



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1678-9601

Janeiro, 2007

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22

Novos aspectos da patogenicidade de *Magnaporthe grisea*

Marta Cristina Filippi
Carlos Cortes
Janna Beckerman
Jim Sweigard
Barbara Valent
Carlos Gonzalez
Daniel Ebbole

Santo Antônio de Goiás, GO
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462 - Km 12 - Zona Rural - Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 3533 2123

Fax: (62) 3533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Carlos Agustín Rava*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Membro: *Anne Sitarama Prabhu*

Valácia Lemes da Silva Lobo

Supervisor editorial: *Marina Aparecida de Oliveira*

Revisão gramatical: *Marina Aparecida de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Capa: *Mariana Sousa Bernardes*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2006): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Novos aspectos da patogenicidade de *Magnaporthe grisea* / Marta Cristina Filippi ... [et al.]. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

36 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9571 ; 22)

1. Arroz – Doença de planta. 2. Brusone – Arroz. I. Filippi, Marta Cristina. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 633.1894 (21. ed.)

© Embrapa 2006

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	14
Resultados e Discussão	17
Conclusões	29
Referências Bibliográficas	31

Novos aspectos da patogenicidade de *Magnaporthe grisea*

*Marta Cristina Fillipi*¹

*Carlos Cortes*²

*Janna Beckerman*³

*Jim Sweigard*⁴

*Barbara Valent*⁵

*Carlos Gonzalez*⁶

*Daniel Ebbole*⁷

Resumo

A brusone do arroz, causada pelo Ascomiceto *Magnaporthe grisea* Barr (*Pyricularia grisea* anamorph Cav.), ocorre em todas as regiões produtoras de arroz no mundo. Hoje é considerada a doença mais destrutiva desta cultura causando perdas de até 100%, dependendo da suscetibilidade da cultivar, do manejo da cultura e das condições climáticas. A uniformidade genética do hospedeiro, a adoção de alta tecnologia sem manejo adequado e a alta variabilidade genética do patógeno compõem um cenário perfeito para a ocorrência de epidemias alarmantes de brusone, de difícil previsão e controle. Atualmente a biotecnologia dispõe de ferramentas valiosas para ajudar na busca de uma medida de controle da brusone tendo em vista a segurança ambiental. Mas, para um amplo aproveitamento destas ferramentas, torna-se necessário um estudo mais aprofundado da biologia do patógeno. Alguns fungos fitopatogênicos, para

¹ Engenheira Agrônoma, Ph. D. em Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, Rod. GO 462, Km 12, 75375-000 Santo Antônio de Goiás-GO cristina@cnpaf.embrapa.br

² Biólogo, Ph. D, Plant Genetic Eng. Unidad Irapuato. Km 9,6 Libramiento Norte, Irapuato, 36500,MX

³ Fitopatologista, Ph. D, Dept of Plant Pathology, Extension Service, University of Minnesota, St. Paul,MN-55113, USA

⁴ Geneticista, Ph.D., Dept genomics DuPont, Delaware Technology Park, Newark, DE-19714-6104, USA

⁵ Fitopatologista, PhD, Professor Titular, Department of Plant Pathology, Kansas State University, Manhattan, KS-66506-5502, USA

⁶ Bacteriologista, Ph.D. Professor Titular, Department of Plant Pathology and Microbiology. Texas A&M University, College Station, TX 77843. USA

⁷ Bioquímico, Ph.D. em Bioquímica, Professor Titular, Programa de Biologia de Fungos Filamentosos Department of Plant Pathology and Microbiology. Texas A&M University, College Station, TX 77843. USA d-ebbole@tamu.edu

perfurar a superfície foliar e dar início à colonização, formam o apressório, uma estrutura especializada formada por diferenciação celular considerada adaptada dentro do processo evolutivo. O principal objetivo deste estudo foi identificar e analisar o papel que o gene *PTH1* exerce na formação e maturação do apressório em *M. grisea*. Isolados de *M. grisea* mutantes (denominado *pth1*) para o gene *PTH1* são incapazes de perfurar o tecido do hospedeiro para dar início à colonização e assim estabelecer uma interação patógeno-hospedeiro. Todavia, os isolados mutantes são capazes de colonizar o tecido vegetal quando injetados dentro do hospedeiro. Esses isolados mutantes possuem quantias reduzidas de glicogênio e lipídios que podem ser os causadores do atraso de quatro horas no processo de germinação dos conídios e, como consequência, ter uma redução da pressão de turgor dentro das células apressoriais, causando uma deformação dos apressórios. O mutante *pth1* foi complementado com seu ortólogo de *Neurospora crassa* e recuperou sua forma selvagem, o que leva a especular que *PTH1* não evoluiu especificamente como componente da patogenicidade em *M. grisea*. Consistente com estas observações, sabe-se que *PTH1* possui homologia com o gene *GRR1* em *Sacharomyces cerevisiae*. O gene *GRR1* codifica uma proteína F box., que é componente do módulo E3 (grupo de enzimas ligases de uma ubiquitina), e participa deste complexo como uma molécula identificadora de proteínas que devem ser degradadas.

Termos para indexação: fertilização com potássio, *Oryza sativa* L., potássio.

New Aspects of *Magnaporthe Grisea* Pathogenicity

Abstract

Magnaporthe grisea Barr, a heterothallic ascomycete, causes rice blast, a serious disease on rice plants that is responsible for significant yield losses all around the world. Rice blast can cause yield losses up to 100% depending on cultivar susceptibility, environmental conditions and management system.

The genetic uniformity of host plant, the adoption of high input technology without adequate management practices, and the high pathogen variability jointly constitute a perfect scenery for the occurrence of alarming rice blast epidemics which are difficult to forecast and employ proper control measures. Currently, biotechnology offers powerful tools to develop control measures that are appropriate for environmental security. The detailed studies on biology of the pathogen are necessary to utilize the molecular tools.

Many plant pathogenic fungi differentiate a highly specialized infection structure, called an apossorium to host penetration and derive nutrients and energy from the cells. The apossorium formation is considered a well adapted strategy within the evolutionary process based on the fact that fungi from different taxa are able to form apossoria. The main objective of this work was to identify and analyse the role of PTH1 in apossorio formation and maturation. *M. grisea* PTH1 mutants, denominated *pth1*, are unable to penetrate host tissue and to establish a successful host-parasite interaction. However, *pth1* mutants are capable of colonizing plant tissue following wound inoculation. *pth1* conidia have a

germination lag that results in a delay in apressorio formation for about 4 hours. This may be related to the finding that pth1 mutant conidia have reduced amounts of glycogen and lipids. However, accumulation of glycogen and lipid in appressoria appears to be similar to wild type after about 12-16 hours of germination. Appressoria turgor pressure is reduced in the pth1 mutants and a fraction of pth1 appressoria are deformed. Since the orthologous gene of Neurospora crassa is capable of complementing the pathogenesis defect of pth1 mutants the biochemical function of pth1 has not evolved specifically to play a role in appressorium development of M. grisea; this is consistent with the view that PTH1 is part of E3 ubiquitin ligase, required to control the levels of a variety of cellular proteins.

Index terms: Potassium fertilization, potassium dissolution, Oryza sativa L., potassium rock.

Introdução

O arroz, *Oryza sativa*, é a fonte de 20% de calorias e 13% de proteínas consumidas no mundo (FAO, 2004). Mais de quatro quintos do arroz mundial é produzido e consumido por produtores localizados em países da América do Sul, Ásia e África. A quantidade média de arroz consumida nesses países varia de 100 a 240 kg por ano (FAO, 2004) por habitante. Atualmente, a população mundial é de 6.2 bilhões habitantes. Em 2030, as expectativas para a população mundial será de 8.2 bilhões de habitantes, e a demanda mundial de arroz está projetada para aproximadamente 533 milhões de toneladas de arroz (FAO, 2004).

O Brasil é o maior produtor de arroz de terras altas do mundo, responsável pela produção de 41% do arroz produzido na área nacional, em 2,3 milhões de hectares (64% da área total). Sua produtividade de 1895 kg/ha é considerada baixa quando comparada com o potencial das cultivares melhoradas e as tecnologias já desenvolvidas para este sistema. Os principais fatores responsáveis pela queda da produtividade do arroz de terras altas são os constantes veranicos e a alta incidência de brusone (Prabhu et al., 2002).

