

Avaliação da Reação de Resistência dos Genótipos de Azevém Anual (*Lolium multiflorum*) à Brusone (*Pyricularia grisea*)

Cley Donizeti Martins Nunes¹
Andrea Mittelman²

Introdução

O azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma planta forrageira importante para criação de bovinos, por causa de seus altos níveis de palatabilidade e digestibilidade. Nas zonas temperadas do mundo, é amplamente cultivada, devido à resistência à geadas, podendo ser utilizado para pastejo, como feno ou silagem.

Atualmente, a produção dessa forrageira é prejudicada pelos danos causados pela brusone. Essa doença ocorre no Brasil e em todas regiões do mundo que cultivam essa gramínea.

O agente causal da doença é um fungo, denominado *Pyricularia grisea*. Esse patógeno infecta os tecidos em todas as fases de desenvolvimento da planta, desde o início da vegetativa até a reprodutiva. Nas folhas, as lesões se caracterizam por formato alongado, com bordos finos e de coloração marrom, com centro grizáceo, onde aparecem as frutificações do fungo (Figura 1). Na espiga, a infecção pode ocorrer

em diferentes alturas do eixo floral (ráquis), no momento ontogênico da espiga, apresentando, no ponto de infecção, coloração parda, provocada pela colonização do tecido, que estrangula e impede a passagem de nutrientes, implicando, conseqüentemente, a esterilidade das espiguetas (NUNES; MITTELMANN, 2009).



Foto: Cley Nunes

Figura 1. Sintomas de brusone na folha e na espiga da planta de azevém. Embrapa Clima Temperado, Capão do Leão, 2017.

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

² Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

O dano mais severo da brusone na cultura do azevém ocorre na fase de espigamento, esterilizando todas as glumas. Em determinados anos, a epidemia, em certos locais de cultivo no Rio Grande do Sul, pode comprometer a produtividade das sementes em até 100% (NUNES et al., 2003).

A doença também ocorre em mais de 50 espécies de gramíneas que foram identificadas como hospedeiras, com destaque para várias culturas economicamente importantes, tais como arroz, trigo, triticale, aveia, cevada, centeio, e forrageiras como milheto (*Pennisetum glaucum*), braquiárias (*Urochloa* spp.), azevém (*Lolium* spp.), festuca (*Festuca* spp.), kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) (OU, 1985; COUCH; KOHN, 2002; HARMON; LATIN, 2003).

Os relatos de ocorrência da brusone no azevém anual são mais recentes, quando comparados com os do arroz: em 1969, no Japão; em 1972, nos Estados Unidos, na Louisiana e no Mississipi (KUSABA et al., 2006); e em 2001 no Brasil, no Rio Grande do Sul (NUNES et al., 2001).

Estudos de inoculação cruzada, com os isolados de *Pyricularia* de gramíneas nativas e de arroz, evidenciaram que várias cultivares de arroz foram suscetíveis aos isolados obtidos de *Rottboellia exaltata*, *Echinochloa colona*, e *Leersia hexandra*. Similarmente, *Brachiaria distachya*, *E. colona*, *Leptochloa chensis*, *T. exaltata* e *L. hexandra* foram suscetíveis para alguns isolados originados de arroz (MACKILL; BONMAN, 1986).

A identificação da espécie do patógeno *Pyricularia* é designada quando associada ao hospedeiro: *oryzae* para o arroz e *grisea* para outras gramíneas (OU, 1985). Posteriormente, propuseram referir-se coletivamente aos fungos de brusone de várias plantas de gramíneas uma única espécie, *Pyricularia grisea*, (incluindo o arroz e as gramas), o que implica que o teleomorfo desse patógeno seja denominado como *Magnaporthe grisea* (ROSSMAN et al., 1990).

