

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

Caracterização, patogenicidade de *Exserohilum rostratum* e mecanismos de defesas de plantas de arroz

Fábio Júnior Araújo Silva

Pelotas, 2015

Fábio Júnior Araújo Silva

Caracterização, patogenicidade de *Exserohilum rostratum* e mecanismos de defesas de plantas de arroz

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia).

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Cândida Renata Jacobsen de Farias

Coorientador: Prof. Dr. Leandro José Dallagnol

Pelotas, 2015

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias (Orientadora)
(Departamento de Fitossanidade, FAEM-UFPeI)

Dr. Cley Donizeti Martins Nunes
(Embrapa Clima Temperado)

Prof^a. Dra. Danielle Ribeiro de Barros
(Departamento de Fitossanidade, FAEM-UFPeI)



Dra. Jucilayne Fernandes Vieira
(Departamento de fitotecnia, FAEM-UFPeI)

Aos meus pais: Josebias Moreno e Analice Araújo;
Aos meus irmãos: Falberto e Jandiery Araújo;
Aos meus sobrinhos: Ketylen Isrraela e Falberto Júnior;
A minha namorada, Bianka Markes

DEDICO E OFEREÇO

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS pelo dom da vida;

A toda minha família pelo amor, compreensão e apoio em todas as etapas da minha formação;

A minha namorada Bianka Markes, pelo apoio e palavras de incentivo em todos os momentos;

À Profa. Dra. Cândida, pela orientação, ensinamentos e confiança concedida ao longo deste curso de pós-graduação;

Ao Prof. Dr. Leandro Dallagnol pelas contribuições no desenvolvimento desta dissertação;

À Profa. Dra. Danielle pelo apoio e contribuições;

Ao professor Uemerson por ceder os microscópios utilizados na captura das imagens;

Aos professores: Dra. Luciana Nascimento (UFPB) e o Dr. Erbs Cintra (IFPE), por terem me ensinado os primeiros passos da fitopatologia;

A universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação;

Aos estagiários Matheus Nogueira e Rubiana Steinmtez – vocês também fazem parte desse trabalho;

Aos laboratoristas Sergio e Rosaria que incansavelmente me auxiliaram nos momentos em que precisei;

A todos aqueles que conviveram esses dois anos e fizeram parte da fitopatologia em especial: Keilor Dorneles, Marlon Bastiani, Vinicius Gehck (turma do jardim do Éden), Silvia Paz, Paulo Pazdiora, Priscila Rossato, Elén Bonilha, Daniela Rodriguez, Byanka Obes, Renata Mocelim, Viviana Gavira, Johan Manuel, Maurício Sangiogo e Marcelo capelari;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

SILVA, Fábio Júnior Araújo. **Caracterização, patogenicidade de *Exserohilum rostratum* e mecanismos de defesas de plantas de arroz** 2015. 86f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Resumo

Os agentes patogênicos estão constantemente passando por adaptações, ambientais e parasitaria, esse fato leva a necessidade do conhecimento das interações entre organismos e agroecossistemas. O presente trabalho teve como objetivo, caracterizar morfológica e molecular uma nova espécie fúngica associada à cultura do arroz, bem como, determinar a patogenicidade, os danos ocasionados em grãos quando inoculado na fase de floração e as respostas de defesa de plantas mediante o contato com o patógeno. A identificação morfológica foi realizada baseada na morfologia de conidióforos, conídios, germinação de conídios, coloração, forma e presença de septos. A caracterização molecular foi realizada por meio da extração do DNA fúngico, submetido a PCR com os pares de *primers* iniciadores ITS1 ITS4, posteriormente a banda contendo o fragmento de DNA foi excisada e enviada para realização do sequenciamento. O teste de patogenicidade foi realizado com plântulas das cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424 inoculadas com uma solução de conídios ajustada para 2×10^4 conídios ml^{-1} . Para determinação dos danos em grãos foram montados experimentos paralelos em casa de vegetação com as cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424 inoculadas na fase de floração, no delineamento blocos casualizados (DBC) com três repetições e em esquema bifatorial do tipo 3×2 , onde o fator 1 corresponde as cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424 o fator 2 corresponde a presença e ausência de inóculo, as variáveis analisadas foram: incidência, quantificação e localização do inóculo, índice da doença e danos nos componentes de produção. Para avaliação das respostas das plantas de arroz a inoculação com *E. rostratum* foi coletado tecido vegetal das plantas do experimento anterior e analisadas seguindo um esquema trifatorial do tipo $3 \times 2 \times 5$, onde o fator 1 corresponde as cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424 o fator 2 corresponde a presença e ausência de inóculo e o fator 3 os horários de coletas, as variáveis analisadas foram: Período de incubação (PI), conídios diferenciados em apressórios, número de células necrosadas (NCN), intensidade de escurecimento celular, determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs), derivados lignina ácido tioglicólico (DLAT) e atividade das enzimas catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1). Os conidióforos e conídios apresentaram

