyricularia graminis-tritici*

Isolamentos de *P. graminis-tritici* de espigas de trigo e de outras plantas poáceas invasoras infectadas foram processados ao longo de 2012 e 2013. As amostras foram processadas para isolamento do patógeno seguindo procedimento descrito por Cruz et al. (2010). De cada amostra infectada foi retirada apenas um isolado monospórico. Para a obtenção de isolados monospóricos foram utilizadas folhas, ráquis e glumas de plantas de trigo ou folhas de plantas invasoras com sintomas de brusone. Realizou-se a assepsia do material, que permaneceu em

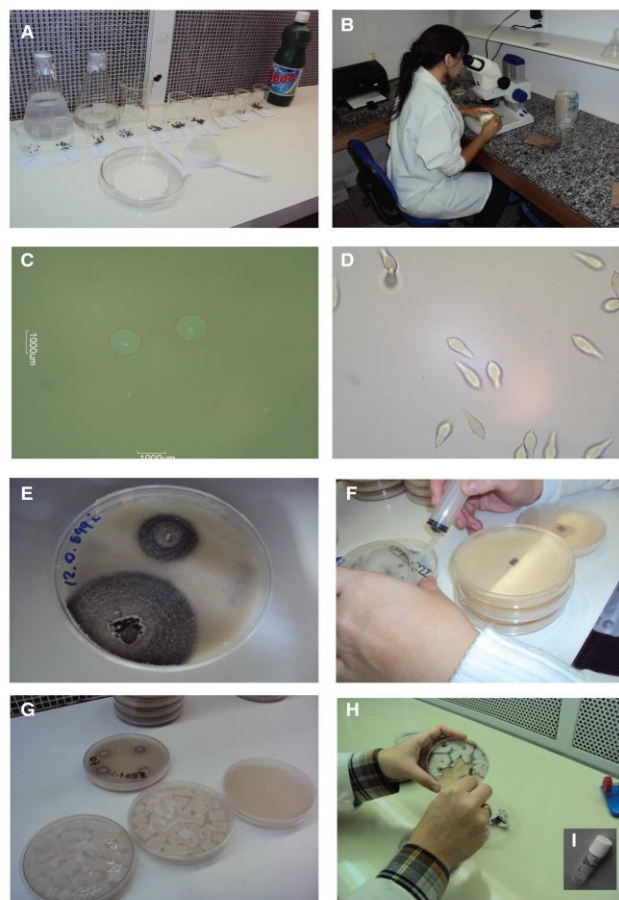
câmara úmida por 24 h. Em seguida, com o auxílio de uma lupa procedeu-se ao isolamento dos conídios de *P. graminis-tritici*. Os conídios foram transferidos, primeiramente, para o meio ágar-água e, após 15 h, apenas os conídios germinados foram transferidos para o meio aveia-ágar até o desenvolvimento das colônias. Os procedimentos relativos ao estabelecimento de populações de *P. graminis-tritici* de plantas de poáceas invasoras de áreas com trigo foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da UNESP, em Ilha Solteira, SP, contando com o apoio da equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo.

Os isolados de *P. graminis-tritici* foram preservados pela técnica do papel de filtro, mantidos em sílica-gel à -20°C, e depositados em duplicata nos Laboratórios da Embrapa Trigo e da UNESP, Campus de Ilha Solteira. Foram obtidos 387 isolados de *P. graminis-tritici* de espigas de trigo infectadas (Tabela 1, Figura 1). Uma amostra adicional de 79 isolados representando genótipos multilocos distintos de *P. graminis-tritici* provenientes do Centro-Sul do Brasil em 2005 (MACIEL et al., 2014), foi utilizada nas análises. Totalizou-se 466 isolados de *P. graminis-tritici*. Especificamente nas regiões de Londrina (PR) e Dourados (MS), onde se amostrou populações simpátricas de *P. graminis-tritici* e de outras espécies poáceas, foram obtidos 156 isolados de *P. graminis-tritici* de espigas de trigo e 59 de folhas de outras plantas poáceas invasoras infectadas. Foi incluída, também, uma população de isolados de *P. oryzae* do arroz (N = 25) do Centro-Sul do Brasil para comparação com as demais populações. Nossa amostra populacional totalizou 550 isolados do patógeno (Tabela 1, Figura 1).

Essas populações do patógeno constituem um banco de isolados mundial único da espécie *P. graminis-tritici* (cuja origem não é o arroz) com a finalidade principal de desvendar a origem das populações adaptadas ao trigo no Brasil. Os pontos amostrais foram georeferenciados e estão disponíveis para inclusão no Sisbiota (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade).

Figura 1 - Processo de isolamento e preservação de culturas monospóricas do patógeno da brusone do trigo e de plantas invasoras (*Pyricularia graminis-tritici*) no Centro-Sul do Brasil.

A. Preparo do material vegetal para isolamento. B. Captura de conídios do fungo para estabelecimento de culturas monospóricas. C. Detalhes de esporos de *P. graminis-tritici*, após 18h de germinação em ágar-água, observados sob estereoscópio, durante processo de captura dos esporos. D. Detalhes de conídios piriformes de *P. graminis-tritici* sob microscópio comum. E. Culturas puras de *P. graminis-tritici* em meio de aveia. F – I. Preparo de culturas puras de *P. graminis-tritici* para preservação de longo prazo em papel de filtro e sílica-gel, à -20°C.



Fonte: Elaboração do autor

Tabela 1. Descrição de populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras plantas poáceas e de *Pyricularia oryzae* patótipo *Oryza* do arroz amostradas no Centro-Sul do Brasil.

Espécies /hospedeiros/cultivares	Populações	Amostragem/localização	Ano	N
<i>Pyricularia graminis-tritici</i>				
<i>Triticum aestivum</i>				
Diversas cultivares	2005_W	Centro-Sul do Brasil	2005	79
BRS 254, BR18	DF-GO_W	Brasília, DF e Rio Verde, GO	2012-2013	86
BRS 264, BR18	MG_W	Patrocínio e Perdizes, MG	2012-2013	62
BRS Guamirim	MS_W	Amambaí e Aral Moreira, MS	2012-2013	82
CD 104	PR_W	Londrina, Jandaia do Sul, PR	2012-2013	74
...	RS_	Passo Fundo, São Luiz Gonzaga, São Borja e Três de Maio, RS	2012-2013	52
CD 116	SP_W	Itaí, SP	2012-2013	31
Total (<i>Triticum</i>)				466
Outras espécies de poáceas				
<i>Avena sativa</i> , <i>Cenchrus echinatus</i> , <i>Chloris distichophylla</i> , <i>Cynodon</i> spp., <i>Digitaria insularis</i> , <i>Digitaria sanguinalis</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Eleusine indica</i> , <i>Eragrostis plana</i> , <i>Panicum maximum</i> , <i>Rhynchelytrum repens</i> , <i>Sorghum sudanense</i> , and <i>Urochloa brizantha</i> .	MS_P	Amambaí e Aral Moreira, MS	2012-2013	28
	PR_P	Londrina, PR	2012-2013	31
Total (Outras plantas poáceas)				59
<i>Pyricularia oryzae</i> patótipo <i>Oryza</i>				
<i>Oryza sativa</i>				
Diversas cultivares	Arroz	Centro-Sul do Brasil	2006-2013	25
Total				550

Fonte: Elaboração do autor

2.3 Genotipagem de populações de isolados de *Pyricularia graminis-tritici* usando sequências de DNA nuclear, alelos de idiomorfos de tipos de compatibilidade (*mating types*) e marcadores microssatélites

Micélio fúngico foi produzido em 30 mL de caldo de batata dextrose (a 18,5 g/L), incubando-se por cinco dias, sob agitação. O micélio coletado foi liofilizado por cerca de 48 h. O DNA genômico do fungo foi extraído de micélio liofilizado usando o *DNeasy Plant Mini Kit* (Sigma Aldrich) seguindo instruções do fabricante. Os isolados de *P. graminis-tritici* foram identificados com base na amplificação específica de três regiões do DNA nuclear: CH7-BAC7, MPG1 e NUT1 do DNA de *P. graminis-tritici*.