Em estudos de genealogia compreendendo três genes, actina, beta-tubulina e calmodulina, na preferência pelo hospedeiro e nos resultados de infertilidade de acasalamentos feitos em laboratório com a forma perfeita do fungo, foram obtidas evidências de que há duas espécies distintas: *M.*

grisea e *M. oryzae* (COUCH; KOHN 2002). Esses últimos autores consideram *P. oryzae* como uma espécie envolvida na brusone do arroz e também atacando algumas outras espécies de gramíneas, e *P. grisea* como sendo uma espécie de espectro mais amplo, que ataca outras gramíneas e plantas em outras famílias. Enfatizam que o nome de *M. oryzae* é o mais correto para isolados associados à brusone do arroz.

Segundo Kusaba et al. (2006), usando o método de diagnóstico para a identificação de espécies, a amplificação por PCR de uma região do gene da beta-tubulina, seguido por uma restrição de deleção com HpaII, identificou o patógeno de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) como *P. oryzae*.

Recentemente, verificou-se que o agente causal da brusone do trigo de Kentucky, Estados Unidos, diferente do trigo da América do Sul, é muito semelhante ao do azevém anual que prevalece na América do Norte, sugerindo que esse patógeno, *P. oryzae*, de hospedeiros de azevém anual ganhou a habilidade genética de infectar o trigo (PRATT, 2012).

Estudo de Farman (2002) indicou que a grande maioria dos isolados de azevém perene testados eram distintos dos isolados de trigo, com base em *fingerprints* obtidas com Pot2 e MGR583. Além disso, os isolados de azevém perene estavam intimamente relacionados com *Festuca arundinacea* L. e distintos dos isolados de arroz e das gramas *Digitaria* spp. e *Setaria* spp. Segundo Farman et al. (2017), há suspeita de que a ocorrência de brusone de trigo nos Estados Unidos provavelmente foi causada por uma cepa (patótipo) que evoluiu a partir de planta de *Lolium*, e não por uma introdução exótica da América do Sul.

A natureza da resistência da brusone no azevém é muito pouco estudada. Por ser uma cultura alógama, possui resistência horizontal maior, que dificulta disseminação da doença principalmente nas condições de campo e possibilita o manejo da doença (NUNES; MITTELMANN, 2006; NUNES et al., 2003). Esse tipo de resistência horizontal está presente em maior ou menor grau em todas as culturas, principalmente nas alógamas (ALLARD, 1971). Ela envolve maior número de genes e em conjunto atuam na disseminação lenta da doença (NUNES; MITTELMANN, 2006). Estão incluídos os

genes de resistência vertical (com maior expressão) e outros com participação menor, ou seja, não específicos para o controle da doença, mas que participam de outros processos fisiológicos normais da planta (NELSON, 1975).

A resistência horizontal está associada à alta taxa de alogamia, com plantas que cruzam naturalmente ao acaso dentro da mesma população, promovendo a recombinação de genes, o que dificulta a completa adaptação do patógeno (ALLARD, 1971). Portanto, esses genes podem se expressar em classes de resistência distintas em conformidade com o arranjo, e manifestar interações diferenciais entre as raças do patógenos. Da mesma maneira, as raças agressivas também podem apresentar virulência e patogenicidade diferentes.

O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade entre populações de azevém em termos da reação de resistência dos genótipos a diferentes isolados de *Pyricularia* coletados de azevém subespontâneo no município de Capão do Leão.

Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e Casa de Vegetação da Estação Experimental de Terras Baixas da Embrapa de Clima Temperado, localizada no município de Capão do Leão, RS.

Utilizou-se sete isolados e sete populações no delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições em arranjo de parcelas subdivididas. Na parcela o isolado, e nas subparcelas as sete populações de azevém.

Para o ensaio, foram usados setes isolados de *Pyricularia* coletados de folhas e/ou espigas de azevém subespontâneo, de diferentes áreas de pastagem do município, isolados e armazenados em papel a temperatura de 3 °C (Tabela 1).

A produção de inóculo foi feita com o cultivo de sete isolados do fungo *P. oryzae* em meio de aveia, próprio para esporulação, e incubado durante um período de 12 a 15 dias, sob luz fluorescente (12 horas iluminado / 12 horas no escuro), sob temperatura de 24 °C e, posteriormente, preparado com água destilada.

As sete populações de azevém avaliadas foram obtidas do programa de melhoramento genético da Embrapa, incluindo três cultivares comerciais (Tabela 1).