comprimento médio de 93 e 98 μm de comprimento respectivamente, a largura média dos conídios foi de 9, 25 μm , apresentavam formato obclavado, escuros, com a presença média de 8 septos por conídios e germinando em ambas as extremidades, a caracterização molecular gerou um produto com aproximadamente 600 pares de nucleotídeos a realização do sequenciamento e comparação no banco de dados GenBank demonstrou 99% de similaridade com o fungo *Exserohilum rostratum*. Houve interação entre o fator cultivar e inóculo para os componentes de produção, para o índice de doença, houve diferença significativa para todas as cultivares quando comparadas com seus respectivos controles não inoculados. Quanto às respostas das plantas de arroz a *E. rostratum* na fase de floração, houve interação tripla entre os fatores. A espécie fúngica presente na cultura do arroz no estado do Rio Grande do Sul é o *E. rostratum*, capaz de causar danos em cultivares como a BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424, induzir danos necrose celular e aumentar concentração enzimática e lignina.

Palavras chave: molecular, conídios, enzimas, inoculação, floração

Abstract

SILVA, Fábio Júnior Araujo. **Characterization, pathogenicity *Exserohilum rostratum* and defense mechanisms of rice plants**. 2015. 86f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

The pathogens are constantly undergoing changes, environmental and parasitic, this fact makes the need for knowledge of the interactions between organisms and agroecosystems. This study aimed to characterize morphological and molecular a new fungal species associated with rice cultivation, as well as, determine the pathogenicity, the damage caused grain when inoculated at flowering and plant defense responses through contact with the pathogen. Morphological identification was made based on the morphology of conidiophores, conidia, conidial germination, color, shape and septa. Molecular characterization was performed by extraction of fungal DNA subjected to PCR with primer pairs ITS4 primers ITS1, then the band containing the DNA fragment was excised and sent to the embodiment sequencing. The pathogenicity test was conducted with seedlings of BRS Pelota, PUITA INTA-CL e IRGA 424, inoculated with a spore solution adjusted to 2×10^4 conidia ml^{-1} . To determine the damage to grains were mounted parallel experiments in the greenhouse with the BRS Pelota, Puita INTA-CL and IRGA 424 inoculated at flowering in a randomized block design (RBD) with three replications and two factorial arrangement of type 3×2 , where factor 1 corresponds BRS Pelota cultivar, Puita INTA-CL and IRGA 424, factor 2 corresponds to the presence and absence of inoculum, the variables analyzed were: incidence, quantification and location of the inoculum, index of disease and damage production components. For evaluation of the responses of rice plants inoculated with *E. rostratum* was collected plant tissue of the previous experiment plants and analyzed following a factorial scheme of type $3 \times 2 \times 5$, where factor 1 corresponds BRS Pelota cultivar, Puita INTA- CL and IRGA 424, factor 2 corresponds to the presence and absence of inoculum and factor 3 times collection, the variables analyzed were: incubation period (IP), differentiated conidia in appressoria, number of necrotic cells (NCN), intensity Cell blackout, determining the concentration of total soluble phenolic compounds (CFSTs), lignin derivatives thioglycolic acid (DLAT) and activity of catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) and polyphenol oxidase (PPO , EC 1.10.3.1). The conidiophores and conidia had an average length of 93 and 98 μm respectively, the average width of 9 conidia was 25 μm had obclavado, dark form, with the average for the presence of 8 septa and conidia germinate at both ends, The molecular characterization generated a product of approximately 600 pairs of nucleotides the

completion of the sequencing and comparison to the database GenBank showed 99% similarity with the fungus *Exserohilum rostratum*. There was interaction between the cultivar factor and inoculum for the production of components for the disease index, there was a significant difference for all cultivars when compared with their non-inoculated controls. On responses of rice plants to *E. rostratum* at flowering, there was triple interaction between factors. The fungal species present in rice cultivation in Rio Grande do Sul state is the *E. rostratum*, capable of causing damage to cultivars like BRS Pelota, Puita INTA-CL and IRGA 424, induce damage cellular necrosis and increase enzyme concentration and lignin.