A brusone do arroz, causada pelo Ascomiceto *Magnaporthe grisea* Barr (*Pyricularia grisea* anamorfo Cav.), ocorre em todas as regiões produtoras de arroz no mundo e é considerada uma das doenças mais destrutivas dos campos produtores de arroz, causando perdas de até 100%. Em 2003, na Índia, a brusone do arroz foi responsável por perdas em torno de 266 mil toneladas de arroz, correspondendo a 0,8% da produção total indiana. No Japão, a brusone afeta aproximadamente 865 mil hectares de arroz todos os anos. Nas Filipinas, os arrozais podem sofrer até mais de 50% de perda devido à ocorrência de brusone (Blast, 2006). No Brasil, as perdas em arroz de terras altas chegaram a 59,6% (Prabhu et al., 2003).

O manejo para o controle de brusone requer a interação da resistência genética das cultivares de arroz com o manejo da cultura e, em alguns casos, o uso de produtos químicos. Diversas cultivares com diferentes graus de resistência foram lançadas ao longo dos anos, porém a limitada durabilidade da resistência genética torna o manejo integrado uma prática instável para o controle da brusone. A limitada durabilidade da resistência atribui-se à grande variabilidade genética da população do patógeno (Valent, 1990), que permite o aumento da frequência de uma ou mais raças virulentas na população do patógeno, principalmente quando esta população se combina com hospedeiro geneticamente uniforme e com baixos níveis de resistência varietal. Entender a interação de um patógeno com seu hospedeiro é ponto de partida para identificar medidas alternativas de controle da brusone econômica e ecologicamente sustentáveis.

Para um fungo fitopatogênico ser bem sucedido na colonização de seu hospedeiro muitas etapas precisam ser vencidas. Essas etapas são compostas de transformações físicas e bioquímicas, as quais juntas compõem o ciclo de vida desse organismo. A patogenicidade é considerada uma característica complexa, que inclui todas as etapas do processo de colonização, como a capacidade de crescer e de causar desordem no metabolismo celular do hospedeiro. Identificar genes de patogenicidade torna-se um grande desafio em um organismo como *M. grisea*, que exibe um alto grau de especialização patogênica. Estudar a patogênese de *M. grisea* permite explorar alternativas de controle da brusone nas folhas que atuem na fase da pré-infecção, antes que o fungo dê início ao processo de colonização do hospedeiro, resguardando assim o potencial produtivo das cultivares geneticamente melhoradas (Rao, 1995).

O ciclo de vida de *M. grisea* encontra-se ilustrado na Figura 1 (Xu & Hamer, 1996). O inóculo primário pode ser disperso pelo vento, água ou sementes infectadas. O conídio entra em contato com a superfície foliar do hospedeiro e adere-se a ela com a ajuda de uma mucilagem preexistente em uma bolsa localizada na extremidade do conídio. Estudos mostram que esta mucilagem é adesiva devido à sua composição de carboidratos e glicoproteínas (rico em resíduos de α -glucosil e/ou manosil) (Howard & Valent, 1996; Leite et al., 1997). Para a penetração e colonização do tecido foliar é necessária a formação de uma célula especializada chamada apressório. A colonização de plantas hospedeiras suscetíveis desencadeia uma desorganização do metabolismo celular, resultando na formação de lesões típicas. Do tecido colonizado são produzidos esporos assexuais que darão início a um novo ciclo. O ciclo de infecção completa-se em cinco dias.

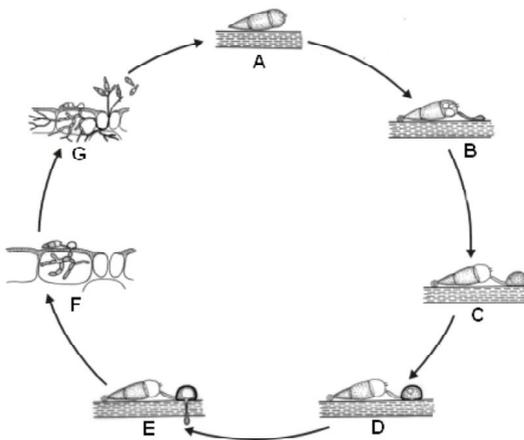


Fig. 1. Ciclo infeccioso de *Magnaporthe grisea*. A) Dispersão; B) adesão e alongamento do tubo germinativo; C) formação do apressório; D) amadurecimento do apressório; E) formação do grampo de penetração e penetração do tecido do hospedeiro; F) colonização do hospedeiro; G) emissão de esporos assexuais.

Fonte: Filippi, 2004.
Adaptado por Xu et al. 1996.

Apressório é uma estrutura desenvolvida por vários fungos para penetrar a superfície foliar do hospedeiro (Lengeler et al., 2000). Frank, em 1883, ao identificar uma doença do feijoeiro causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, também relatou a formação de uma estrutura que se formou no final do tubo germinativo e que era capaz de aderir, pressionar e perfurar a superfície foliar do hospedeiro, denominada pelo autor de *apressorium* (Deising et al., 2000). Esta estrutura é capaz de exercer pressão e gerar turgor hidrostático para romper a barreira imposta pela parede celular do hospedeiro (Howard & Ferrari, 1989). Além do apressório ser essencial para a colonização do hospedeiro por alguns fitopatógenos, também permite estudos comparativos a níveis de biologia e genética molecular entre outros fungos filamentosos, estabelecendo paralelos importantes para o estudo da patogênese de fungos (Wendland, 2001; Kulkarni et al., 2004; Mitchell et al., 2003; Xu & Xue., 2002).

Biologia da formação do apressório em *M. grisea*

Conídios de *M. grisea* aderem-se à superfície foliar indutiva do hospedeiro e, em duas horas, germinam e se alongam formando o tubo germinativo. Na extremidade do tubo germinativo inicia-se uma diferenciação celular para formar a célula gancho. O núcleo celular do conídio divide-se mitoticamente, e um dos núcleos filhos se transfere para a célula gancho, antes da formação de um septo que separa o apressório imaturo do conídio e do tubo germinativo. Neste momento, uma camada de melanina começa a ser depositada na parte superior do apressório. No lado inferior, que está em contato direto com a superfície foliar (ou substrato), a parede celular permanece fina, sem a deposição de melanina (Howard & Ferrari, 1989). Nesta região forma-se o chamado “anel O”, estrutura que permite a adesão do apressório à superfície foliar (Bourett & Howard, 1990). Nas 24 horas seguintes, inicia-se um movimento de glicogênio e lipídios para dentro do apressório, que se acumulam e são degradados em glicerol, gerando altos níveis de pressão intracelular (Talbot, 1999, 2003; Thines et al., 2000; Filippi et al., 2003; Filippi, 2004). O grampo de penetração é formado para iniciar o processo de invasão foliar (Clergeot et al., 2001).

Rotas metabólicas da formação do apressório

A comunicação entre planta hospedeira e fungo fitopatogênico é feita através de troca de sinais, que se inicia quando há um contato entre eles. Aspectos como topografia da superfície foliar e sinais químicos podem desencadear processos programados de diferenciação celular, resultando em patogênese, caso os sinais

sejam reconhecidos pelo fungo como favoráveis para o desenvolvimento (Kolattukudy & Roger, 1995). A formação do apressório envolve processos morfogênicos complexos, os quais são influenciados por vários estímulos ambientais. Estes sinais podem ser químicos, da planta hospedeira, tais como os componentes da cutícula foliar, ou físicos, como a hidrofobicidade e topografia da superfície foliar (Gilbert et al., 1996; Dean, 1997; Lee et al., 2003). As mesmas rotas metabólicas envolvidas na formação do apressório em *M. grisea* foram também identificadas nos patógenos de seres humanos, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, nos fitopatógenos *Ustilago maydis*, *Cryphonectria parasitica* e nos fungos filamentosos *Aspergillus nidulans* and *N. crassa* (Lengeler et al., 2000). Em cada caso, estas rotas metabólicas participam do crescimento e desenvolvimento desses organismos (Dean, 1997; Lee et al., 2003).

Os genes envolvidos na (s) rota (s) de formação do apressório em *M. grisea* encontram-se detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Genes envolvidos na (s) rota (s) de formação do apressório em *Magnaporthe grisea*.