Foi determinado a frequência de ocorrência e o compartilhamento de alelos dos idiomorfos dos tipos de compatibilidade (*MAT1-1* e *MAT1-2*) entre as populações de

P. graminis-tritici estudados. Inicialmente foi examinada a presença ou ausência de dois idiomorfos de tipos de acasalamento *MAT1-1* e *MAT1-2* (CONSOLO; SALENO, 2005; TREDWAY et al., 2003; XU; HAMER, 1995), utilizando a técnica de PCR (presença ou ausência de amplificação). Para avaliar a presença de *MAT1-1* foram utilizados os primers A1 (5'-AGCCTCATCAACGGCAA-3') e A5 (5'-GGCACGAACATGCGATG-3'), para detectar *MAT1-2*, os primers B15 (5'-CTCAATCTCCGTAGTAG -3') e B16 (5'-ACAGCAGTATAGCCTAC-3'). As sequências de *primers* foram fornecidas pelo Dr. Didier Tharreau, INRA, Montpellier. Foram incluídos isolados como controles positivos para *MAT1-1* e *MAT1-2*. Os testes foram repetidos duas vezes.

Os isolados de *P. graminis-tritici* das populações geográficas provenientes de trigo no Centro-Sul do Brasil (do DF e dos estados de GO, MG, MS, PR, RS e SP) e simpátricas coletadas de trigo e de outras poáceas nas regiões de Londrina (PR) e Dourados (MS), e de *P. oryzae* do arroz foram genotipados utilizando um conjunto de 11 locos microsatélites polimórficos (cnpt_mg-c013, -c047, -c060, -c065, -c108, -c129, -c147, -c168, -c233, -c248, -p1e11), como descrito anteriormente por Pereira et al. (2014). Para as reações de PCR, as condições de genotipagem e a análise de tamanho de fragmentos amplificados de DNA em sequenciador automatizado ABI3700 foram conduzidas conforme descrito anteriormente (Pereira et al., 2014). Amostras de DNA de dois isolados padrões foram incluídas como controle em cada placa de 96 amostras em todas as corridas. Evidências da reprodutibilidade dos métodos de genotipagem e de análise de tamanhos de fragmentos de PCR foram obtidas pela genotipagem adicional de isolados representando todos os alelos detectados de cada loco avaliado nas populações de *P. graminis-tritici* adaptadas ao trigo.

2.4 Análise da estrutura genética de populações de *Pyricularia graminis-tritici*

A estruturação genética de populações geográficas de *P. graminis-tritici* adaptadas ao trigo e a outras poáceas no centro-sul do Brasil, foi aferida determinando-se: a diversidade genotípica e a riqueza alélica, a rede mínima de expansão entre genótipos, a diferenciação genética entre populações (baseada na variância das frequências alélicas), os padrões contemporâneos de migração e fluxo gênico entre populações, e o modo reprodutivo predominante nas populações do patógeno (com base em medidas de equilíbrio gamético). Todas as análises foram efetuadas usando-se um conjunto de dados corrigidos para clones, contendo apenas um indivíduo de cada genótipo multilocos microsatélites por população.

2.4.1 Diversidade genotípica e riqueza alélica.

O genótipo multilocos microsatélite para cada isolado do patógeno foi determinado usando o programa Genodive (MEIRMANS et al., 2004). Isolados exibindo o mesmo genótipo multilocos foram considerados membros da mesma linhagem clonal. Vários índices de diversidade genotípica foram determinados: (a) número de genótipos por população; (b) genótipos população-específicos; (c) a fração clonal, ou porcentagem de isolados originados por reprodução assexuada, calculada por $1 - (\text{número de genótipos distintos})/(\text{número total de isolados})$ (ZHAN et al., 2003); (d) o número efetivo de genótipos (G_o) (STODDART; TAYLOR, 1998); (e) a equitatividade, calculada como a razão entre o número efetivo de genótipos distintos e o número total de genótipos amostrados na população; um valor de equitatividade igual a 1,0 indica que todos os genótipos tiveram frequências uniformes na população. Testou-se a significância estatística das diferenças em diversidade genotípica entre pares de populações baseando-se em método de reamostragem por *bootstrap* (com sub-amostragens para equiparar ao tamanho da menor população com 19 indivíduos), onde indivíduos de cada população foram re-amostrados e os índices de diversidade foram recalculados e comparados após cada rodada (MANLY, 1991).

Para as análises de riqueza alélica foram utilizados os dados corrigidos para clones, onde foi incluído somente um indivíduo de cada genótipo multilocos microsatélite por população. A riqueza alélica foi estimada para cada população de *P. graminis-tritici*, com base no número médio de alelos por loco (EL MOUSADIK; PETIT, 1996) por rarefação. Essa abordagem de rarefação utiliza a frequência de alelos em um loco particular estimando o número de alelos que poderiam ocorrer neste loco, padronizando a medida em função da população de menor tamanho (NEI 1978; NEI 1987). Para testar se grupos de populações diferiam quanto à riqueza alélica, foi utilizado o programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Valores de p para significância de comparações de pares de média foram obtidos com 1.000 permutações.

2.4.2 Rede mínima de expansão entre genótipos (RME).

Foi construída uma RME para ilustrarmos, de forma gráfica personalizada, a distribuição e a relação de similaridade genética entre todos os genótipos multilocos de *P. graminis-tritici* amostrados nas 10 populações geográficas e hospedeiros distintos. A relação de similaridade entre genótipos do patógeno baseou-se em distância genética de Bruvo (BRUVO et al., 2004). A RME personalizada foi produzida com o pacote *poppr* (KAMVAR et al., 2014) para R

(CORE TEAM, 2013) usando o algoritmo de Prim como implementado no pacote *igraph* (Csardi e Nepusz 2006), com a função *bruvo.msn()* para cálculo da distância genética de Bruvo (BRUVO et al., 2004).

2.4.3 Magnitude do fluxo gênico.

A distribuição da diversidade gênica e o grau de subdivisão populacional entre populações geográficas e hospedeiros distintos foram determinados baseando-se na análise hierárquica de variância molecular (AMOVA), com partição de componentes de variância [efeito “entre-grupos”, efeito de “populações-dentro-de-grupos” e efeito “dentro-de-população”]. Como medida de distância genética foi usada a soma de quadrado das diferenças (R_{ST}) entre dois haplótipos (STATKIN, 1995). A significância entre índices de fixação foi testada usando uma abordagem não-paramétrica com 10.000 permutações (EXCOFFIER et al., 1992), implementada no programa ARLEQUIN versão 3.11 (Zoological Institute, Department of Biology, University of Bern, Switzerland).

2.4.4 Testes de equilíbrio gamético.

O equilíbrio gamético (EG) foi testado usando um teste de associação multilocos (BROWN et al., 1980), testando a hipótese de que um genótipo em um loco é independente de genótipos em outro loco, usando o teste exato de Fisher (GARNIER-GERE; DILLMANN, 1992). Esse teste foi implementado com o programa GENEPOP version 3.4 (Institut des Sciences de l'Evolution, Université Montpellier 2, Montpellier, France). Dois locos são considerados em desequilíbrio gamético quando o valor de p para a associação entre locos for ≤ 0.05 . Nós também medimos o índice de associação multilocos (I_A e $\bar{r}_D$) (MAYNARD et al., 1993). Foi testada a hipótese de panmixia completa em cada população geográfica de *P. oryzae* adaptada ao trigo ou a outras poáceas por comparações entre os dados observados e dados obtidos quando uma quantidade de reprodução sexuada e recombinação foi imposta através de rearranjo ao acaso de alelos entre indivíduos independentemente para cada loco. O cálculo dos valores de I_A e $\bar{r}_D$ e suas respectivas significâncias foi efetuado de acordo com Agapow e Burt (2001), usando-se o software Multilocus (AGAPOW; BURT 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diversidade genotípica e gênica

Duzentos e dezenove genótipos multiloci distintos foram encontrados entre os 550 isolados de *P. graminis-tritici* e *P. oryzae* analisados (Tabela 2, Figura 2). O número efetivo de genótipos, uma medida da diversidade genotípica, foi maior nas populações de *P. graminis-tritici* do trigo amostradas em MS, SP e PR, que apresentaram diversidade genotípica G_o variando entre 18,38 e 23,44, bem como na população de *P. oryzae* patótipo *Oryza* (Tabela 2). As populações de *P. graminis-tritici* de trigo no MS ou no PR apresentaram maior diversidade genotípica em relação às populações amostradas de outras poáceas em áreas adjacentes às de trigo (MS_P ou PR_P). As cinco populações de *P. graminis-tritici* com menor diversidade genotípica foram *Triticum* – DF-GO_W, MG_W, RS_W, 2005_W e de outras poáceas – PR_P, que apresentaram G_o entre 4,50 e 8,40 (Tabela 2). A diversidade genética é uma medida de biodiversidade que mede a variação genética dentro de cada espécie. Na teoria de Nei (1987), a diversidade genética foi definida pelo uso de frequências gênicas da geração atual, não tendo nenhuma pressuposição acerca dos pedigrees dos indivíduos, bem como da seleção e migração no passado. Isto fez com que esta abordagem pudesse ser empregada para qualquer situação, com ou sem seleção.