Keywords: molecular, conidia, enzymes, inoculation, flowering

Lista de Figuras

Figura 1	Morfologia dos conidióforos de <i>E. rostratum</i> , mostrando os diferentes tamanhos e número de conídios.	26
Figura 2	Morfologia dos conídios de <i>E. rostratum</i> , apresentando com a presença de um hilum em destaque.	27
Figura 3	Germinação de conídios de <i>E. rostratum</i> , A – 2, B – 4 e C - 6 horas após a incubação respectivamente. Todas as figuras foram visualizadas com lentes de magnificação de 40x.	27
Figura 4	Morfologia dos conídios de <i>E. rostratum</i> , apresentando a diversidade de formas e tamanhos. Em A e B – conídios grandes e curvos com seta indicando os septos, C e D – conídios menores com seta indicando septos e a presença do hilum em C.	28
Figura 5	Confirmação da amplificação do fragmento correspondente a região ITS do rDNA. de um isolado de <i>E. rostratum</i> . M: Marcador molecular “1 Kb DNA ladder” e A: Fragmento de ~600nt.....	29
Figura 6	Manchas foliares em genótipos de arroz: BRS Pelota (A), Puitá INTA CL (B) e IRGA 424 (C), com idade de 25 dias. Sintomas observados as 120 hai com <i>E. rostratum</i>	30
Figura 7	Sintomas ocasionados por <i>E. rostratum</i> em diferentes cultivares de arroz. Sintomas no caule, aurícula e parte central da folha, dos genótipos BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C).....	31
Figura 8	Células necrosadas da face adaxial das folhas de arroz, cultivares: BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C). Sintomas visualizados 120 hai após a inoculação com o fungo <i>E. rostratum</i>	32
Figura 9	Câmara úmida de tecido foliar de diferentes cultivares de arroz, infectados com <i>E. rostratum</i> , BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C).	32
Figura 10	Incidência de <i>E. rostratum</i> em grãos granados BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e Irga 424 (C) e chochos BRS Pelota (E), Puitá INTA-CL (E) e Irga 424 (F) de arroz, inoculados na fase de florescência da cultura. .	41
Figura 11	Incidência de <i>E. rostratum</i> em grãos granados e chochos de arroz, inoculados e não inoculados na fase de florescência da cultura.	42

Figura 12	Quantificação de inoculo em grãos granados de arroz, inoculados na fase de florescência com <i>E. rostratum</i>	42
Figura 13	Presença de <i>E. rostratum</i> em grãos granados de arroz: BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C), submetidos a desinfestação superficial.	43
Figure 14	Incidência de <i>E. rostratum</i> em grãos granados submetidos a desinfestação superficial.	43
Figura 15	Apressórios de <i>E. rostratum</i> na superfície adaxial de folhas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA -CL (B) e IRGA 424 (C) às 12 horas após a inoculação. Todas as imagens foram ampliadas 20x.	60
Figura 16	Porcentagem de conídios com apressórios diferenciados na face adaxial das folhas de face adaxial das folhas de arroz das cultivares: BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) em diferentes horários após a inoculação de <i>E.rostratum</i> . Barras representam o desvio padrão, n=4.	60
Figura 17	Número de células necrosadas (NCN) na face adaxial em folhas de arroz, cultivares: BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424, em diferentes horários após a inoculação com <i>E. rostratum</i>	61
Figura 18	Células necrosadas na face adaxial de folhas de arroz inoculadas com <i>E. rostratum</i> , onde: A - BRS Pelota com presença de células necrosadas nos níveis 1 e 2 às 18, B - BRS Pelota com presença de células necrosadas nos níveis 1, 2 e 3 às 48 hai, C - Puitá INTA-CL com células necrosas nas categoria 1, 2 às 24 hai, D - Puitá INTA-CL com células necrosadas nas categorias 1, 2 e 3 às 36 hai, E - IRGA 424 com a presença de células necrosadas na categoria 1, 2 e 3 às 18 hai e F - IRGA 424 com a presença de células necrosadas nas categorias 1, 2 e 3 às 48 hai.....	62
Figura 19	Grau de escurecimento celular em tecido foliar de plantas de arroz cultivares: BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424, em diferentes tempos após a inoculação com <i>E. rostratum</i> . A intensidade do grau das manchas epidérmicas foi agrupada nas categorias: 1 - Parede das células epidérmicas com bordas levemente amareladas; 2 - Células epidérmicas completamente amareladas (amarelo palea); 3 - Células epidérmicas completamente amarelas a marrom e evoluindo para as células vizinhas. As barras representam o desvio padrão. Foram observados 10 locais de apressórios por repetição com conídio e tubo germinativo formado. n=4.....	63
Figura 20	Atividade da enzima peroxidase (POX) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo <i>E. rostratum</i> em diferentes tempos após a inoculação. As barras representam o erro	

padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , entre plantas inoculadas e não inoculadas.64