Gene	Proteína	Função	Referência
<i>MPG1</i>	Hidrofobina	Aumenta o contato entre superfície foliar e pontas de hifa	Talbot, et al. 1993
<i>PTH11</i>	Transmembrana	Recebe sinal indutivo da superfície hidrofóbica	DeZwaan et al., 1999
<i>MagB</i>	Subunidade á da proteína G	Estimula a enzima Adenilil ciclase	Liu & Dean (1997); Kulkarni & Dean (2004)
<i>Mac 1</i>	Adenilil ciclase	Controla níveis celulares de AMP cíclico	Choi & Dean (1997)
<i>CPKA</i>	Subunidade catalisadora da proteína quinase dependente de AMP cíclico	Fosforila a proteína mitógena quinase (MAP KKK)	Mitchell & Dean (1995); Xu et al. (1997); Bindslev et al. (2004)
<i>PMK1</i>	Proteína mitógena quinase	Fosforila o fator de transcrição	Xu & Hamer (1996)
<i>MPS1</i>	Proteína mitógena quinase	Fosforila o fator de transcrição	Xu & Staiger (2004); Xu et al. (1998)
<i>MST12</i>	Fator de transcrição	Regulação gênica	Park et al. (2002)
<i>MGB1</i>	Subunidade b da proteína G	Não identificada	Nishimura et al (2004)

Caracterização do gene PTH1

Até o momento pouco se sabe como ocorre a conexão entre os eventos fisiológicos, a transdução de sinais e as atividades enzimáticas durante a formação do apressório. Valent (1990), para estudar genes envolvidos neste processo, conduziram uma mutagênese insercional (REMI), identificaram e clonaram sete genes que, de alguma forma, afetavam a patogenicidade de

isolados de *M. grisea* em cevada (*Hordeum vulgare*), arroz e capim chorão (*Eragrostis curvula*). Entre estes sete genes, Beckerman (1997) caracterizou e seqüenciou o PTH1, como também determinou que este gene possui homologia com o gene GRR1 em *Sacharomyces cerevisiae*. Isolados de *M. grisea* com uma mutação no gene PTH1 produzem apressórios deformados e incapazes de infectar plantas de arroz (Figura 2).



Apressórios formados pelo tipo selvagem

Fig. 2. Apressórios normais do tipo selvagem (4091) (A) e apressórios deformados no tipo mutante *pth1* (B).



Apressórios deformados, formados pelo tipo mutante

O gene GRR1, em *S. cerevisiae*, codifica uma proteína F-box, a qual é conhecida por participar do progresso do ciclo celular e pela capacidade de detectar a presença ou ausência de nutrientes.

A modificação pós-transducional de proteínas, evento dependente de ubiquitina e de outras proteínas similares, é um mecanismo regulatório essencial em processos biológicos específicos, tais como controle do ciclo celular, ativação da

transcrição, transdução de sinal e proteólise intracelular dependente do proteossoma 26S. Esta via de modificação é composta por um processo dinâmico, reversível e controlado pela ação de múltiplas enzimas distintas. A ubiquitina é conhecida como uma pequena proteína altamente conservada, presente em todas as células eucarióticas, que se liga covalentemente a lisinas de outras proteínas. A ligação de uma molécula de proteína a uma cadeia de ubiquitina marca e identifica esta molécula protéica para destruição proteolítica intracelular no proteossomo.

A conjugação da ubiquitina e moléculas protéicas relacionadas é catalisada pela ação sucessiva de três módulos de enzimas: a ativadora de ubiquitina (E1), a conjugadora (E2) e a ligase (E3). Proteínas F-box, codificadas pelo gene *GRR1*, são componentes do módulo E3 e participam deste complexo como moléculas identificadoras de proteínas que devem ser degradadas. Os demais módulos E1 e E2 participam na mobilização e degradação, respectivamente.

Uma vez que os apressórios formados pelos mutantes *pth1* são deformados e incapazes de penetrar a superfície foliar, devido à sua incapacidade de gerar pressão de turgor (Beckerman, 1997), estas investigações concentraram-se em detectar o papel que este gene, *PTH1*, desempenha no metabolismo de carboidratos para gerar a pressão requisitada durante a maturação do apressório.

Para testar esta hipótese, caracterizou-se e comparou-se o fenótipo do tipo selvagem *PTH1* com o tipo mutante *pth1* quanto à pressão de turgor gerada e quanto à mobilização das reservas de carbono. Uma vez que *pth1* parece participar de eventos específicos da formação do apressório, também analisou-se comparativamente a performance do gene ortólogo de *pth1* isolado do organismo modelo *N. crassa*.

Materiais e Métodos

Isolados

Isolados do tipo selvagem e mutantes de *M. grisea* foram cedidos pela Dra. Bárbara Valent e armazenados a -20° C, depois de crescidos em discos de papel de filtro estéreis seguidos de dessecação. Todos os isolados utilizados neste estudo encontram-se relacionados na Tabela 2. Para promover a esporulação os

isolados foram cultivados em meio BDA (Batata dextrose agar + 100mg/mL de ampicilina) e transferidos para meio de aveia (50g de aveia por litro + 100mg/mL de ampicilina + 25 mg/mL de cloranfenicol) e mantidos a 25° C sob luz contínua, durante dez dias.

Tabela 2. Nome, origem e fenótipo patogênico dos isolados utilizados neste estudo.

Isolado	Hig ^R	Patogenicidade	Origem
4091-5-8**	S / S	+	Isolado em laboratório, tipo selvagem
CP2789	R / S	-	4091-5-8 <i>PTH1</i> :: mutante com inserção Hig
CP2791	R / S	-	4091-5-8 <i>PTH1</i> :: mutante com inserção Hig
CP2790*	R / S	+	4091-5-8 <i>PTH1</i> :: inserção Hig, integrado ectopicamente
CP987***	S / S	+	Isolado em laboratório, tipo selvagem
CP2780	R / S	-	CP987 <i>PTH1</i> :: mutante com inserção Hig
CP2782	R / S	-	CP987 <i>PTH1</i> :: mutante com inserção Hig
CP 2783	R / S	+	CP987 <i>PTH1</i> :: inserção Hig, integrado ectopicamente

Resistente a Higromicina (R), suscetível a higromicina (S), *integrado ectopicamente; **Não patogênica ao arroz, patogênica a cevada; ***patogênico ao arroz.

Teste de patogenicidade

Plantas de arroz (cultivar M201) e de cevada (cultivar Bonanza), contendo de três a quatro folhas, foram inoculadas por dois métodos, pulverização e injeção. A solução de inóculo foi preparada em solução de gelatina (0,25%) a uma concentração final de $3,0 \times 10^5$ esporos/mL. A inoculação por pulverização foi feita até que as plantas ficassem totalmente cobertas por gotículas da solução de inóculo, evitando o ponto de escorrimento. A injeção de 0,5 mL da solução de inóculo, na região da bainha foliar, constituiu o segundo método de inoculação. A avaliação de ambos os métodos foi feita sete dias após a inoculação com o auxílio de uma lupa e uma câmara digital

Experimento para observação da plasmólise das células apressoriais

Colônias de todos os isolados *M. grisea*, selvagens e mutantes, com 10 a 12 dias de idade, foram utilizadas para o preparo da solução de inóculo em tampão fosfato (50 mM, pH 6,6). A concentração da solução foi ajustada para 1×10^5 conídios/mL depois de filtrada em papel Miracloth, para a remoção de fragmentos de hifas.

Gotas da solução de esporos (10 μ L) foram colocadas sob lâminas plásticas hidrofóbicas (Fisher Scientific) e incubadas em câmara úmida durante 16 horas, a 25 °C, para induzir a formação de apressórios. As lâminas contendo os apressórios formados foram submersas, durante três minutos, em soluções de KCl, em diferentes concentrações (0,5 M, 1,0 M, 1,5 M, 2,0 M e 2,5 M).

Com o auxílio do microscópio identificaram-se e quantificaram-se as células apressoriais colapsadas e plasmolisadas, após submersão em cada concentração de KCL.

Experimento de folhas destacadas

Folhas destacadas de cevada foram arranjadas em uma placa de petri, em condições de câmara úmida. Em seguida estas folhas foram inoculadas por pulverização com uma suspensão de esporos ($3,0 \times 10^5$ conídios/mL) dos isolados tipo selvagem, mutante *pth1* e mutante ectópico. Após a inoculação, as folhas foram incubadas a 25 °C, por 96 horas. As observações foram feitas após fixação do tecido vegetal com uma solução de lactofenol, durante 16 horas, e desclorofilação, utilizando-se uma solução de lactofenol e etanol (1:1, vol:vol). Os fragmentos de tecidos vegetais foram aquecidos durante um hora, a 95 °C, por duas vezes. O tecido foi submetido a coloração, durante duas horas a 25 °C com uma solução 0,01% de anilina azul, em solução de etanol-ácido láctico e fenol (1:1:1) (Oh Lee, 2000). O número de apressórios formados que penetraram a superfície foliar, iniciando a colonização do tecido foram observados e documentados, com o auxílio de um microscópio e uma câmara digital.

Análise citológica

Para a análise citológica, na qual foi monitorado o movimento de lipídios e glicogênio durante a formação do apressório, foram preparadas soluções de inóculo, para cada isolado, como descrito nos experimentos anteriores. Induziu-se a formação de apressórios por 4, 8, 12 e 24 horas a 25 °C, em superfície plástica hidrofóbica, na ausência ou presença de triclazole (10 μ g/mL). O triclazole inibe a síntese de melanina, portanto são formados apressórios albinos.