A semeadura ocorreu em 10/05/2015, em copos plásticos de volume de 350 mL, contendo solo do tipo Planosolo Háplico, sem adubação de base, posteriormente foram colocadas as oito cultivares em bandejas (30 cm x 40 cm x 4 cm) e mantidas em casa de vegetação.

Para se aumentar a predisposição à brusone, quando as plantas atingiram os estádios de duas a três folhas, foram adubadas com ureia, em quantidade equivalente a 0,5 g de nitrogênio por m².

As inoculações dos isolados de *P. oryzae* foram realizadas quando as plantas diferenciais atingiram a fase de quatro a seis folhas, pulverizando-se uma suspensão de esporos do fungo em uma concentração de $4,0 \times 10^5$ esporos mL⁻¹, com o auxílio de um pulverizador (marca Brudden), com pressão constante e volume de 60 mL de inóculo por bandeja. As plantas foram mantidas em câmara de incubação sob temperatura de 20-28 °C e umidade relativa superior a 90%, por 10 dias, com luz do ambiente (Figura 2).



Foto: Clei Nunes

Figura 2. Câmara de incubação de plantas de azevém inoculadas com *Pyricularia grisea*. Embrapa Clima Temperado, Capão do Leão, 2017.

As avaliações das reações das cultivares aos isolados de *P. oryzae* foram realizadas aos 7 e 10 dias após a inoculação, atribuindo-se notas de 0 a 9 (IRRI 2000): as notas de 0 a 2 foram consideradas

como resistentes ou incompatíveis, 3 como mediamente resistente, e 4 a 9 como suscetíveis.

Os dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ e submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott, no nível de 5% de probabilidade de erro. Para a análise, utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

Resultados e Discussão

Os dados de patogenicidade dos sete isolados e das reações de resistência dos sete genótipos encontram-se na Tabela 1.

Na avaliação das médias de patogenicidade, os sete isolados foram agrupados em dois grupos. O primeiro grupo com os isolados 300 e 301, que se caracterizam pelas semelhanças entre si, com notas médias 7,9 e 8,3, respectivamente, e com diferenças significativas na probabilidade de 5% de erro no teste de Scott Knott para os demais, que compõem o segundo grupo, como 229, 234, 244, 251 e 288.

Os isolados que causaram epidemias mais severas de brusone, 300 e 301, apresentam patogenicidade semelhante e, portanto, aparentam ser o mesmo patótipo ou raça. Esses isolados mais virulentos e com maior capacidade patogênica, ou seja, maior capacidade de causarem epidemias intensas nos diferentes genótipos de azevém estudados, são, portanto, os mais adaptados para sobreviverem no ambiente.

Tabela 1. Médias das notas para reação de resistência de sete genótipos de azevém e de patogenicidade de sete isolados (patótipos) de *Pyricularia grisea* no ano agrícola 2015. Capão do Leão/RS, Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas, 2017.

Isolados	Cultivares							Média	CV
	141	182	223	224	FABC1	BRS Integração	BRS Ponteio		
229	6,0Aa	7,8Ba	4,8Aa	6,0Aa	6,8Ba	6,0Aa	7,5Ba	6,4a	9,72
234	7,5Ba	7,0Ba	6,0Aa	7,8Ba	8,3B b	5,5Aa	8,0Ba	7,1a	
244	6,8Aa	7,0Aa	6,8Ab	8,0Aa	7,8Aa	6,3Aa	7,8Aa	7,2a	
251	7,3Aa	7,0Aa	6,8Ab	7,0Aa	5,5Aa	7,0A b	7,5Aa	6,9a	
288	7,3Aa	7,3Aa	6,8Ab	6,8Aa	8,3A b	6,8A b	8,0Aa	7,3a	
300	7,5Aa	8,3Aa	7,5Ab	7,3Aa	8,8A b	8,0A b	7,8Aa	7,9b	
301	8,0Aa	8,5Aa	8,3Ab	8,5Aa	8,5A b	8,0A b	8,5Aa	8,3b	
Média	7,2B	7,6B	6,7A	7,3B	7,7B	6,8A	7,9B		
CV				8,38					

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si significativamente pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05\%$).