Figura 21 Atividade da enzima Polifenoloxidase (PFO) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempos após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , entre plantas inoculadas e não inoculadas.65

Figura 22 Atividade da enzima catalase (CAT) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempos após a inoculação. As barras r representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , entre plantas inoculadas e não inoculadas.....66

Figura 23 Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempos a após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , entre plantas inoculadas e não inoculadas.67

Figura 24 Concentração dos derivados lignina ácido tioglicólico (DLAT) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempo após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste t , entre plantas inoculadas e não inoculadas.68

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Características químicas do solo utilizado para o plantio das cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424. Capão do Leão, RS, 2014.37
- Tabela 2 - Índice da doença em grãos de arroz granados e chochos, inoculados (I) e não inoculados (NI) com o fungo *E. rostratum* na fase de florescência. Capão do Leão, RS, 2014.44
- Tabela 3 - Número de espiguetas granadas, de espiguetas chochas e de espiguetas por panículas de arroz das cultivares BRS Pelota, IRGA 424 e Puitá INTA-CL em função da inoculação com *E. rostratum*. Capão do Leão, RS, 2014.46
- Tabela 4 - Peso de panículas, de mil grãos e incidência em arroz das cultivares BRS Pelota, IRGA 424 e Puitá INTA-CL em função da inoculação com *E. rostratum*. Capão do Leão, RS, 2014.46
- Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Pearson e valores de $p \leq 0.05$ entre as variáveis dependentes das cultivares de arroz BRS Pelota, IRGA 424, Puitá INTA-CL submetidas à inoculação com *E. rostratum*. Capão do Leão, RS, 2014.-47

Sumário

1	Introdução.....	16
2	CAPITULO I - Identificação de uma espécie de <i>Exserohilum</i> associada à cultura do arroz no Rio Grande do Sul	21
2.1	Introdução.....	21
2.2	Material e métodos	23
2.2.1	Experimento 1 – Identificação morfológica de <i>Exserohilum</i> sp.....	23
2.2.2	Experimento 2- Identificação molecular de <i>Exserohilum</i> sp.....	24
2.2.3	Experimento 3 – Estudo de patogenicidade de <i>Exserohilum</i> sp em plântulas de arroz.	25
2.3	Resultados e discussões.....	25
2.3.1	Experimento 1- Identificação morfológica de <i>Exserohilum</i> sp.....	25
2.3.2	Experimento 2- Identificação molecular de <i>Exserohilum</i> sp.....	28
2.3.3	Experimento 3- Patogenicidade de <i>Exserohilum</i> sp.	29
2.4	Conclusões	34
3	CAPÍTULO II – Patogenicidade de <i>Exserohilum rostratum</i> em diferentes cultivares de arroz	35
3.1	Introdução.....	35
3.2	Material e métodos	36
3.2.1	Material vegetal e seu cultivo:.....	37
3.2.2	Delineamento experimental.....	37
3.2.3	Isolado, cultivo de <i>E. rostratum</i> e inoculação das plantas de arroz.....	38
3.2.4	Avaliação da incidência, quantificação e prevalência do inóculo de <i>E. rostratum</i> em grãos de arroz.	38
3.2.5	Índice da doença (ID)	39
3.2.6	Componentes de produção.....	40
3.2.7	Análise dos dados.....	40
2.3	Resultados	41

2.3.1 Avaliação da incidência, quantificação e Prevalência do inóculo de <i>E. rostratum</i> em grãos de arroz	41
3.3.2 Índice da doença	43
3.3.3 Componentes de produção	44
3.4 Discussão	47
3.5 Conclusão	51
4 CAPÍTULO III – Resposta celular e mecanismos bioquímicos ativados em arroz na interação com <i>Exserohilum rostratum</i>	52
4.1 Introdução	52
4.2. Material e métodos	54
4.2.1 Material vegetal e seu cultivo	54
4.2.2 Delineamento experimental.....	54
4.2.4 Avaliação do período de incubação (PI) e respostas citológicas	55
4.2.5 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs) e derivados lignina ácido tioglicólico (DLAT), e atividade das enzimas catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1)	56
4.2.6 Análise dos dados.....	59
4.3 Resultados	59
4.3.1 Avaliação do período de incubação (PI) e respostas citológicas	59
4.3.2 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs) e derivados lignina ácido tioglicólico (DLAT), e atividade das enzimas catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1)	63
4.4 Discussão	68
4.5 Conclusões	71
5 Conclusões finais.....	72
6 Referências bibliográficas.....	73

1 Introdução

O cultivo do arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) é uma atividade com grande importância dentro da cadeia agrícola mundial. Sua produção atinge cerca de 696 milhões de toneladas, em área cultivada de 159 milhões de hectares. A China é o maior produtor (197 milhões de toneladas), seguida pela Índia (144 milhões de toneladas) e Indonésia (66 milhões de toneladas). Por sua vez, o Brasil ocupa a nona posição, com produção de 11,7 milhões de toneladas (FAO, 2013).