Utilizando-se uma solução corante Nile Red (Thines et al., 2000), foi possível visualizar a presença e o movimento de lipídios contidos em vacúolos, nas células conidiais, nas células recém-germinadas, nos apressórios imaturos e maduros, dos isolados selvagens e mutantes. A solução Nile Red foi preparada

em 50 mM de Tris/tampão maleato, pH7,5, com 20 mg/mL de polivinilpyrrolidone e 2,5 μ g/mL Nile Red Oxane (Sigma). As gotas de lipídios presentes nas células florescem-se quando coradas com a solução de Red Nile, quando observadas sob luz ultravioleta.

Utilizando-se uma solução corante de 60 mg/ml of KI e 10 mg/mL de I₂ (Thines et al., 2000), foi possível visualizar a presença e o movimento do glicogênio, contido nas células conidiais, nas células recém-germinadas e nos apressórios imaturos e maduros, dos isolados selvagens e mutantes. A presença de glicogênio confere uma coloração amarelada, visível à luz branca. As imagens observadas foram obtidas utilizando-se um microscópio óptico e câmara digital Q-Fire.

Método Estatístico

As médias de três repetições da porcentagem de apressório colapsado quando submerso em solução de KCl, nas concentrações 3 M, 1,5 M, 1,0 M, 0,5 M foram analisadas por análise de variância, programa SPSS (SPSS 11.0), e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Resultados e Discussão

Patogenicidade dos mutantes *pth1*

As reações das plantas de arroz pulverizadas com os isolados CP 987 (selvagem), CP 2780 e CP 2782 (mutantes) e CP 2783 (transformado ectopicamente) encontram-se na Tabela 3. Apenas os isolados CP 987 (selvagem) e CP 2783 foram capazes de infectar as plantas de arroz e produziram lesões típicas de brusone sete dias após a inoculação por pulverização. Entretanto, todos os isolados, quando injetados, foram capazes de infectar as plantas de arroz, produzindo sintomas típicos da brusone (Tabela 3).

As reações das plantas de cevada pulverizadas com os isolados CP 4091-5-8 (selvagem), CP 2789 e CP 2790 (mutantes) e CP 2791 encontram-se na Tabela 3. Apenas os isolados CP 4091-5-8 (selvagem) e CP 2783 (transformado ectopicamente) foram capazes de infectar as plantas de cevada, produzindo lesões típicas de brusone sete dias após a inoculação por pulverização. Todos os isolados quando injetados foram capazes de infectar as plantas de cevada, produzindo sintomas típicos de brusone (Tabela 3, Figura 3A-B).

Tabela 3. Avaliação qualitativa de plantas de arroz e cevada sete dias após inoculações pelos métodos de pulverização e injeção, com os isolados tipos selvagens e mutantes de *Magnaporthe grisea*.

Isolado	Planta ¹	Arroz ²		Cevada ²	
		Pulv	Injeção	Pulv	Injeção
4091 (tipo selvagem)	PI-1	R	RH(local) ³	S	S
	PI-2	R	RH(local) ³	S	S
	PI-3	R	RH(local) ³	S	S
	PI-4	R	RH(local) ³	S	S
	PI-5	R	-		S
CP 2789 (mutante <i>pth1</i>)	PI-1	R	RH(local) ³	R	S
	PI-2	R	RH(local) ³	R	S
	PI-3	R	RH(local) ³	R	S
	PI-4	R	RH(local) ³	R	S
	PI-5	R	RH(local) ³	R	S
CP 2790 (ectópico)	PI-1	R	RH(local) ³	S	S
	PI-2	R	RH(local) ³	S	S
	PI-3	R	RH(local) ³	S	S
	PI-4	R	RH(local) ³	S	S
	PI-5	R	RH(local) ³	S	S
CP 2791 (mutante <i>pth1</i>)	PI-1	R	RH(local) ³	R	S
	PI-2	R	RH(local) ³	R	S
	PI-3	R	RH(local) ³	R	S
	PI-4	R	RH(local) ³	R	R
	PI-5	R	RH(local) ³	R	S
CP 987 (tipo selvagem)	PI-1	S	S	S	S
	PI-2	S	S	S	S
	PI-3	S	S	S	-
	PI-4	S	S	S	-
	PI-5	S	S	S	-
CP 2780 (mutante <i>pth1</i>)	PI-1	R	S	R	S
	PI-2	R	S	R	S
	PI-3	R	S	R	S
	PI-4	R	S	R	-
	PI-5	R	-	R	-
CP 2782 (mutante <i>pth1</i>)	PI-1	R	S(local)	R	S
	PI-2	R	S(local)	R	S
	PI-3	R	S(local)	R	S
	PI-4	R	S(local)	R	S
	PI-5	R	S(local)	R	S
CP 2783 (ectópico)	PI-1	S	S	S	S
	PI-2	S	S	S	S
	PI-3	S	S	S	S
	PI-4	S	S	S	-
	PI-5	S	S	S	-
Controle(H ₂ O) ⁴		R	R	R	R

1-As plantas foram avaliadas separadamente; 2- reações: R = reação resistente, RH = reação hipersensibilidade, S = reação susceptibilidade; 3-Local, os sintomas foram observados apenas no local da inoculação; 4-Controle: plantas inoculadas com água pelos dois métodos em estudo.

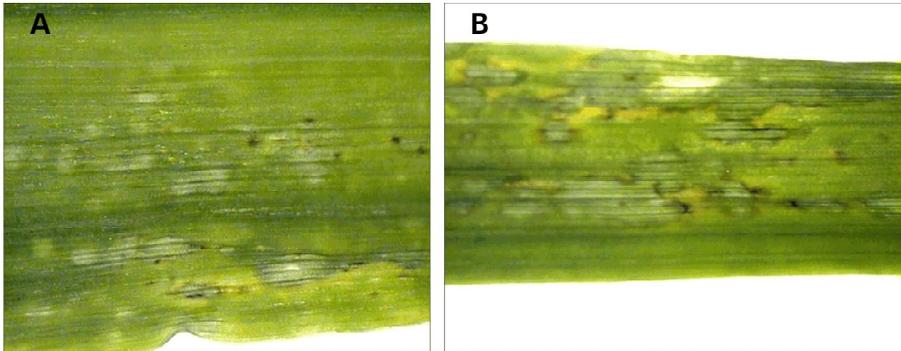


Fig. 3. Sintomas da doença quatro dias após inoculação por injeção, com isolado mutante *pth1* (A) e o tipo selvagem (B).

Experimento de folhas destacadas

As folhas destacadas de cevada, inoculadas com a suspensão do isolado 4091-5-8, apresentaram sintomas típicos da brusone quatro dias após a inoculação (Figura. 4A). Depois de fixado, conforme descrito anteriormente, foi possível observar as hifas infecciosas desenvolvendo-se sob a camada cuticular, emergentes do apressório formado na superfície foliar (Figura 4B).

O isolado mutante *pth1*, CP2789 não foi capaz de infectar as folhas de cevada destacadas inoculadas (Figura 4C). As hifas emergentes do apressório formado na superfície foliar foram incapazes de penetrar na superfície cuticular do tecido vegetal (Figura 4D)

Experimento para observação da plasmólise das células apressoriais

Os isolados do tipo selvagem 4091-5-8 e CP987 e os tipos ectópicos CP2790 e CP2783 formaram apressórios tipicamente melanizados (Figura 2A). Os tipos *pth1* mutantes CP2789, CP2791, CP2780 e CP2782 produziram apressórios melanizados, porém, um número significativo desses apressórios (10% - 30%) são deformados (Figura 2B). Surgiu, então, a dúvida quanto à causa da deformação desses apressórios. Seria uma anormalidade morfológica ou uma pressão de turgor inadequada, quando comparada com o tipo selvagem? Para testar estas duas hipóteses foi determinada a resistência destes apressórios à pressão osmótica.