A fração clonal variou entre o menor valor de 0,13, detectado na população *Triticum* – SP_W, ao maior valor de 0,73 na população *Triticum* de DF-GO_W. Já, a equitatividade variou de 0,18, na população *Triticum* – 2005_W e 0,87 a 0,90 nas populações *Triticum* – SP_W e arroz, respectivamente. A equitatividade determina como os genótipos estão distribuídos dentro das populações. No geral, encontrou-se genótipos distribuídos em proporções desuniformes nas populações *Triticum* de 2005_W, DF-GO_W e MG_W, enquanto que uma distribuição mais equitativa de genótipos foi detectada nas populações *Triticum* – SP_W e arroz (Tabela 2).

A riqueza alélica média das dez populações em conjunto foi de 2,70. A riqueza alélica identifica, principalmente, o número de alelos diferentes segregando em uma população (CABALLERO et al., 2010). A população de *P. graminis-tritici* de outras poáceas do MS apresentou a maior riqueza alélica ($RA = 3,18$), não diferindo estatisticamente das populações de 2005_W, MS_W, PR_W, RS_W, SP_W, todas de trigo, com as médias de 3,06; 3,05; 3,08; 2,53; e 2,74, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Medidas de diversidade genotípica e gênica em populações simpátricas de *Pyricularia graminis-tritici* e *P. oryzae* patótipo *Oryza* no Centro-Sul do Brasil.

População e hospedeiro	N ^b	Número de genótipos ^c	Genótipos sítio-específicos e compartilhados ^d	Fração clonal ^e	Número efetivo de genótipos (G_o) ^f	Equitatividade ^g	Riqueza alélica ^h
<i>Pyricularia graminis-tritici</i>							
<i>Triticum</i>							
2005	79	26	26 (0)	0,67	4,80 c	0,18	3,06 ab
DF-GO_W	86	23	14 (9)	0,73	4,50 c	0,20	2,40 b
MG_W	62	27	15 (12)	0,56	7,42 bc	0,27	2,29 b
MS_W	82	45	26 (19)	0,45	21,83 a	0,48	3,05 ab
PR_W	74	45	34 (11)	0,39	18,38 a	0,41	3,08 ab
RS_W	52	19	9 (10)	0,63	8,40 b	0,44	2,53 ab
SP_W	31	27	22 (5)	0,13	23,44 a	0,87	2,74 ab
Outras poáceas							
MS_P	28	16	9 (7)	0,43	10,32 b	0,64	3,18 a
PR_P	31	17	10 (7)	0,45	7,94 bc	0,47	2,45 b
<i>Pyricularia oryzae</i> patótipo <i>Oryza</i>							
Arroz	25	21	21 (0)	0,16	18,94 a	0,90	2,25 b
Total	550	219	186 (33)	0,60			

Nota: ^a As medidas de diversidade genotípica / clonal foram calculados com GenoDive ver. 2.0 b.17. ^b N = tamanho da amostra. ^c Número de genótipos multiloci identificados com 11 marcadores microssatélites em cada população. ^d Número de genótipos compartilhados com outras populações são exibidos entre parênteses. ^e Proporção de isolados que possivelmente se originaram por reprodução assexuada. A fração clonal foi calculada como: $1 - [\text{número de genótipos diferentes} / \text{total de isolados amostrados}]$. ^f Médias de número efetivo de genótipos G_o . ^g Equitatividade é calculada como a razão entre o número efetivo de genótipos distintos e o número total de genótipos amostrados na população. Equitatividade igual a 1,0 indica que todos os genótipos tiveram frequências idênticas na população. ^h Médias da riqueza alélica foram calculadas usando-se rarefação baseando se numa amostra de 16 indivíduos haplóides, de acordo com El Mousadik e Petit (1996). As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes (a $p \leq 0,05$).
 Fonte: Elaboração do autor.

3.2 Rede mínima de expansão entre genótipos e teste para mistura populacional ¹

Observando a distribuição de genótipos multiloci de *P. graminis-tritici* e de *P. oryzae* na RME, detectou-se que a maioria dos genótipos foram, principalmente, sítio-específicos (186 em 219, ou 85%) (Tabela 2, Figuras 2 e 3). Enquanto isso, 33 genótipos foram compartilhados entre campos de trigo ou de outras poáceas no Centro-Sul do Brasil. Nenhum genótipo foi compartilhado entre populações de *P. graminis-tritici* e a população de *P. oryzae* do arroz, indicando subdivisão entre as populações de trigo e de arroz. Os genótipos de *P. oryzae* do arroz agruparam-se num ramo independente dos demais genótipos de *P. graminis-tritici*, com exceção dos genótipos 1, 2 e 10 (Figura 3). Na amostra populacional contemporânea de *P. graminis-tritici* não foram detectados genótipos semelhantes aos amostrados em 2005 que, também, agruparam-se num ramo isolado (Figura 3).

No geral, 15% dos genótipos detectados foram compartilhados entre populações simpátricas (da mesma região) ou alopátricas (de regiões diferentes) de *P. graminis-tritici* do trigo e de outras poáceas, correspondendo a 33 (entre 219) genótipos em mistura, que poderiam ter sido originados em uma população distinta de sua população referência (Tabela 2, Figura 3). A quantidade de mistura variou entre o mínimo de 18,52% para a população de SP (cinco genótipos em mistura) ao máximo de 43,18% para a população de *P. graminis-tritici* do trigo de MS (o equivalente a 19 genótipos em mistura), que compartilhou genótipos com todas as demais populações, exceto a de arroz e a de trigo de 2005.