Enquanto isso, no outro grupo, com as menores notas médias, os isolados tiveram três comportamentos de patogenicidade diferentes entre si, nos sete genótipos, com indicativo de serem patótipos diferentes. No primeiro, com maior suscetibilidade, as reações dos isolados 244, 251 e 288 foram semelhantes entre si, em todos os sete genótipos. O segundo, isolado 234, teve as patogenicidades semelhantes entre si nos genótipos 141, 182, 224, FABC1 e BRS Ponteio, e diferentes nos de 223 e BRS Integração, que assemelharam entre si, com notas médias menores de 6,0 e 5,5, respectivamente. O terceiro e último comportamento foi o do isolado 229, que teve as patogenicidades semelhantes entre si nos genótipos 182, FABC1 e BRS Ponteio, e que diferenciaram das reações de 141, 223, 224 e BRS Integração, mas foram semelhantes entre si, com as menores notas médias, de 6,0, 4,8, 6,0 e 6,0, respectivamente.

A variabilidade de reações de suscetibilidade apresentada pelo *Pyricularia grisea* está de acordo com resultados obtidos com arroz por Nunes et al. (2014). Segundo os autores, o fungo *Pyricularia oryzae* possui alta variabilidade genética, e raças prevalentes podem ter as suas frequências modificadas de forma gradativa dentro da população e, com o tempo, tornarem-se mais agressivas aos genótipos de arroz irrigado.

As médias de suscetibilidade dos sete genótipos de azevém aos sete isolados de *Pyricularia grisea* agruparam-se em dois grupos, com diferenças significativas entre si, no nível de 5% de probabilidade de erro. O grupo de menor suscetibilidade ou maior tolerância à brusone foi formado pelos genótipos 223 e BRS Integração, com notas médias de 6,7 e 6,8, respectivamente, e o de maior suscetibilidade pelos genótipos 141, 182, 224, FABC1 e BRS Ponteio.

No grupo de maior suscetibilidade à brusone, os genótipos tiveram dois tipos de comportamentos em relação aos sete isolados. As reações de suscetibilidades de 141, 182, 224 e BRS Ponteio foram semelhantes entre si para todos os sete isolados, ou seja, com 5% probabilidade, pode-se afirmar que tiveram a mesma genética de resistência à brusone. Enquanto que FABC1 teve seu comportamento diferenciado desses genótipos, principalmente aos isolados 229, 244 e 251.

No grupo de menor suscetibilidade à brusone, o genótipo 223 expressou maior reação de tolerância, apenas para dois isolados, 229 e 234. Enquanto isso, com BRS Integração, essa reação foi maior por acrescentar mais um isolado, 244, ou seja, para três isolados (229, 234 e 244), portanto, nesse genótipo podem estar atuando mais genes de reação de resistência. Esse foi o menos suscetível comparando-se com todos os sete genótipos estudados.

O genótipo BRS Ponteio, lançado em 2003, tornou-se muito mais suscetível, provavelmente em virtude da adaptação do fungo *Pyricularia grisea* ao longo do período de cultivo em grandes áreas de pastagem, comparado com os demais, que estão restritos aos ensaios do programa de melhoramento.

Conclusões

Os sete genótipos de azevém anual possuem variabilidade quanto à reação de resistência com os diferentes isolados de *Pyricularia* coletados do azevém subespontâneo no município de Capão do Leão.

Os sete isolados de *Pyricularia* possuem variabilidade em patogenicidade sobre os genótipos de azevém.

Os genótipos de menor suscetibilidade ou maior tolerância à brusone foram 223 e BRS Integração, para o conjunto de isolados avaliados.

Referências

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Rio de Janeiro: Edgar Blucher, 1971. 382 p.

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. p. 683-693, 2002.

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**, S. Paul, v. 92, p. 245-254, 2002.