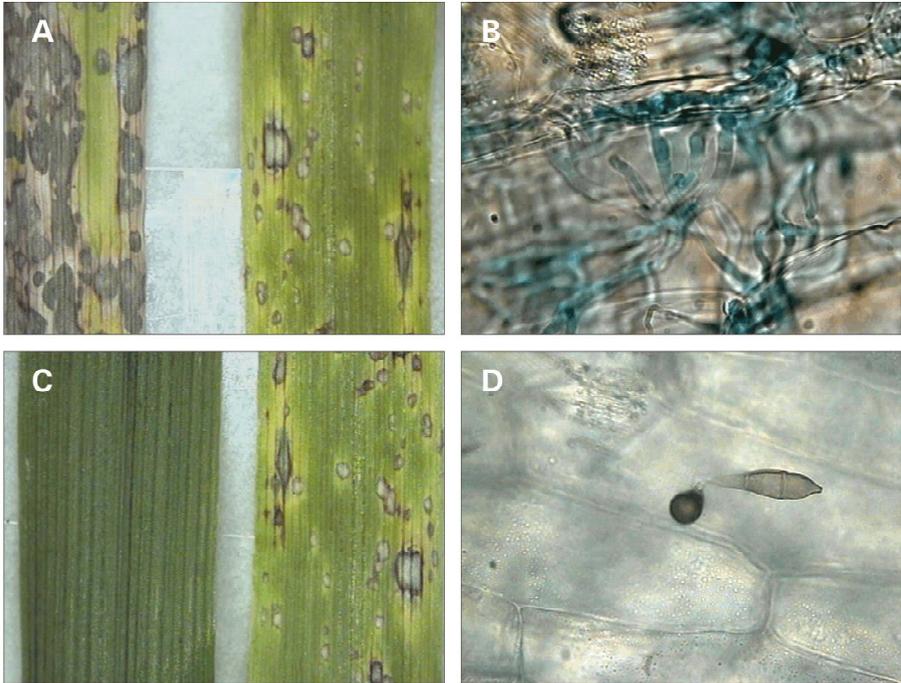


Fig. 4. Tipo selvagem (4091) (A, B) e mutante *pth1* CP 2789 (C, D) 96 h após inoculação em folhas de cevada.

A alta concentração de solutos externos ao apressório podem provocar a saída, de dentro das células apressoriais, de solutos menos concentrados, levando estes apressórios ao colapso. O objetivo desta metodologia foi demonstrar que, normalmente, os apressórios resistem a alta pressão osmótica, sem contudo sofrer plasmólise, mas, se a concentração extracelular for maior que a intracelular, os apressórios podem sofrer colapso (Howard & Ferrari, 1991).

Pôde-se observar que todos os isolados testados tiveram os apressórios colapsados depois de três minutos de submersão em solução de KCl 3M (Figura 5).



Fig. 5. Mutante *pth1* com apressórios colapsados após tratamento com solução KCl.

As porcentagens médias de apressórios colapsados, quando submersos em diferentes concentrações de solução KCl, encontram-se na Figura 6. Ambos os tipos, selvagem e mutante, tiveram os apressórios colapsados nas concentrações 3 e 1,5 M de KCl (Figura 6 A, B)

Houve diferença significativa em relação às médias dos apressórios colapsados, do tipo selvagem e do tipo mutante quando submersos em solução 1,0 M KCl (Figura 6C). Tudo indica que a concentração interna dos apressórios no mutante *pth1* é similar a 1,0 M, e a concentração interna dos demais isolados é maior, conferindo-lhes maior resistência ao colapso. Os mutantes CP2782 (97%), CP2780 (81%), CP2789 (79%) e CP2791 (75%) foram mais sensíveis à solução de KCl, seguido dos transformantes ectópicos CP2783 (51%) e CP2791 (48%) e tipos selvagens CP987 (48%) e 4091-5-8 (30%). Os mutantes *pth1* foram mais sensíveis à solução de KCl, seguidos dos transformantes ectópicos e tipos selvagem. A mesma tendência foi observada quando os apressórios foram expostos à solução 0,5 M KCl, os mutantes *pth1* mostraram-se mais sensíveis e colapsaram em maior frequência que os isolados ectópicos e os selvagens (Figura 6D). Quando submerso na solução KCl, 0,5 M, os isolados CP2782 e CP2780 foram claramente mais sensíveis que os isolados selvagens.

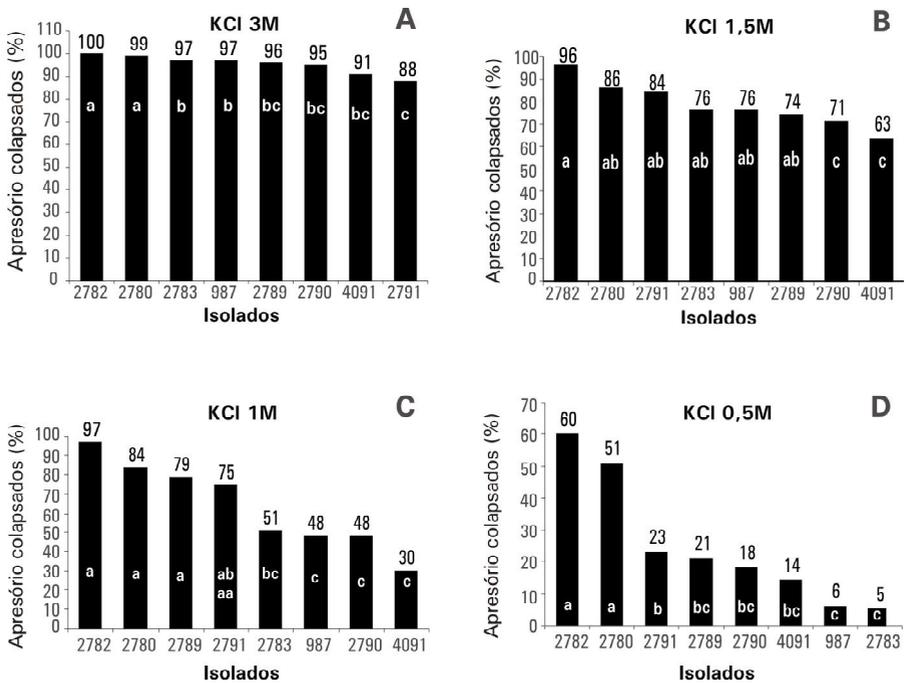


Fig. 6. Média dos apresórios colapsados nas soluções KCl 3M (A), 1,5M (B), 1,0 M (C), and 0,5 M (D) nos tipos selvagens, 4091 e CP 987, transformantes ectópicos 2790 e 2783, e mutantes *pth1* 2782, 2780, 2791, e 2789.

Análise citológica

A quantidade de glicogênio e lipídios presentes nos conídios dos tipos selvagens e mutantes *pth1* pode ser qualificada após aplicação de corantes específicos para cada uma dessas substâncias. Conídios dos isolados selvagens 4091-5-8 e mutante *pth1* CP2789 mostraram uma diferença nítida quanto à quantidade de glicogênio e lipídios presentes nesta primeira fase de indução da formação de apresórios (Figura 7). Os conídios dos mutantes *pth1* mostraram uma coloração menos intensa tanto para glicogênio como para lipídio.

Como foi possível detectar diferenças na quantidade dessas substâncias nas células conidiais, resolveu-se monitorar o movimento dessas moléculas durante a formação do apresório.

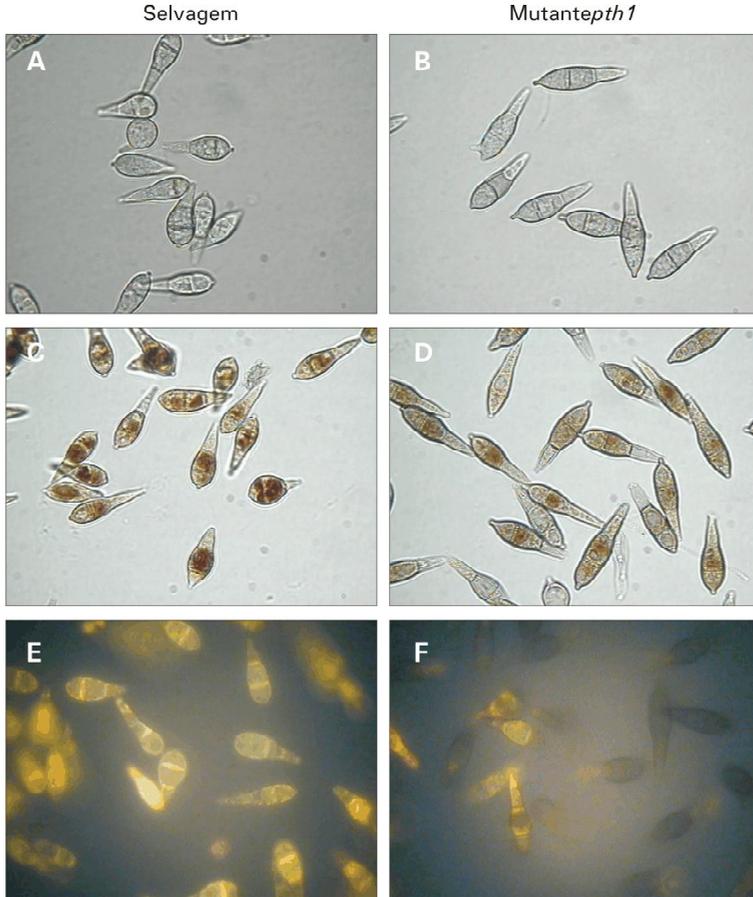


Fig. 7. Controle (A, B), coloração de glicogênio (C, D), e lipídio (E, F) durante a formação de apressório, 0 horas após indução nos isolados 4091-5-8 (tipo selvagem) e CP2789 (mutante *pth1*).