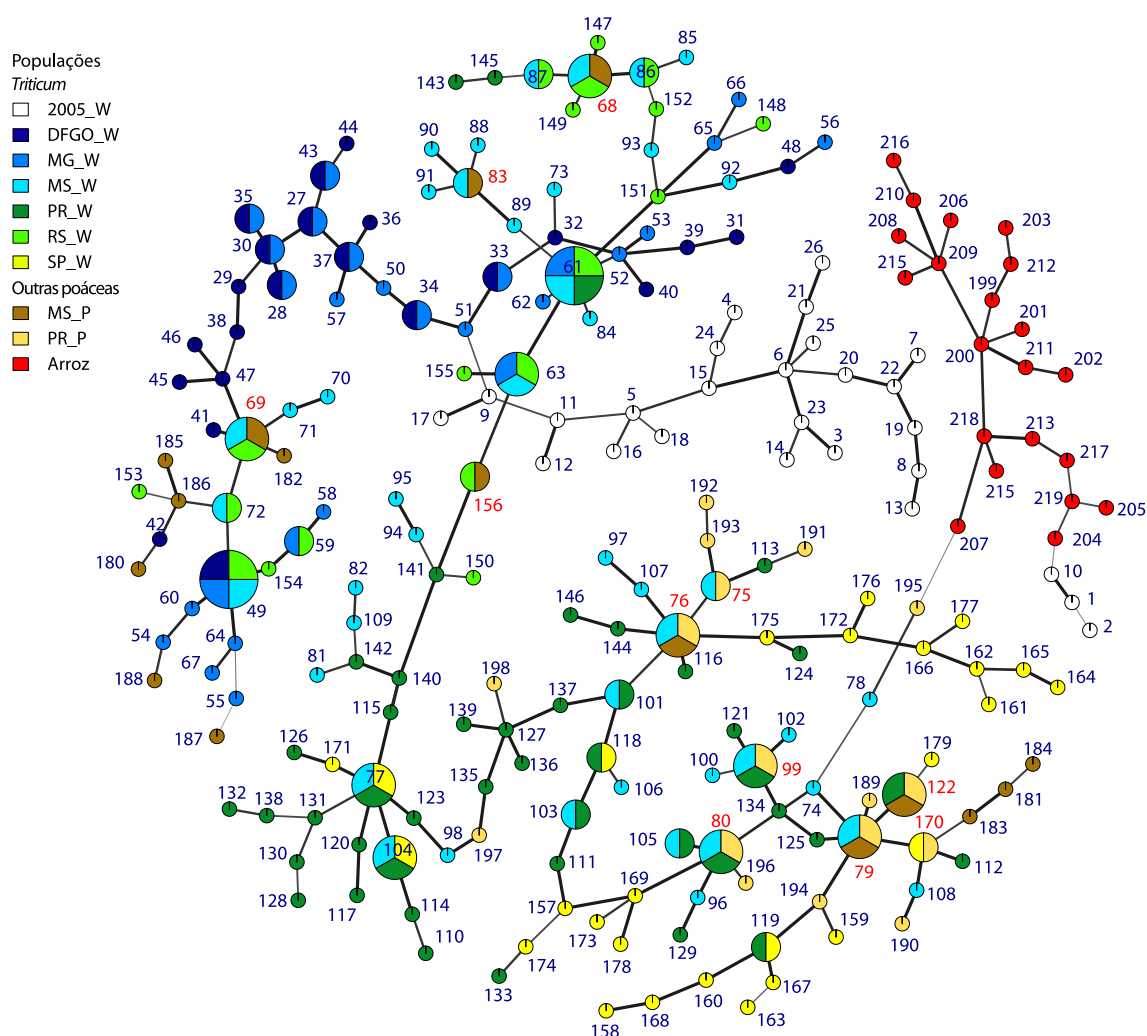
As populações de *P. graminis-tritici* amostradas de outras poáceas no MS e no PR, compartilharam 11 genótipos (ou cerca de 5% do total) com as demais populações de *P. graminis-tritici* obtidas de trigo (Tabela 2, 3 e 4; Figura 3). Foram compartilhados quatro genótipos de *P. graminis-tritici* isolados de braquiária (*Urochloa brizantha*), quatro de capim-colchão ou milhã (*Digitaria sanguinalis*), três de aveia (*Avena sativa*), três de capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), três de capim-favorito (*Rhynchelytrum repens*), dois de

¹ A rede mínima de expansão entre genótipos (RME) foi construída para ilustrarmos, de forma gráfica, a distribuição e relação genética entre todos os genótipos de *P. graminis-tritici* e *P. oryzae* patótipo *Oryza* amostrados (Figura). De fato, esta RME traz estimativas das relações entre genótipos multiloci microssatélite de *P. oryzae*, baseando-se em distância de Bruvo (BRUVO et al., 2004). Entretanto, a RME aqui apresentada deve se interpretar com cautela, pois, especificamente (i) apresenta um único cenário selecionado arbitrariamente, ilustrando apenas uma das muitas soluções potencialmente e igualmente ótimas, e (ii) não foram usadas métricas estatísticas (por exemplo, suporte de *bootstrap*) para avaliar a credibilidade das estimativas da RME, por simples limitação do algoritmo disponível utilizado.

falso-capim-de-rhodes (*Chloris distichophylla*), um de capim-amargoso (*Digitaria insularis*), um de capim-colonião (*Panicum maximum*), um de Tifton 85 (*Cynodon* spp.), um de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*), um de capim-annoni (*Eragrostis plana*) e um de capim-sudão (*Sorghum sudanense*) (Tabela 4). A similaridade genética dos genótipos de *P. graminis-tritici* obtidos de populações de outras poáceas com genótipos amostrados de populações do patógeno provenientes do trigo, indicam, possivelmente, origem comum para estes isolados (Tabela 4).

A dispersão eficiente do patógeno a longa distância via esporos aéreos e o movimento histórico de sementes infectadas entre Estados, mediado pelo homem, são mecanismos de disseminação de patógenos associados ou não a seus hospedeiros. Os conídios de *P. graminis-tritici* podem ser dispersos a pelo menos 1.000 m de distância de um ponto original inoculado no campo (URASHIMA et al., 2007) . No entanto, se o inóculo do patógeno do trigo pode ser disperso a distâncias maiores é algo que ainda deve ser determinado. Porque mais de 25 anos se passou desde as primeiras epidemias de brusone do trigo, seria plausível que o patógeno tivesse atingido distâncias maiores para populações adjacentes a partir do ponto de origem no Estado do Paraná (CERESINI, 2011).

Figura 3. Rede mínima de expansão baseada em distância de Bruvo para comparação entre genótipos microssatélites de 219 genótipos de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras poáceas e de *P. oryzae* patótipo *Oryza* do arroz no centro-sul do Brasil ^{a, b, c, d}



- ^{a.} Cada nó da rede representa um genótipo multiloci haplóide único determinado com base em 11 marcadores microssatélites.
- ^{b.} O volume do nó representa a frequência do genótipo amostrado. O sombreamento (cores) dos nós representa a membresia de cada população, enquanto a espessura e o sombreamento das linhas (em tons de cinza) representam o grau de parentesco entre genótipos. O comprimento das linhas é arbitrário.
- ^{c.} Na figura estão grafados em vermelho os genótipos multiloci compartilhados entre populações de *P. graminis-tritici* do trigo e de outras poáceas no MS e no PR, enquanto os indicados em azul escuro estão apenas associados com populações de trigo.
- ^{d.} Não houve genótipos de *P. graminis-tritici* semelhantes a genótipos de *P. oryzae* patótipo *Oryza* (indicados em cor vermelha).

Fonte: Elaboração do autor

Tabela 3. Número de genótipos multiloci microssatélites compartilhados entre populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras espécies de poáceas e de *P. oryzae* patótipo *Oryza* do arroz no Centro-Sul do Brasil

Populações	<i>Triticum</i>							Outras poáceas	
<i>Pyricularia graminis-tritici</i>	2005	DF-GO_W	MG_W	MS_W	PR_W	RS_W	SP_W	MS_P	PR_P
<i>Triticum</i>									
2005	-	0	0	0	0	0	0	0	0
DF-GO_W		-	9	1	0	1	0	0	0
MG_W			-	3	1	4	0	0	0
MS_W				-	8	8	2	5	4
PR_W					-	1	4	0	3
RS_W						-	0	3	0
SP_W							-	0	1
Outras poáceas									
MS_P								-	3
PR_P									-
<i>P. oryzae</i> patótipo <i>Oryza</i>									
Arroz	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número total de isolados	0	11	17	31	17	17	7	11	11
Número de genótipos compartilhados	0	9	12	19	11	10	5	7	7

Fonte: Elaboração do autor

Tabela 4 - Compartilhamento de 11 genótipos multiloci entre populações de *Pyricularia graminis-tritici* amostradas de trigo e de outras poáceas invasoras de áreas de trigo no Centro-Sul do Brasil