FARMAN, M.; PETERSON, G.; CHEN, L.; STARNES, J.; VALENT, B.; BACHI, P.; MURDOCK, L.; HERSHMAN, D.; PEDKEY, K.; FERNANDES, J. M.; BAVARESCO, J. The *Lolium* pathotype of *Magnaporthe oryzae* recovered from a single blasted wheat plant in the United States. **Plant Disease**, S. Paul, v. 101, n. 5, p. 684-692, 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.

HARMON, P. F.; LATIN, R. Gray leaf spot of perennial ryegrass. **Plant Health Progress**, p. 2003-1223, Dec. 2003. Disponível em: <<https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2003/ryegrass>>/<https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2003/ryegrass/>>. Acesso em: 09 nov. 2016.

IRRI (International Rice Research Institute). **Standard evaluation system for rice (SES)**. Manila, Philippines, 2000. 56 p.

KUSABA, M.; HIRAT, K.; SUMIDA, Y.; YAMAGASHIRA, A.; KONAGAI-URATA, H.; YAEGASHI, H. Molecule genetic characterization and host specificity of

Pyricularia isolates from annual ryegrass in Japan. **Plant Pathology Journal**, v. 51, n. 1, p. 72-79, 2006.

MACKILL, A. O.; BONMAN, J. M. New hosts of *Pyricularia oryzae*. **Plant Disease**. Manila, v. 70, n. 2, p.125-127, 1986.

NELSON, R. R. Horizontal resistance in plants: concepts, controversies and application. In: HORIZONTAL RESISTANCE TO THE BLAST OF RICE SEMINAR. **Proceedings...** Cali, 1975. p. 1-20. (Série CE-9).

NUNES, C. D. M.; BRANCÃO, N.; RODRIQUES, R. C.; REIS, J. C. **Ocorrência de brusone em azevém**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. 2 p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 40).

NUNES, C. D. M.; MITTELMANN, A. Avaliação da reação de resistência de campo dos genótipos de azevém à brusone, ano agrícola 2005. In: REUNIÃO DO GRUPO TÉCNICO EM FORRAGEIRAS DO CONE SUL - GRUPOS CAMPOS, 21., 2006, Pelotas. **Desafios e oportunidades do bioma campos frente à extensão e intensificação agrícola**: palestras e resumos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 2 v. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 166).

NUNES, C. D. M.; MITTELMANN, A. **Doenças do azevém**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 40 p. (Embrapa Clima Temperado. Documento Técnico, 279).

NUNES, C. D. M.; MITTELMANN, A.; BRANCÃO, N. Avaliação da reação de resistência a brusone em genótipos de azevém (*Lolium multiflorum*

Lam.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, Suplemento, p. S298, ago. 2003. Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36., Brasília, 2003. Resumo 454.

NUNES, C. D. M.; MOTA, M. S.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Variabilidade de *Pyricularia oryzae* Cav. em genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 3, p. 263-270, 2014.

OU, H. S. **Rice Diseases**. 2. ed. Kew: Commonwealth Micological Institute, 1985. 380 p.

PRATT, K. UK researchers find important new disease. **UK AgNews**, University of Kentucky, College of Agriculture, Food and Environment, Lexington, KY, April 24 2012. Disponível em: <<http://news.ca.uky.edu/article/uk-researchers-find-important-new-disease>>. Acesso em: 02 mar. 2014.

ROSSMAN, A. Y.; HOWARD, R. J.; VALENT, B. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. **Mycologia**, v. 82, n. 4, p. 509-512, 1990.

Comunicado Técnico, 350

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392, Km 78, Caixa Postal 403
Pelotas, RS - CEP 96010-971

Fone: (53)3275-8100

www.embrapa.br/clima-temperado

www.embrapa.br/fale-conosco/sac



1ª edição

Obra digitalizada (2017)

Comitê de Publicações

Presidente: Ana Cristina Richter Krolow

Vice-Presidente: Enio Egon Sosinski Junior

Secretária-Executiva: Bárbara Chevallier Cosenza

Membros: Ana Luiza Barragana Viegas, Fernando Jackson, Marilaine Schaun Pelufê, Sonia Desimon

Expediente

Revisão do texto: Bárbara C. Cosenza

Normalização bibliográfica: Marilaine Schaun Pelufê

Editoração eletrônica: Fernando Jackson