Entre os Estados brasileiros, o Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional, responsável por 65% da produção de arroz, o que significa 8,9 milhões de toneladas, em área superior a 1 milhão de hectares e produtividade de 7,6 t há⁻¹. Em segundo lugar, está o Estado de Santa Catarina (SC), sendo responsável por cerca de 7,3% da produção nacional de arroz, o que representa em torno de 2,8 milhões de toneladas, em 150 mil hectares, alcançando a produtividade de 6,6 t ha⁻¹, valores esses referentes a safra 2012/13 (CONAB, 2013).

Atualmente o Brasil apresenta-se em posição de destaque no cenário orizícola mundial, com grande potencial de crescimento. Entretanto, há diversos fatores que determinam perdas na produtividade, principalmente em função das condições fitossanitárias devido à presença de pragas e/ou patógenos.

As doenças estão entre os principais problemas fitossanitários da cultura do arroz, entre as de impacto econômico para o estado do Rio Grande do Sul, destaca-se a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* Corr. Porém, nos últimos anos a ocorrência da mancha parda vem aumentando, tendo assumido posição de doença economicamente importante devido a maior suscetibilidade da maioria das cultivares em uso (FUNCK; KEMPF, 2008). A mancha parda reportada na cultura do arroz tem como agente causal o fungo *Cochliobolus*

miyabeanus (Ito & Kuribayashi). Esse patógeno tem as sementes como seu principal meio de sobrevivência e disseminação, o que permite a continuidade do seu ciclo, quando da ocasião da germinação. Entre os seus efeitos primários estão à debilitação e morte de plântulas, podendo levar à necessidade de ressemeadura (GOPALAKRISHNAN, 2010). Mesmo quando as plântulas não morrem, esse fungo pode se tornar um problema para a cultura, pois as plantas provenientes das sementes infectadas servirão de fonte de inóculo, podendo ocasionar danos nos diferentes estádios fenológicos. Quando o ataque ocorre nas folhas, o sintoma característico são manchas ovaladas com centro escuro, ocorrendo à diminuição da área foliar fotossintética e com isso se tem perdas significativas na produção (FUNCK; KEMPF, 2008).

Trabalhos conduzidos por Farias et al. (2011) verificaram a presença de um complexo de espécies, desse gênero, associado as sementes de arroz no Rio Grande do Sul entre eles: *Bipolaris curvispora* (El Shafie) Sivan., *Bipolaris cynodontis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker e *Bipolaris* sp.. Essas espécies foram transmitidas pelas sementes e quando inoculadas em diferentes estádios fenológicos do arroz causaram sintomas semelhante aos ocasionados pelo *B. oryzae*. Foi o primeiro relato *B. curvispora* em sementes da espécie *Oryza sativa* L. A ocorrência desse fungo já foi relatada em outras gramíneas como *Melinis munitiflora*, *Panicum maximum*, *Setaria* e *Triticum aestivum*, causando lesões necróticas de coloração marrom-escura. Até então não havia relato dessa espécie no Brasil, sendo relatada em outros países como: Austrália, Índia, Paraguai e Costa Rica (SIVANESAN, 1987).

Em levantamentos sanitários recentes, realizados em sementes de arroz do Instituto Riograndense de Arroz Irrigado, oriundas de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, em três safras consecutivas (2009/2010 – 2010/2011 – 2011/2012) no laboratório de patologia de sementes FAEM/UFPel, foi observado a presença de lotes contaminados com um fungo semelhante a *Exserohilum* sp..

Esse fato chama atenção para um novo agente associado ao arroz que pode estar sendo disseminado via semente e confundido com o fungo *B. oryzae*.

A diagnose muitas vezes errônea dentro desse gênero pode ser justificada uma vez que no Brasil, as doenças causadas pelos gêneros *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum* eram comumente chamadas de helminthosporiose, decorrente da nomenclatura dos agentes causais, antigamente pertencente a um

único gênero, *Helminthosporium*. Alcorn (1988) desdobrou o gênero *Helminthosporium*, nos referidos fungos, com base na morfologia dos conídios, na sua conidiogênese e associação com a fase perfeita, onde *Drechslera* corresponde a *Pyrenophora*, *Bipolaris* a *Cochliobolus* e *Exsehorilum* a *Setosphaeria*.