Genótipo	Número total de indivíduos com genótipos compartilhados por população									Total	Hospedeiros
	2005_W	DFGO_W	MG_W	MS_W	PR_W	RS_W	SP_W	MS_P	PR_P		
68				5		5		1		11	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Urochloa brizantha</i>
69				10		5		2		17	<i>T. aestivum</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>U. brizantha</i>
75				1					4	5	<i>T. aestivum</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Digitaria sanguinalis</i> , <i>Rhynchelytrum repens</i>
76				2				1	2	5	<i>T. aestivum</i> , <i>A. sativa</i> , <i>Eragrostis plana</i> , <i>U. brizantha</i>
79				2				3	9	14	<i>T. aestivum</i> , <i>E. crusgalli</i> , <i>D. sanguinalis</i> , <i>Eleusine indica</i> , <i>Panicum maximum</i> , <i>R. repens</i> , <i>Sorghum sudanense</i> , <i>U. brizantha</i>
80				8	2				1	11	<i>T. aestivum</i> , <i>Chloris distichophylla</i>
83				2				3		5	<i>T. aestivum</i> , <i>D. sanguinalis</i> , <i>E. crusgalli</i>
99				2	1				2	5	<i>T. aestivum</i> , <i>D. sanguinalis</i> , <i>R. repens</i>
122					1			1	1	3	<i>T. aestivum</i> , <i>A. sativa</i> , <i>Cynodon spp.</i>
156						1		1		2	<i>T. aestivum</i> , <i>Digitaria insularis</i>
170							1		2	3	<i>T. aestivum</i> , <i>C. distichophylla</i>
Total	0	0	0	32	4	11	1	12	21	81	13 hospedeiros distintos

Fonte:Elaboração do autor

3.3 Diferenciação genética entre populações do patógeno

O índice geral de fixação R_{ST} igual a 0,4349 ($p \leq 0,001$), indicou diferenciação entre as populações geográficas e hospedeiros-distintos de *P. graminis-tritici* do trigo, de outras poáceas e de *P. oryzae* do arroz. Com relação às populações obtidas de trigo, o índice de fixação R_{ST} igual a 0,0706 ($p \leq 0,001$) indicou diferenciação consideravelmente menor entre as populações geográficas do patógeno. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as duas populações procedentes de outras poáceas invasoras de áreas de trigo no MS e PR (Tabela 5). Ao se observar o grupo de populações de trigo com o grupo de populações de outras poáceas, detectou-se diferença significativa entre grupos, porém o índice de fixação R_{ST} foi relativamente baixo, igual a 0,0385 (Tabela 5).

A maioria dos pares de populações de *P. graminis-tritici* provenientes de trigo apresentaram diferenciação genética não significativa, indicando fluxo gênico à curta e à longa distância (Tabela 6). Contudo, a população DF-GO_W foi distinta, geneticamente, das populações MS_W, PR_W, RS_W e SP_W, e a população MG_W se diferenciou de PR_W. Detectou-se, também, ausência de subdivisão genética entre as populações de outras poáceas amostradas no MS e PR para a maioria das populações de *P. graminis-tritici* de trigo. Entretanto, as populações de *P. graminis-tritici* de outras poáceas do PR divergiram das populações de DF-GO_W, MG_W e RS_W, todas de trigo (Tabela 6).

Dessa forma, o presente estudo e o de Maciel et al. (2014) corroboram evidências que a hipótese H_0 de que não há subdivisão entre as populações geográficas do patógeno. Também não havia sido detectada subdivisão entre as populações de *P. graminis-tritici* amostradas de campos de trigo na região Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil entre 2005 a 2008, indicando que a estrutura genética populacional era consistente com altos níveis de fluxo gênico (CERESINI, 2011; MACIEL et al., 2014). Portanto o fluxo gênico à curtas e longas distâncias tem papel importante como força evolutiva mantendo populações geográficas contemporâneas de *P. graminis-tritici* conectadas. Além disso, a ausência de subdivisão genética entre populações de outras poáceas e as populações de trigo, apontam que espécies de plantas poáceas invasoras ou largamente cultivadas no Brasil, como o capim-braquiária (*U. brizantha*) e capim-colonião (*Panicum maximum*) podem ser importantes fontes de inóculo de *P. graminis-tritici* para ocasionar epidemias de brusone em espigas de trigo.

Tabela 5. Distribuição hierárquica da diversidade gênica entre populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo, de outras poáceas e de *Pyricularia oryzae* de arroz no Centro-Sul do Brasil^a.

Fonte de variação	g.l.	Componentes de variância	% da variação	Índice de Fixação	<i>p</i>
Todas as populações					
Entre populações	9	18,68	43,49	<i>R</i>_{ST} = 0,4349	< 0,0001
Dentro de populações	256	24,28	56,51		
Total	265	42,96			
Entre as populações de trigo					
Entre populações	6	1,71	7,06	<i>R</i>_{ST} = 0,0706	< 0,0001
Dentro de populações	205	22,54	92,94		
Total	511	24,25			
Entre as populações de poáceas					
Entre populações	1	0,71	1,96	<i>R</i>_{ST} = 0,0196	0,2092
Dentro de populações	31	35,82	98,04		
Total	32	36,53			
Contraste entre grupos					
<i>Triticum</i> vs. outras poáceas					
Entre grupos	1	1,12	3,85	<i>R</i>_{ST} = 0,0385	< 0,0001
Entre as populações dentro de grupos	26	0,84	2,90		
Dentro das populações	627	27,13	93,25		
Total contraste	654	29,10			
<i>Triticum</i> vs. arroz					
Entre grupos	1	106,38	81,82	<i>R</i>_{ST} = 0,8182	< 0,0001
Entre as populações dentro de grupos	26	0,42	0,32		
Dentro das populações	690	23,21	17,86		
Total contraste	717				
Outras poáceas vs. arroz					
Entre grupos	1	96,26	77,20	<i>R</i>_{ST} = 0,7821	< 0,0001
Entre as populações dentro de grupos	26	0,01	0,00		
Dentro das populações	497	29,28	22,78		
Total contraste	524				

^a Método de distância baseado na soma de quadrados das diferenças de tamanho entre alelos (R_{ST}). A Análise de variância molecular foi realizada usando-se o programa Arlequin versão 3.1. (EXCOFFIER et al., 2005). Método de distância baseado na soma de quadrados das diferenças de tamanho entre alelos (R_{ST}) entre dois haplotipos, para dados de microssatélites, de acordo com Slatkin (1995); número de permutações = 10,000. Significância dos valores foi testada usando abordagem não-paramétrica (EXCOFFIER et al., 1992).

Fonte: Elaboração do autor

Tabela 6. Medidas de diferenciação entre populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras poáceas e de *P. oryzae* patótipo *Oryza* de arroz no Centro-Sul do Brasil, baseadas em R_{ST} ^{a, b, c}.

R_{ST}	2005_W	DF-GO_W	MG_W	MS_W	PR_W	RS_W	SP_W	MS_P	PR_P
<i>Pyricularia graminis-tritici</i>									
<i>Triticum</i>									
2005_W	-								
DF-GO_W	0,0066	-							
MG_W	0,0078	0,0340	-						
MS_W	0,0561	0,1567*	0,0403	-					
PR_W	0,0944*	0,2387*	0,1213*	0,0092	-				
RS_W	0,0610	0,1583*	0,0400	0,0298	0,0830	-			
SP_W	0,0281	0,1734*	0,0969	0,0480	0,0660	0,1499	-		
Outras poáceas									
MS_P	-0,0099	0,0750	0,0203	0,0316	0,0690	0,0733	-0,0050	-	
PR_P	0,0380	0,1794*	0,1274*	0,0927	0,0674	0,1661*	0,0044	0,0196	-
<i>Pyricularia oryzae</i> patótipo <i>Oryza</i>									
Arroz	0,7040*	0,8584*	0,8288*	0,8511*	0,8469*	0,8240*	0,8337*	0,7796*	0,7496*

^a Índices de fixação entre populações: $R_{ST} = 0,4349$ ($P \leq 0,001$)

^b Dados corrigidos para clones. Distâncias medidas com base no quadrado das diferenças no tamanho de alelos entre dois haplótipos para os dados de microsatélites de acordo com Statkin (1995).

^c Significância dos valores de p foi testada usando abordagem não-paramétrica com $\alpha \leq 0,05$ (após correção de Bonferroni para múltiplas comparações e α ajustado para 0,0056), com base em 10.000 permutações. O teste foi realizado usando Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 1992).