A germinação dos conídios dos mutantes *pth1* mostrou-se atrasada quando comparada com o tipo selvagem. Quatro horas após a germinação, os isolados selvagens desenvolveram as células gancho (Figura 8 A-B), e até alguns apressórios imaturos já eram visíveis. A observação do glicogênio no estágio de formação da célula gancho acusou uma concentração maior deste elemento na célula gancho em formação, ou no apressório imaturo, e uma menor quantidade deste elemento no tubo germinativo (Figura 8 C-D). Pouco ou quase nenhum glicogênio pôde ser observado nos conídios. Quanto ao lipídio, este mostrou-se

concentrado no apressório imaturo (Figura 8 E-F). O mutante *pth1* não formou a célula gancho quatro horas após a indução e o glicogênio mostrou-se abundante nos conídios, diferente do observado nas células gancho formadas pelo tipo selvagem. Observou-se uma deslocação dos lipídios nas pontas de hifas dos mutantes (Figura 8F). Concluiu-se que ocorre um movimento, ainda que mais lento, de lipídios também nos mutantes, porém a grande maioria do glicogênio não se movimentou dos conídios para a célula gancho, através do tubo germinativo. Uma possível explicação pode ser a quantidade reduzida de glicogênio presente nas células conidiais dos isolados mutantes, provocando um atraso na germinação e, conseqüentemente, em todo o processo de formação do apressório.

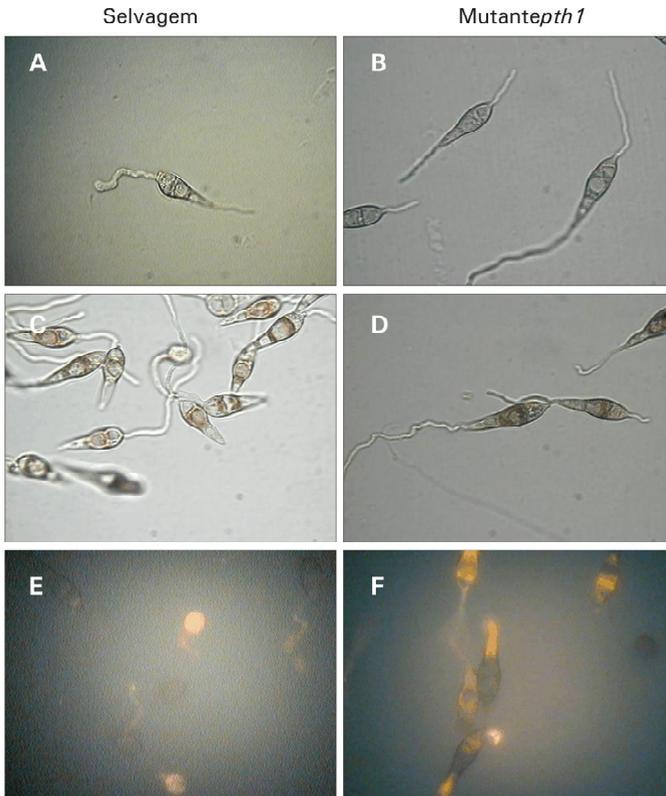


Fig. 8. Controle (A, B), coloração de glicogênio (C, D), e lipídio (E, F) durante a formação de apressório, quatro horas após indução nos isolados 4091-5-8 (tipo selvagem) e CP2789 (mutante *pth1*).

Em apressórios formados oito horas após germinação, pelo tipo selvagem (Figura 9 A-B), a coloração do glicogênio foi intensa (Figura 9 C-D), enquanto os conídios apresentaram uma coloração bastante clara. Também foi intensa a coloração dos lipídios nos apressórios recém-formados (Figura 9 E-F). Tanto as observações da coloração do glicogênio como dos lipídios foram contrastantes com as colorações observadas pelo mutante *pth1*, indicando a presença dessas substâncias ao longo do tubo germinativo.

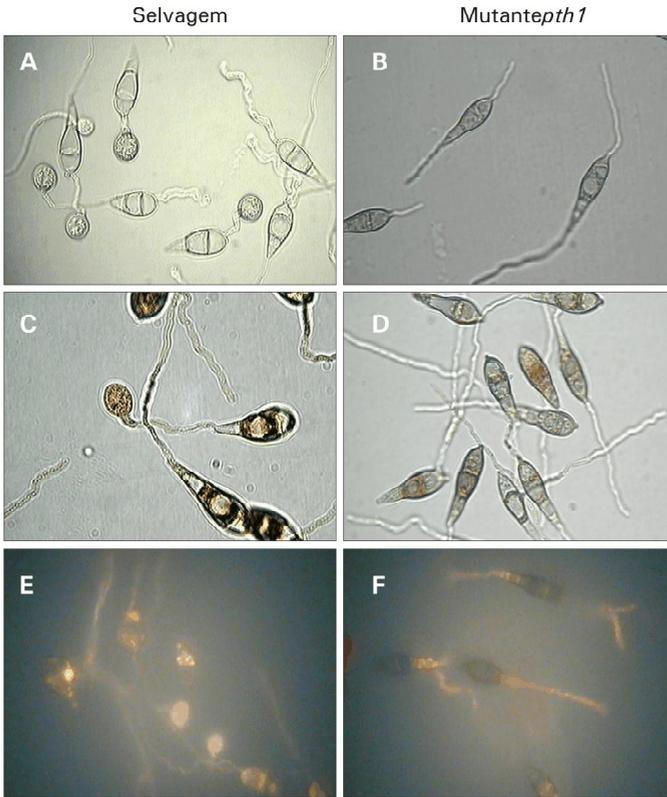


Fig. 9. Controle (A, B), coloração de glicogênio (C, D) e lipídio (E, F) durante a formação de apressório, oito horas após indução nos isolados 4091-5-8 (tipo selvagem) e CP2789 (mutante *pth1*).

Doze horas após a germinação, ambos os isolados tipo selvagem e mutante *pth1*, completaram a formação do apressório (Figura 10). Grande parte de glicogênio e lipídio foram detectados nos apressórios formados, nos dois tipos. Vinte e quatro horas após a germinação (Figura 11 A-B), a quantidade de glicogênio e lipídio nos apressórios formados era similar entre si (Figura 11 C-D). A quantidade de glicogênio e lipídio mostrou-se similar, em ambos os isolados, porém os apressórios dos isolados mutantes apresentaram variada quantidade de lipídios (Figura 11 E-F).

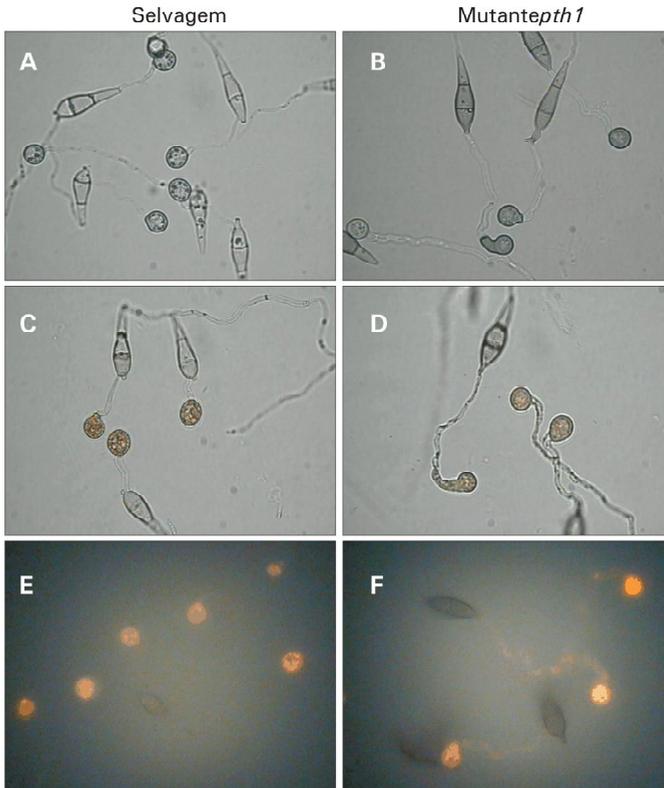


Fig. 10. Controle (A, B), coloração de glicogênio (C, D) e lipídio (E, F) durante a formação de apressório, 12 horas após indução nos isolados 4091-5-8 (tipo selvagem) e CP2789 (mutante *pth1*).