Além disso, uma característica típica desses fungos é a variabilidade existente, evidenciada tanto por aspectos morfológicos como fisiológicos (VIÉGAS, 1989; OLIVEIRA et al., 2002, FRAZZON et al., 2002, PERES et al., 2003) e de patogenicidade (VALIM-LABRES et al., 1997).

Essa variabilidade pode ser explicada por uma série de fatores casuais baseados, principalmente, no grande número de núcleos ocorrentes nas células tanto das hifas como nos conídios, o que propícia a heterocárie e suas posteriores consequências. Genotipicamente podem ocorrer mutações, heterocáries, dissociação de heterocáries, possibilidade de diplóides e haplóides recombinantes através do ciclo parassexual, muitas vezes evidenciada pela presença de setores nas colônias (VIÉGAS, 1989, GLASS et al., 2000, MCDONALD; LINDE, 2002).

A alta variabilidade encontrada em fungos fitopatogênicos, em especial nas espécies do antigo gênero *Helminthosporium*, favorece a quebra da resistência das plantas hospedeiras (NASCIMENTO; VAN DER SAND, 2008), e pode dificultar a identificação do real agente causador da doença.

A identificação desses agentes etiológicos tem sido baseada na morfologia da fase anamórfica, no entanto, essa é pouco confiável devido à variabilidade desse grupo. Técnicas moleculares têm sido usadas para o estudo de sistemática de fungos que incluem desde a análise por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (OLIVEIRA et al., 2002; MULLER et al., 2005; JAISWAL et al., 2007; FRAZZON et al., 2002; SANTOS et al., 2002), PCR (polymerase chain reaction) utilizando oligonucleotídeos sítio específicos (OLIVIERA; LORIA, 1998) e “Amplified Fragment Length Polymorphism- AFLP” (ZHONG; STEFFENSON, 2001; PERES et al., 2003). No entanto, os métodos mais comumente utilizados, nos últimos anos, estão baseados na análise de sequências de DNA ribossomal (rDNA). Estas sequências são universais e contêm regiões conservadas e variáveis permitindo a discriminação microbiana

em diferentes níveis taxonômicos (BERBEE et al. 1999; KUMAR; SHUKLA, 2005; NASCIMENTO; VAN DER SAND, 2008).

Técnicas de biologia molecular como a análise das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e sequências variáveis do DNA ribossomal 18S associados ao RFLP, além de sequenciamento de fragmentos podem contribuir para caracterizar os isolados e estudar a variabilidade inter e intra-específica dos patógenos (BENTES; COSTA NETO, 2011).

Além de se fazer a correta identificação de um patógeno é também necessário estudar se o mesmo apresenta potencial de dano, tanto na fase de estabelecimento da cultura como na produção. Este estudo é necessário uma vez que espécies do gênero *Exserohilum*, são reportados na literatura, como um dos principais agentes causais de doenças em culturas de expressão econômica para o Brasil, a exemplo temos *Exserohilum turcicum* (Pass.) K. J. Leonard & E. G. Suggs na cultura do milho (*Zea mays* L.).

Outro fato relevante é que a cultura do arroz no RS está passando por mudanças, devido à falta de máquinas e altas precipitações na fase de semeadura, com isso, uma das premissas é a antecipação da época de semeadura.

Efetuar semeadura em época mais precoce pode acarretar certa dificuldade para a germinação e estabelecimento da cultura, devido às baixas temperaturas do solo e do ar, nos meses de setembro e outubro (MERTZ et al., 2009). Tal fato ocorre em grande importância nas regiões sul e sudoeste (campanha) do estado do RS, pois apresentam maiores riscos de ocorrência de estresse por frio, devido à maior frequência de temperaturas baixas, em comparação às demais regiões do estado (STEINMETZ; BRAGA, 2001). A ocorrência de frio no estabelecimento da cultura do arroz ocasiona atraso tanto na germinação quanto na emergência de plântulas (AMARAL; SANTOS, 1983), predispondo as mesmas ao ataque de patógenos. Essas mudanças poderão fazer com que ocorra a adaptação de outros patógenos com potenciais danos econômicos à cultura.

Diante disso, é importante também conhecer como as plantas se comportariam frente a esse patógeno, quais as rotas do metabolismo são ativadas, quando ocorre o contato das plantas com *Exserohilum* sp. nos estádios reprodutivos como a florescência.

Esses efeitos negativos de estresses abióticos e bióticos sobre as plantas podem ser explicados através de reações deletérias ao seu desenvolvimento, como a diminuição da fotossíntese e ao consequente crescimento, associadas com a alteração do metabolismo do carbono e nitrogênio (LAW; CRAFTS-BRANDNER, 2001).