Fonte: Elaboração do autor

Os maiores níveis de diferenciação foram observados quando se contrastou a população de *P. oryzae* patótipo *Oryza* amostrada de arroz com as demais populações de *P. graminis-tritici* do trigo ($R_{ST}= 0,8182$) ou de outras poáceas ($R_{ST}= 0,7821$), corroborando as observações efetuadas por Maciel *et al.* (2014) e Castroagudin *et al.* (2016) que indicam tratar-se de duas espécies distintas de *Pyricularia*.

3.4 Predominância de equilíbrio gamético nas populações do patógeno

Como nenhuma estrutura sexuada de *P. graminis-tritici* foi encontrada até agora em condições de campo, avaliou-se a importância relativa de reprodução sexuada moldando a estrutura de populações do patógeno, buscando evidências genético-populacionais ou sinais de recombinação. Em populações cujo modo reprodutivo é predominantemente sexuada, além de equilíbrio gamético entre marcadores genéticos, espera-se detectar proporções semelhantes dos dois tipos de acasalamento ou *mating types* (razão entre *MAT 1-1* e *MAT 1-2* igual a 1:1) (MACIEL *et al.*, 2014). A recombinação entre isolados distintos de *Pyricularia* spp. ocorre apenas entre indivíduos de *mating type* opostos e que sejam férteis (MEKWATANAKERN *et al.*, 1999). A análise da estrutura genética de populações de *P. graminis-tritici* amostradas no período de 2005-2008 indicou um sistema reprodutivo misto, onde a reprodução sexuada é seguida da dispersão clonal (MACIEL *et al.*, 2014).

O equilíbrio gamético entre pares de loci I_A e $\bar{r}_D$ foi não significativos a $p \leq 0,05$ em sete das dez populações de *P. graminis-tritici* amostradas (*Triticum* – DF-GO, MG, PR, RS e SP, outras poáceas do PR) e na população de *P. oryzae* do arroz. Nessas sete populações, a proporção de pares de loci em desequilíbrio gamético variou de zero a 0,03. As três populações para as quais se detectou desequilíbrio gamético foram *Triticum* – 2005, MS_P e MS_W) (Tabela 6).

Embora tenha havido detectado equilíbrio gamético na maioria das populações amostradas, a distribuição relativa de idiomorfos dos tipos de acasalamento, *mating types* (*MAT1-1* e *MAT1-2*) observada foi desproporcional, havendo predominância do *MAT 1-1*. Contudo, na população MG_W não se notou *MAT-1-2*. As maiores proporções do idiomorfo *MAT1-2* foram verificadas em populações de *P. graminis-tritici* de outras poáceas PR_P (2:1) e MS_P (1:4) e na população de *P. oryzae* do arroz (1:20). Embora a relação entre *MAT1-1*:*MAT1-2* também tenha sido desproporcional nas duas populações de *P. graminis-tritici* de outras poáceas, estas proporções foram mais próximas daquela esperada para organismos cujo modo reprodutivo sexual é o predominante.

Procurando encontrar a razão para a desproporcionalidade observada na frequência de ocorrência de tipos de cruzamento sexual, reanalizamos os dados de Castroagudin et al. (2013), que detectaram frequência generalizada da ocorrência de resistência a fungicidas QoI nas mesmas populações de *P. graminis-tritici* que analisamos. Hipotetizando que a seleção para resistência a fungicidas QoIs teria sido responsável pelo desvio nas frequências esperadas dos idiomorfos de tipos de acasalamento.

Detectamos correlação positiva entre genótipos do patógeno que apresentam resistência a fungicidas QoI (carregam o alelo QoI-R no gene *cytB*) e que carregam o idiomorfo *MAT1-1*. De 207 genótipos multiloci de *P. graminis-tritici* analisados, 174 eram QoI-R e destes 163 eram *MAT1-1* enquanto apenas 11 eram *MAT1-2*. Isso resultou na proporção *MAT1-1*:*MAT1-2* de 14:1. Os isolados sensíveis a estrobirulinas (N = 33), apresentaram proporção *MAT1-1*:*MAT1-2* de 1:1 (Tabela 8).

Considerando as observações realizadas em nosso estudo, postulamos que *P. graminis-tritici* encontra condições de se reproduzir de forma sexuada em outras poáceas hospedeiras, quando na ausência de pressão de seleção de fungicidas estrobirulinas. Durante os períodos de safra de trigo, com a retomada das pulverizações de fungicidas, genótipos QoI-R e *MAT1-1* já presente em maior proporção, possuem vantagem seletiva para predominarem nas populações do patógeno.

Apesar da observação de frequências dissimilares dos tipos de acasalamento, equilíbrio gamético foi detectado em sete das dez populações de *P. graminis-tritici*. Baseando-se nestas observação, concluímos que a “assinatura” de recombinação foi encontrada em populações de *P. graminis-tritici* do trigo. De acordo com Ceresini (2011), as populações de *P. graminis-tritici* do trigo no Brasil tem um sistema reprodutivo misto, pelo qual a reprodução sexuada ocorre mas é seguida pela dispersão local de clones, indicando a importância de conídios como inóculo primário. Os ascósporos podem ser uma fonte significativa de inóculo secundário durante o desenvolvimento de epidemias de brusone do trigo no Brasil. Genótipos novos do patógeno seriam, então, produzidos por eventos de recombinação. Os genótipos novos que forem favorecidos pela seleção poderiam aumentar em frequência via reprodução assexual dentro de cada campo, ser disperso como clones (por conídios) a curtas distâncias e, talvez, mais frequentemente a longas distancias, via sementes infectadas.

Há evidências genético - populacionais nesse trabalho, obtidas pela análise de nove populações regionais do patógeno amostradas entre 2012 e 2013 nas principais regiões produtoras de trigo no Centro-Sul do Brasil, que *P. graminis-tritici* possui habilidade para fluxo gênico de longa distância e a predominância de um sistema reprodutivo misto, corroborando

observações anteriores de Maciel et al. (2014). Essas características classificam *P. graminis-tritici* como patógeno de alto potencial evolutivo no agroecossistema brasileiro (MCDONALD; LINDE 2002a; MCDONALD; LINDE 2002b). Esse cenário de alto potencial evolutivo para *P. graminis-tritici* é, provavelmente, responsável pela alta variabilidade genético-fenotípica observada em populações do patógeno (URASHIMA et al., 2004; MACIEL et al., 2008) e pela inconsistência e baixa durabilidade da resistência de cultivares de trigo à brusone no Brasil (GOULART; PAIVA, 1992; GOULART et al., 1995; MACIEL et al., 2008; CRUZ et al., 2010). Indicam, assim, que o controle da brusone baseado em genes maiores de resistência deve ser implementado com cuidado para evitar a emergência de virulência nas populações do patógeno (CERESINI, 2011).

As evidências genético-populacionais obtidas com este estudo indicaram que os ascósporos podem estar desempenhando papel importante no ciclo da brusone e na manutenção da diversidade genética de populações de *P. graminis-tritici* do trigo no Brasil. Em contraste com o patógeno da brusone do trigo, uma estrutura genética clonal foi postulada para populações mundiais de *P. oryzae* do arroz, exceto ao longo dos pés do Himalaia, na Ásia. Este é o único local no mundo onde os dois tipos de acasalamento de *P. oryzae* do arroz estão freqüentemente presentes, onde isolados fêmea férteis foram identificados (capazes de produzir peritécios e ascósporos) e onde a diversidade genética do fungo era mais alta. (THARREAU et al., 2009; CERESINI, 2011). Foi sugerido que esta área do Himalaia poderia ser o centro de origem do fungo da brusone do arroz e que a reprodução sexuada em *P. oryzae* foi perdida em outras partes do mundo seguindo eventos de migração e de efeitos fundadores. Seguindo esta linha de raciocínio, seria plausível afirmar que o centro de origem da brusone do trigo poderia estar no Centro – Sul do Brasil, porque a reprodução sexual em *P. graminis-tritici* é generalizada nestas áreas de cultivo de trigo (THARREAU et al., 2009; CERESINI, 2011).