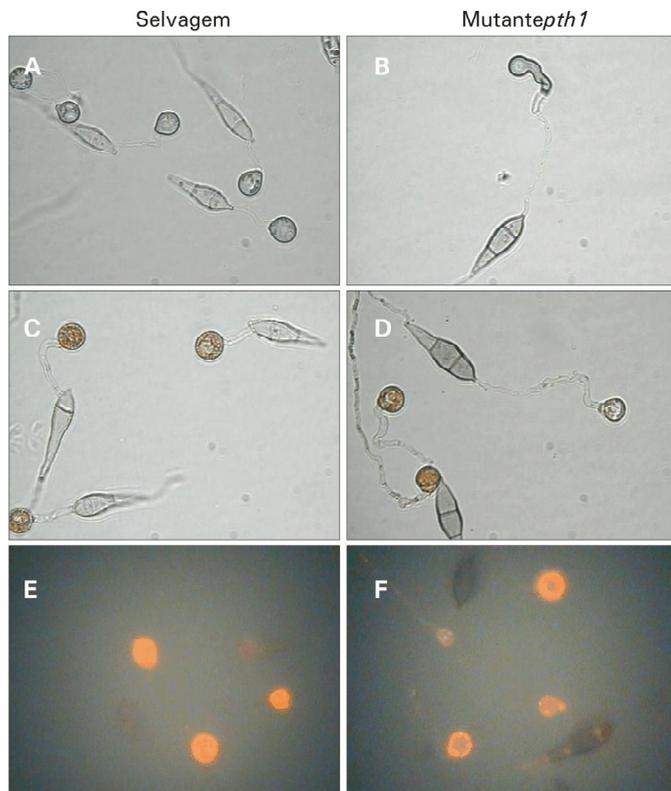


Fig. 11. Controle (A, B), coloração de glicogênio (C, D), e lipídio (E, F) durante a formação de apressório, 24 horas após indução nos isolados 4091-5-8 (tipo selvagem) e CP2789 (mutante *pth1*).

O gene *PTH1*, ortólogo em *Neurospora crassa* complementa a patogenicidade incompleta nos mutantes *pth1*

De acordo com a seqüência do genoma de *N. crassa*, já disponível (Galagan et al., 2003), detectou-se um gene ortólogo de *PTH1*(NCU 1216.1). Até então não se tinha disponível ORF em *M. grisea*. Esta seqüência foi amplificada e utilizada para identificar um clone, em cosmídios, contendo o gene de *N. crassa* (*nfb1*), ortólogo de *PTH1*. *NFB1* foi clonado em pCB10004 (Carroll et al., 1994), e utilizado para transformar os mutantes

pth1 CP2789, complementando o gene *pth1*, produzindo o isolado CP1302. Como esperado, o isolado mutante *pth1*, transformado com o ortólogo de *N. crassa*, produziu sintomas típicos de doença, após inoculação (Figura 12A-B-C). O isolado CP1302 infectou folhas de cevada após a inoculação por pulverização. Folhas de cevada desclorofiladas, fixadas e coloridas com anilina azul foram avaliadas sob microscópio óptico permitindo observar hifas infecciosas emergindo dos apressórios formados sobre a camada cuticular (Figura 12).

Assim, apressórios defectivos foram complementados por um gene homólogo, de um fungo não patogênico, que não produz apressório.

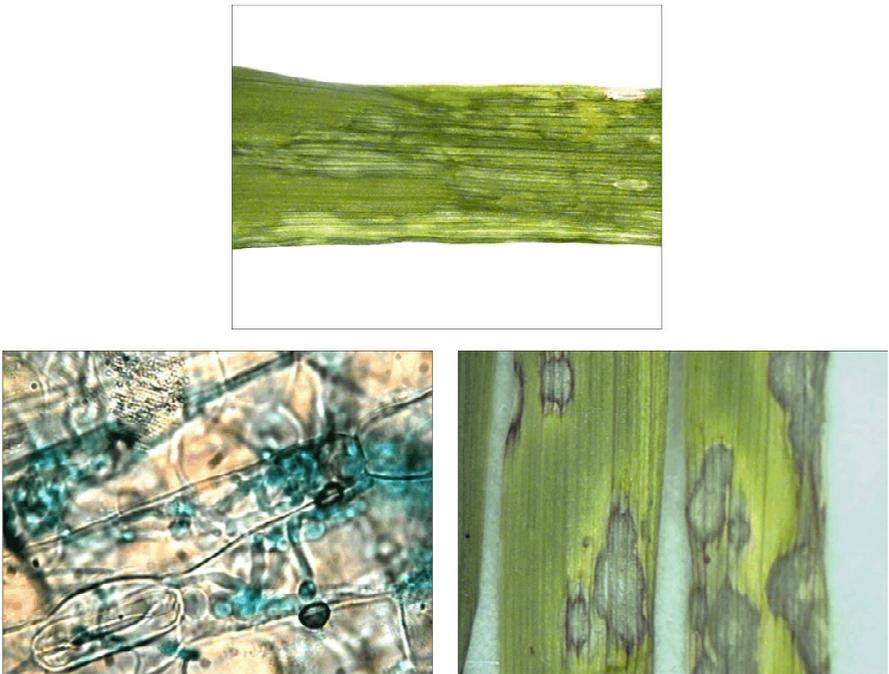


Fig. 12. Sintomas de infecção causada por *M. grisea* após inoculação com o isolado complementado CP1302. A- Folhas de cevada infectadas após inoculação por injeção. B e C- Folhas de cevada após inoculação por pulverização com o mutante complementado CP1302.

Discussão

Os resultados indicam que mutantes *pth1* formam apressórios defectivos, incapazes de gerar pressão de turgor suficiente para perfurar e penetrar no tecido foliar do hospedeiro. Os resultados obtidos no teste de patogenicidade indicaram que mutantes *pth1* são capazes de colonizar o tecido do hospedeiro e desenvolver hifas infecciosas quando inoculados por injeção.

Detectou-se que em conídios de mutantes *pth1* acumulam-se menos lipídios e glicogênio, quando comparados com o tipo selvagem. A germinação dos conídios, em mutantes *pth1*, ocorre com um atraso de aproximadamente quatro horas, possivelmente devido ao processo de mobilização de carbono necessário pela função de *PTH1*, que age como uma ubiquitina-ligase E3. Ubiquitinas ligases ligam-se a proteínas que, por algum motivo, devem ser degradadas. Ubiquitinas ligase derivam sua especificidade das seqüências “motifs” LRR. A responsabilidade de capturar proteínas substratos a serem ubiquitinadas é das enzimas E2 e E3. Tudo indica que *M. grisea* contém três ubiquitinas ligases E3, e cada qual interage com um conjunto diferente de proteínas substratos. Também existem alelos múltiplos codificando os diferentes componentes de E2 (Stryer, 1981). Os componentes de E2 têm se mostrado capazes de capturar proteínas para serem degradadas, independentemente de E3. Propõe-se um modelo no qual mutantes *pth1* falham na habilidade de capturar proteínas para degradação, e que proteínas que interagem com o gene *PTH1* definem um conjunto de proteínas que necessitam ser degradadas para permitir a maturação de apressórios normais.

Este modelo concebe uma nova proposta para entender a formação e o desenvolvimento de apressórios. Estudos conduzidos anteriormente focavam em estudos de rotas metabólicas e de genes que possivelmente seriam expressos especificamente para produzir apressórios. Os resultados deste estudo indicam que algumas proteínas, presentes na germinação do conídio, necessitam ser degradadas para promoverem a maturação do apressório.

Gerar pressão de turgor é um requerimento básico para o funcionamento dos apressórios, e a mobilização de fontes de carbono é necessária para a produção de glicerol, que por sua vez, é essencial para aumentar o potencial osmótico interno das células apressoriais.

Coerente com o fato de que a mobilização do carbono, para fora do conídio durante a formação do apressório, seja mais lenta em mutantes *pth1* do que no tipo selvagem, foi realizada a medição e comparação da quantidade de glicogênio e lipídios que se locomoveram para o apressório em formação, e detectou-se que a mobilização destes componentes é mais lenta no mutante *pth1*.

O processo morfológico da formação da célula gancho também é mais lento nos mutantes. Porém, uma vez que os apressórios se formam, aparentemente a mobilização destes elementos completa-se, mesmo de modo mais lento. Doze e 24 horas após a indução, a quantidade de glicogênio e lipídios acumulados em mutantes *pth1* e tipo selvagem parece ser similar, porém mutantes *pth1* possuem um número elevado de apressórios deformados e melanizados. Tudo indica que, por volta de 24 horas após a indução, a quantidade de glicogênio e lipídios é quase a mesma nos dois isolados, porém isto não garante que a pressão acumulada seja a mesma que no tipo selvagem.