No decorrer da evolução, as plantas superiores desenvolveram inúmeros mecanismos de respostas a estresses. Esses indivíduos possuem a habilidade de alterar o seu desenvolvimento em reflexo a algum fator externo desfavorável como ataques de pragas, patógenos e fatores abióticos (SOARES; MACHADO, 2007). Um dos primeiros sistemas de defesa contra fitopatógenos corresponde às barreiras físicas, fatores como a topografia da superfície foliar, tricomas, cutículas e a morfologia dos estômatos estão estreitamente relacionados com os processos de pré e pós-infecção (JERBA; RODELLA; FURTADO, 2005), podendo favorecer ou impossibilitar a colonização de tecidos celulares mais profundos.

As plantas possuem um ativo sistema de detoxificação, com a ação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, peroxidase, glutathione S-transferase, ascorbato peroxidase e catalase (FOYER; NECTOR, 2000), bem como antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular como o ascorbato e a glutathione reduzida. Referido mecanismo, protege a integridade das membranas contra o efeito dos EROs, os quais são produzidos a taxas elevadas quando as plantas estão expostas condições de estresse, possibilitando uma maior seletividade de certas espécies a condições ambientais adversas (NOCTOR; FOYER, 1998). A tolerância do arroz a fatores bióticos e abióticos está relacionada com o sistema antioxidante enzimático (GUO et al., 2006).

As enzimas relacionadas ao estresse oxidativo peroxidase (POX) e catalase (CAT) são encarregadas de eliminar o peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio que em altas concentrações torna-se tóxico para as células, (SUDHAKAR et al., 2001). A polifenoloxidase (PFO) é conhecida pela degradação oxidativa de compostos fenólicos nas proximidades de onde ocorre o ataque pelo patógeno, podendo originar compostos extremamente tóxicos a patógenos como as quinonas (CARNEIRO; BARROS; MOREIRA, 2001).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é a identificação, quantificação e o conhecimento de aspectos relacionados à interação patógeno-hospedeiro de uma espécie de *Exserohilum* associada à cultura do arroz.

2 CAPÍTULO I - Identificação de uma espécie de *Exserohilum* associada à cultura do arroz no Rio Grande do Sul

2.1 Introdução

O gênero *Exserohilum* estabelecido por Leonard; Suggs (1974) engloba um grupo de espécies fúngicas, dentre as quais, algumas patogênicas a diversas famílias de plantas desde palmáceas (POLTRONIERI et al., 2008), Marantaceae (*Calathea picturata* K.Koch & Linden), gramíneas como milho (*Zea mays* L.) (LAZAROTO et al., 2012), arroz (*Oryza sativa* L.) (HAILMI et al., 2001) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (AHMADPOUR et al., 2013) causando manchas nas folhas.

A diagnose muitas vezes errônea dentro desses gêneros pode ser justificada uma vez que no Brasil, as doenças causadas pelos gêneros *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum* eram comumente chamadas de helminthosporiose, decorrente da nomenclatura dos agentes causais, antigamente pertencente a um único gênero, *Helminthosporium*. Alcorn (1988) desdobrou o gênero *Helminthosporium*, nos referidos fungos, com base na morfologia dos conídios, na sua conidiogênese e associação com a fase perfeita, onde *Drechslera* corresponde a *Pyrenophora*, *Bipolaris* a *Cochliobolus* e *Exserohilum* a *Setosphaeria*.

O diagnóstico e controle de doenças passam fundamentalmente, pela identificação e classificação adequada dos fitopatógenos, a alocação correta possibilita a aplicação dos princípios de controle de acordo com as características inerentes ao patógeno, uma vez que tais características como: produção de

estruturas de resistências, tipo de esporos e habilidade de troca do substrato saprofítico influenciam diretamente no método de controle. Em sua revisão Reis; Casa; Bianchin (2011), afirmam a necessidade do conhecimento dessas características para a aplicação da rotação de cultura no controle de doenças de plantas.

Nos moldes convencionais, grande parte da agricultura é caracterizada principalmente pela monocultura, utilização de cultivar melhorada, elevado emprego das sementes não certificadas ou sementes crioulas com alto índice de patógenos (CATÃO et al., 2013) e aplicação indiscriminada de agrotóxicos, juntas, essas práticas implicam em um desequilíbrio na dinâmica dos ecossistemas, possibilitando a prevalência de determinadas espécies em detrimento de outros (CIVIDANES; YAMAMOTO, 2002). Além disso, há o fator mudança climática atuando sobre o triângulo das doenças, onde podemos ter o surgimento de novos fitopatógenos e surgimento de raças com maior potencial de virulência, estes podem constituir-se como indicadores das condições biológicas (GARRETT et al., 2009).