Tabela 7. Estimativa de equilíbrio gamético em populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras poáceas e de *P. oryzae* patótipo *Oryza* de arroz no Centro-Sul do Brasil

População	Número de loci monomórficos	Pares de loci em desequilíbrio gamético significativo ^a	Proporção	Correção de Bonferroni para α^b	MAT 1-1 (%)	MAT 1-2 (%)	Proporção MAT1-1: MAT1-2	I _A ^c	$\bar{r}_D^c$	P ^c
<i>Pyricularia graminis-tritici</i>										
<i>Triticum</i>										
2005_W	3	5 of 28	0,18	0,00183	81,0	19,0	4:1	1,818	0,263	< 0,001
DFGO_W	1	0 of 45	0,00	0,00114	99,1	0,04	1:0	-0,191	-0,022	0,850
MG_W	2	1 of 36	0,03	0,00142	100,0	0,0	1:0	0,177	0,022	0,097
MS_W	1	6 of 45	0,13	0,00114	77,8	22,2	4:1	0,648	0,073	< 0,001
PR_W	1	0 of 45	0,00	0,00114	90,9	9,1	10:1	-0,093	-0,011	0,777
RS_W	2	1 of 36	0,03	0,00142	73,7	26,3	3:1	0,041	0,005	0,365
SP_W	3	0 of 28	0,00	0,00183	96,3	3,7	26:1	0,039	0,006	0,347
Outras poáceas										
MS_P	1	0 of 45	0,00	0,00114	23,1	76,9	1:4	0,694	0,079	0,001
PR_P	3	0 of 28	0,00	0,00183	66,7	33,3	2:1	-0,079	-0,012	0,608
<i>Pyricularia oryzae</i> patótipo <i>Oryza</i>										
Arroz	4	0 of 21	0,00	0,00244	5,0	95,0	1:20	0,137	0,023	0,216

^a Teste exato de Fisher (BONFERRONI 1935), usando o programa GENEPOP versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSER, 1995), a $p \leq 0,05$, após ajuste de Bonferroni (1935) para múltiplas comparações. ^b Valor de α após a correção de Bonferroni usado para comparações múltiplas no cálculo de pares de locos em desequilíbrio significativo. $\alpha = 0,05$. ^c I_A e $\bar{r}_D$ são índices de desequilíbrio multiloci; $\bar{r}_D$ é ajustado pelo número de loci. O cálculo dos valores de I_A e $\bar{r}_D$ e suas respectivas significâncias foi efetuado de acordo com Agapow e Burt (2001) usando-se software Multilocus (AGAPOW; BURT 2001). Testado a hipótese nula de completa panmixia (ou seja, de nenhuma ligação entre pares de loci), com base em 1.000 aleatorizações.

Fonte: Elaboração do autor

Tabela 8. Desvios da frequência entre os tipos de acasalamento *MAT1-1* e *MAT1-2* detectados em populações de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo e de outras espécies de poáceas no Centro Sul do Brasil em função da resistência a fungicidas estrobirulinas (QoI) ^a

Condição de resistência a fungicidas estrobirulinas (QoI) e tipos de acasamento	Populações									Proporção observada <i>MAT1-1</i> : <i>MAT1-2</i>	Qui-quadrado (χ^2) para conformação à proporção esperada de 1:1
	<i>Triticum</i>					Outras poáceas					
	DF-GO_W	MG_W	MS_W	PR_W	RS_W	SP_W	MS_P	PR_P	Totais observados		
QoI Resistente											
<i>MAT1-1</i>	23	22	29	39	14	26	3	7	163	14.8	2321,8****
<i>MAT1-2</i>	0	2	7	1	0	0	1	0	11	1.0	$p \leq 0,001$
QoI Sensível											
<i>MAT1-1</i>	0	0	3	3	5	1	3	3	18	1.2	4,77 ^{NS}
<i>MAT1-2</i>	0	0	5	1	0	0	9	0	15	1.0	$p = 0,688$
Número total de genótipos multiloci analisados por população	23	24	44	44	19	27	16	10	207		

^a Os dados fenotípicos e genotípicos da condição de resistência a fungicidas QoI são aqueles publicados por Castruagudín *et al.* (2014)

Fonte: Elaboração do autor

4 CONCLUSÕES

A maioria das populações geográficas contemporâneas de *Pyricularia graminis-tritici* do trigo não são subdivididas, indicando mecanismo eficiente de fluxo gênico.

Há predominância de um sistema reprodutivo misto nas populações de *P. graminis-tritici* do trigo.

A magnitude e a extensão do fluxo gênico entre populações geográficas de *P. graminis-tritici* do trigo, o sistema reprodutivo predominantemente sexual, aliados a alta diversidade genética do fungo, indicam um patógeno com alto potencial evolutivo no agroecossistema brasileiro.

Outras espécies de poáceas podem ter importante papel no ciclo de vida, na biologia reprodutiva, na manutenção e na dispersão do inóculo do patógeno à curta e à longa distância.

Os padrões contemporâneos de fluxo gênico e genotípico entre populações hospedeiro-distintas do patógeno reforçam a hipótese de que a brusone do trigo pode ter tido origem *de novo* a partir de populações endêmicas de *P. graminis-tritici* que infectam outras espécies de poáceas, nativas ou invasoras de áreas de trigo no país.

REFERÊNCIAS

- AGAPOW, P.-M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular ecology notes**, v.1, n.1-2 p.101-102, 2001.
- AVERNA-SACCA, R. "Brusone" do arroz. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 291-302, 1912. Doi:10.1094/PHYTO.2003.93.10.1274.
- BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A. C. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 10, p. 1274-1284., 2003.
- BERNARDES DE ASSIS, J.; PEYER, P.; RUSH, M. C.; ZALA, M.; MCDONALD, B. A.; CERESINI, P. C. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. 12, p. 1326-1333, 2008.
- BONFERRONI, C. E. Il calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste. In: _____. **Studi in onore del professore Salvatore Ortu Carboni**. Rome: [s. n.], 1935. p. 13-60.
- BROWN, A. H. D., FELDMAN, M. W.; NEVO, E. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. **Genetics**, Bethesda, v. 96, p. 523–536, 1980.
- BRUVO, R., MICHELIS, N. K., D'SOUZA, T. G., SCHULENBURG, H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 13, n. 7, p. 2101-2106, 2004. Doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x.
- BUCHELI, E.; GAUTSCHI, B.; SHYKOFF, J. A. Host-specific differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* as revealed by microsatellites. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 13, n. 2, p. 188-198, 2000.
- CALLAWAY E. Devastating wheat fungus appears in Asia for first time. **Nature**, London, v. 532, n. 2, p. 421–422, 2016.
- CASTROAGUDÍN, V. L.; CERESINI, P. C.; DE OLIVEIRA, S. C.; REGES, J. T. A.; MACIEL, J. L. N.; BONATO, A. L. V.; DORIGAN, A. F.; MCDONALD, B. A. Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 105, n. 3, p. 284-294, 2014.
- CASTROAGUDÍN V.L, MOREIRA S.I, PEREIRA D.A.S., MOREIRA.S.S., BRUNNER, P.C., MACIEL J.L.N, CROUS.P.W, MCDONALD.B.A, ALVES E., CERESINI. P.C. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. **Persoonia**, Leiden, v. 37, p. 199–216, 2016.
- CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, n. 2, p. 409 – 419, 2010.
- CERESINI, P. C.; SHEW, H. D.; JAMES, T. Y.; VILGALYS, R. J.; CUBETA, M. A. Phylogeography of the solanaceae-infecting Basidiomycota fungus *Rhizoctonia solani* AG-3

based on sequence analysis of two nuclear DNA loci. **BMC evolutionary biology**, London, v. 13, n. 7, p. 163, 2007.

CERESINI, P. C. **Estrutura genética de populações do patógeno da brusone do trigo *Magnaporthe oryzae* no Brasil. (Livre Docente)**. 2011. 116 f. Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2011.

CONSOLO, V. F.; CORDO, C. A.; SALERNO, G. L. Mating-type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 160, n. 4, p. 285-290, 2005.

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**, Dordrecht, v. 94, n. 4, p. 683-693, 2002.