Além do esclarecimento quanto à quantidade de glicogênio e lipídios presentes 12 a 24 horas após a indução ser similar no tipo selvagem e mutante, os mutantes *pth1* mostraram-se mais suscetíveis a pressão osmótica.

Apressórios de mutantes *pth1* com 16 horas de idade colapsaram em concentrações de KCl, que não provocaram o mesmo efeito nos isolados do tipo selvagem. Esta observação é evidente quando os apressórios foram expostos a uma solução KCl 1 M. Se mutantes *pth1* atrasam quatro horas, quando comparados com o tipo selvagem, após 16 horas da indução a pressão de turgor será menor, isto é, a pressão de turgor formada nos apressórios mutantes ocorre em tempo posterior ao tipo selvagem, mas atinge uma pressão de turgor razoável posteriormente. Mesmo assim, a baixa eficiência de infecção sugere que a pressão de turgor nunca atingirá os níveis necessários para penetrar no hospedeiro.

O gene *nfb1*, ortólogo de *N. crassa* complementa mutante *pth1*. O isolado CP1302, que teve a mutação do gene *pth1* complementada com o gene *nfb1* recuperou a sua capacidade de formar apressórios normais, capazes de penetrar a superfície foliar para posterior colonização do tecido. Este fato sugere que a função bioquímica de gene *pth1* não evoluiu especificamente para participar da formação e desenvolvimento do apressório. Levanta-se a evidência que fungos fitopatogênicos podem adaptar funções utilizadas por fungos não patogênicos em processos patogênicos.

Referências Bibliográficas

- Beckerman, J. L. Morphogenetic and hormonal control of appressorium formation in the rice blast pathogen, *Magnaporthe grisea*. Morphogenetic and hormonal control of appressorium formation in the rice blast pathogen, *Magnaporthe grisea*. 1997
- Blindslev, L., M.J. Kershaw, N.J. Talbot, and R.P. Oliver. Complementation of the *Magnaporthe grisea* *cpka* mutation by the *Blumeria graminis* PKA-c gene: Functional genetic analysis of an obligate plant pathogen. **MPMI. Mol.Plant-Microbe Interact.:** 14, no. 12:1368-1375. 2004
- Bourett, T. M. and R. J. Howard. *In Vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Can.J.Bot.** 68:329-342. 1990
- Carroll, A. M., Sweigard, J. A., and Valent, B. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. **Fungal Genet. Newsl.** 41[22]: 1994
- Choi, W. and R. A. Dean. The adenylate cyclase gene MAC1 of *Magnaporthe grisea* controls appressorio formation and other aspects of growth and development. **Plant Cell.** 9, no. 11:1973-1983. 1997.
- Clergeot, P. H., M. Gourgues, J. Cots, F. Laurus, M. P. Latorse, R. Pepin, D. Tharreau, J. L. Notteghem, and M. H. Lebrun.. *PLS1*, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. **Proc Natl Acad Sci** 98, no. 12:6963-6968. 2001
- Dean, R. A.. Signal Pathways and Apressorium Morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology** 35, no. 1:211-234. 1997
- Deising, H. B., Werner, S., and Wernitz, M. The role of fungal appressoria in plant infection. **Microbes and Infection** 2, no. 13:1631-1641. 2000
- Dezwaan, T. M., Carrol, A. M., Valent, B. and Sweigard, J. A. *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates apressório differentiation in response to inductive substrate cues. **The Plant Cell.** 11:2013-2030. 1999

FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations.

<http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/7538-en.html>) Ref Type: **Internet Communication**. 2004.

Filippi, M.C. Signaling pathway in apresorio formation in *Magnaporthe grisea*. Ph. D. Dissertation. 2004

Filippi, M.C., Ebbole, D.J. and Gonzalez C. Bioactive inhibition of apresório formation in *Magnaporthe grisea* Abstract. In.: The 22nd Fungal Genetics Conference at Asilomar, California. March 18-23, 2003. p.101. Abstract 275.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., and Selker, E. U.. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature** 422: 859-868. 2003.

Gilbert, R. D., Johnson A. M., and Dean R. A.. Chemical signals responsible for apresório formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 48, no. 5:335-346. 1996.

Howard, R. J. and Valent, B. Breaking and entering: host penetration by fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annu.Rev.Microbiol.** 50:491-512. 1996.

Howard, R. J. and Ferrari M. A. Role of melanin in Apresorio function. **Experimental Mycology** 13:403-418. 1989.

Howard, R. J. and Ferrari, M. A.. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressure. **Proc Natl Acad Sci** 88: 11281-11284. 1991.

IRRI. 4 A.D. Ref Type: **Internet Communication**. 2003. P.5-6

Kolattukudy, P. E. and Roger, M. L. Surface signaling in pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci** 92:4080-4087. 1995

Kulkarni, R. D. and Dean, R. A. Identification of proteins that interact with two regulators of apresorio development, adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase A, in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics** 270, no. 6: 497-508. . 2004

Lee, N., D'Souza, C. A., and Kronstad, J. W. Of smuts, Blasts, Mildews, and Blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology** 41:399-427. 2003.

Leite, B., Rocanto, L.D.B., Pascholanti, S.F. and Lambais M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patógenos. **RAPP**. 5. 235-280. 1997.

Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Ang, X., Augh, M., Eitman, and Itman.. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. **J. Microbiol Mol Biol Rev**. 64, no. 4:746-785. 2000.

Liu, S. and Dean, R. A. G protein subunit genes control growth, development, pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. **MPMI**. 10, no. 9:1075-1086. 1997.

Mitchell, T. K. and Dean, R. A. The cAMP protein kinase catalytic subunit is required for apressório formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell**. 7:1869-1878. 1995.

Mitchell, T. K., Thon, M.R., Jeong, J-S., Brown, D., Deng, J. and Dean, R. A. The rice blast pathosystem as a case study for the development of new tools and raw materials for genome analysis of fungal plant pathogens. **New Phytologist**. 159:53-61. 2003.

Nishimura, M., Park, G., and Xu, J. R.. The G-beta subunit *MGB1* is involved in regulating multiple steps of infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Microbiology** 50, no. 1:231-243. 2003.

Oh, H-S. and Lee, Y-H. Target-site-specific screening system for antifungal compounds on apressorio formation in *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**. 90, no. 10:1162-1168. 2000.

Park, G., Xue, C., Zheng, L., Lam, S., and Xu, J-R.. *MST12* regulates infectious growth but not apressorio formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **MPM I**. 15, no. 3:183-192. 2002.

Prabhu, A.S., Garces, L.A, Faustina, C. and Berne, R.. Estimation of grain losses caused by blast in upland rice. **Pesq. Agropec.Bras.** v. 38, n.9, 1045-1051. 2003

Prabhu, A.S., Guimarães, C.M. and Silva, G.B.. Manejo da Brusone de terras altas. **Circular Técnica n 2.** Embrapa Arroz e Feijão. Dezembro 2002.

Rao, A. G.. Antimicrobiol Peptides. **MPMI.** 8, no. 1:6-13. 1995.

Stryer, L.. **Biochemistry.** San Francisco: W. H. Freeman and Company.1981.

Talbot, N. J.. Plant Biophysics: Forcible Entry. **Science.** 285:1860-1861. 1999

Talbot, N. J.. On the trail of a cereal killer. **Annu.Rev.Microbiol.** 57:177-202. 2003

Talbot, N. J., Ebbole, D. J., and Hamer, J. E.. Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell.** 5:n.11,1575-1590. 1993.

Thines, E., Weber, R. W., and Talbot, N. J. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during aplanosporium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell.** 12, no. 9:1703-1718. 2000.

Wendland, J. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. **Fungal Genetics and Biology** 34:n.2:63-82. 2001

Valent, B. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology* 80[1]: 33-36. 1990.

Xu, J. R. and Hamer J. E.. MAP Kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenesis growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Genes Dev..** 10:2696-2706. 1996.

Xu, J. R. and Xue, C.. Time for a blast: genomics of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant Pathology,** 3 n.3, 173-176. 2002

Xu, J. R., Taiger C. J., and Hamer J. E.. Inactivation of the mitogen activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. **Proc Natl Acad Sci** 95:n. 21:12713-12718. 1998

Xu, J. R., Urban M., Sweigard J. A., and Hamer J. E.. The CPKA gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressoria penetration. **MPMI**, 10, no. 2:187-194. 1997.