COUCH, B. C., FUDAL, I., LEBRUN, M.-H., THARREAU, D., VALENT, B., VAN KIM, P., NOTTEGHEM, J.-L., KOHN, L. M. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, Bethesda, v. 170, n. 2, p. 613-630, 2005.

CROLL, D. **The origin of wheat blast in Bangladesh**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <<https://github.com/crolllab/wheat-blast>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

CRUZ, M. F.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N.; SCHEEREN, P. L. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical plant pathology**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 24-31, 2010.

CSARDI G, NEPUSZ T. The igraph software package for complex network research. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPLEX SYSTEMS – ICCS, 2006, Boston. **Proceedings...** Boston: [s. n.], 2006. p. 1-9.

DUVEILLER, E.; HODSON, D.; TIEDMANN, A. Wheat blast caused by *Magnaporthe grisea*: a reality and new challenge for wheat research. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 8., 2010, St. Petersburg. **Proceedings...** St. Petersburg: Vavilov Research Institute of Plant Industry, 2010. p. 247-248.

EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and applied genetics**, Heidelberg, v. 92, n. 7, p. 832-839, 1996.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Pittsburg, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, Auckland, v. 1, n.2, p.47-50, 2005.

GARNIER-GERE, P., DILLMANN, C. A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 83, n. 3, p. 239, 1992.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A.; MESQUITA, N. A. Ocorrência da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*) em Mato Grosso do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 15, n. 1, p. 112-114, 1990.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A. Incidência da brusone (*Pyricularia oryzae*) em diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 17, n. 3, p. 321-325, 1992.

GOULART, A. C. P.; PAIVA, F. A.; ANDRADE, P. J. M. Relação entre a incidência da brusone em espigas de trigo e a presença de *Pyricularia grisea* nas sementes colhidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 2, p. 184-189, 1995.

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

GOULART, A. C. P.; SOUSA, P. G.; URASHIMA, A. S. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 358-363, 2007.

HUYSE, T.; POULIN, R.; THERON, A. Speciation in parasites: a population genetics approach. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 469-475, 2005.

IGARASHI, S., UTIAMADA, C. M., IGARASHI, L. C., KAZUMA, A. H., LOPES, R. S. *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 11, n. 3, p. 351-352, 1986.

KAMVAR, Z. N., TABIMA, J. F., GRUNWALD, N. J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ**, London, v. 2, p. 281, 2014. Doi:10.7717/peerj.281.

KATO, H.; YAMAMOTO, M.; YAMAGUCHI-OZAKI, T.; KADOUCHI, H.; IWAMOTO, Y.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S.; MORI, N. Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. **Journal of General Plant Pathology**, Tóquio, v. 66, n. 1, p. 30-47, 2000.

MACIEL, J. L. N.; PALUDO, E. A.; SILVA, M. S.; SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E. **Reação à brusone de genótipos de trigo do programa de melhoramento da Embrapa Trigo no estádio de planta adulta**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 14 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, v. 64)

MACIEL, J. L. N., CERESINI, P. C., CASTROAGUDIN, V. L., KEMA, G. H. J., MCDONALD, B. A. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 1, p. 95-107, 2014.

MALAKER, P. K.; REZA, M. M. A.; HAKIM, M. A.; BARMA, N. C. D.; MANNAF, M. A.; KHALEQUE, M. A.; ISLAM, R.; TIWARI, T.; DUVEILLER, E. Occurrence of wheat blast in Bangladesh. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON WHEAT BLAST, 2., 2016, Florianópolis. **Anais...** Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2016. p. 128.

MANLY, B. F. J. **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology**. 2 ed., London: Chapman & Hall / CRC, 1991.

MAYNARD SMITH, J.; SMITH, N. H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B. G. How clonal are bacteria? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v. 90, n. 10, p. 4384-4388, 1993.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Dordrecht, v. 124, n. 2, p. 163-180, 2002a.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002b.

MEHTA, Y. R.; BAIER, A. Variação patogênica entre isolados de *Magnaporthe grisea* atacando triticales e trigo no estado do Paraná. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 24, n.2, p. 119-125, 1998.

MEIRMANS, P. G., VAN TIENDEREN, P. H. Genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. **Molecular ecology notes**, Chichester, v. 4, n. 4, p. 792-794, 2004.

MEKWATANAKERN, P. et al. Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n.10, p. 939-945, 1999.

MURAKAMI, J.; TOMITA, R.; KATAOKA, T.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Analysis of host species specificity of *Magnaporthe grisea* toward foxtail millet using a genetic cross between isolates from wheat and foxtail millet. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n.10, p. 42-45, 2003.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. **Genetics**, Pittsburg, v. 89, n.3, p. 538-590, 1978.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia Univ. Press, 1987.

OU, S. H. Blast. In: OU, S. H. (Ed.). **Rice diseases**. 2. ed. Wallingford: CAB International, 1985. p. 109-201.

PEREIRA, J. F.; CONSOLI, L.; BOMBONATTO, E. A. S.; BONATO, A. L. V.; MACIEL, J. L. N. Development of genomic SSR markers and molecular characterization of *Magnaporthe oryzae* isolates from wheat in Brazil. **Biochemical Genetics**, New York, v. 52, n. 1, p. 52-70, 2014.

PRABHU, A. S.; ARAUJO, L. G. D.; FAUSTINA, C.; BERNI, R. F. Estimativa de danos causados pela brusone na produtividade de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 9, p. 1045-1051, 2003.

R_CORE_TEAM. R: a Language and Environment for Statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013.

RAYMOND, M., ROUSSET, F. Genepop (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 86, n.3, p. 248-249, 1995.

REGES, J. T. A.; NEGRISOLI, M. M.; DORIGAN, A. F.; CASTROAGUDÍN, V. L.; MACIEL, J. L. N.; CERESINI, P. C. *Pyricularia pennisetigena* and *P. zingibericola* from invasive grasses infect signal grass, barley and wheat. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 2, p. 206-214, 2016.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Pittsburg, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotype diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**, Pittsburg, v. 118, p. 705-711, 1988.

STUKENBROCK, E. H.; BANKE, S.; JAVAN-NIKKHAH, M.; MCDONALD, B. A. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. **Molecular biology and evolution**, Cary, v. 24, n. 2, p. 398-411, 2007.

STUKENBROCK, E. H., MCDONALD, B. The origins of plant pathogens in agroecosystems. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 75-100, 2008.

TAKABAYASHI, N.; TOSA, Y.; OH, H. S.; MAYAMA, S. A gene-for-gene relationship underlying the species-specific parasitism of *Avena/Triticum* isolates of *Magnaporthe grisea* on wheat cultivars. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 11, p. 1182-1188, 2002.

THARREAU, D.; FUDAL, I.; ANDRIANTSIMIALONA, D.; SANTOSO, U. D.; FOURNIER, E.; LEBRUN, M. H.; NOTTÉGHÉ, J. L. In : WANG, G.-L.; VALENT, B. (Ed.) **Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease**. New York : Springer, 2009. p. 209-215.

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

TREDWAY, L. P.; STEVENSON, K.; AND BURPEE, L. Mating type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from turfgrasses in Georgia. **Plant disease**, St. Paul, v. 87, n. 4, p. 435-441, 2003.

URASHIMA, A. S.; IGARASHI, S.; KATO, H. Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. **Plant disease**, St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1211-1216, 1993.

URASHIMA, A. S. et al. Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homolog of retrotransposon MGR583. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 65, n. 4, p. 429-436, 1999.

URASHIMA, A. S. Variation in virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in São Paulo State. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 1, p. 109-115, 2002.

URASHIMA, A. S. et al. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n.5, p. 511-518, 2004.

URASHIMA, A. S.; GALBIERI, R.; STABILI, A. DNA fingerprinting and sexual characterization revealed two distinct populations of *Magnaporthe grisea* in wheat blast from Brazil. **Czech jornal of genetics and plant breeding**, Prague, v. 41, p. 238-245, 2005.

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

XU, J. R., HAMER, J. E. Assessment of *Magnaporthe grisea* Mating type by Spore PCR. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, n. 42, p. 80, 1995.

ZHAN, J.; PETTWAY, R. E.; MCDONALD, B. A. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 3, p. 286-297, 2003.