Em levantamentos sanitários recentes, realizados em sementes de arroz oriundas de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, por três safras consecutivas (2009/2010, 2010/2011, 2011/2012) foram observados lotes contaminados, com um fungo apresentando características morfológicas semelhantes as do gênero *Exserohilum*. Esse fato chamou atenção para um novo agente associado ao arroz que pode estar sendo disseminada via semente e confundido com o fungo *B. oryzae*, frequentemente associado à cultura do arroz.

Nesse contexto, a caracterização de patógenos desempenha um grande papel no processo de identificação de novos agentes nos cultivos agrícolas. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi identificar esse novo agente usando técnica morfológica e molecular, bem como determinar sua patogenicidade quando associado à cultura do arroz.

2.2 Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e Virologia Molecular do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” da Universidade Federal de Pelotas.

O patógeno foi obtido em lotes de sementes de arroz da safra 2010/11, contaminadas naturalmente, oriundas de produtores do estado do Rio Grande do Sul, onde após os testes de sanidade, os fungos, com características semelhantes à *Exserohilum*, foram repicados para placas de Petri com cerca 10 ml de meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e mantidos em câmara de incubação sob temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h por um período de sete dias. Posteriormente foram realizados estudos morfológico e molecular para correta identificação do fungo e inoculação em plântulas do arroz para verificar sua possível patogenicidade.

2.2.1 Experimento 1 – Identificação morfológica de *Exserohilum* sp.

Para a identificação do fungo, foram analisados conidióforos e conídios, com auxílio de microscópio óptico na lente de 40, com câmara de vídeo Sony, Modelo SSC DC 54 A acoplada e microscópio estereoscópio modelo ZEISS (Stenni SV 11) com 20 e 40 vezes de aumento, com uma câmara de vídeo Sony Modelo SSC DC 54 A.

Para a correta identificação do gênero foram montadas lâminas microscópicas dos conídios, sendo observada em microscópio óptico, a presença de hilum na sua extremidade, o formato obclavado, coloração escura e número de septos, característica determinante do gênero *Exserohilum* (SIVANESAN, 1987).

A determinação da germinação foi realizada tomando-se uma alíquota de 1 ml da solução de conídios dos isolados, vertendo-se em placas de Petri, contendo meio de cultura ágar-água e em seguida, incubada em câmara de crescimento por 4 horas para posterior visualização da germinação, a posição de emergência e direção do crescimento do tubo germinativo basal.

Para a determinação da espécie foi realizado uma análise detalhada dos conidióforos e conídios. Em relação aos conidióforos foram preparados microcultivos conforme Mafia; Alfenas, (2007), onde foi repicado tecido micelial para lâminas, com blocos de meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e postos

para crescer sob temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, ao final de 7 dias, foram analisados 50 conidióforos, sendo observados a presença de septos, ramificações, coloração, forma e inserção dos conídios. Para a caracterização dos conídios, foram realizados dez cultivos monospóricos a partir da colônia massal, sendo os conídios repicados para tubos de ensaio contendo meio BDA. Ao final do período de crescimento, adicionou-se 10 ml de água destilada estéril em cada tubo, agitando-os em vortex por 2 minutos, em seguida, tomou-se 200 µl dessa solução para a mensuração do comprimento, largura e número de septos de 100 conídios por tubo, sendo as dimensões registradas em micrômetros (µm).

Todas as características morfológicas analisadas foram comparadas com as descritas por SIVANESAN (1987).

2.2.2 Experimento 2- Identificação molecular de *Exserohilum* sp.

Para a caracterização molecular, o micélio fúngico foi obtido de cultivos em placa de Petri com meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) com 7 dias de crescimento. A extração do DNA total foi feita de acordo com o protocolo Doyle; Doyle (1990). A amplificação do DNA foi realizada através de PCR (polymerase chain reaction), conforme descrito por Mullin; Falona, (1987). Foram utilizados os oligonucleotídeos universais: ITS1– 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' e ITS4–5'-TCC TCC GCT TAT TGAT ATG C-3') que amplificam a região do espaço interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico (rDNA) (White et al., 1990, TOMASO-PETERSON; BALBALIAN, 2010). A reação foi realizada em um volume de 25 µl, contendo 0,5 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM), 2,5 µl da mistura de dNTPs a 0,25 mM, 0,5 µl de DNA molde e 1 unidade de Taq DNA polymerase (Promega), de acordo com instruções do fabricante. A reação consistiu de uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94 °C e 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 64 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72 °C por 10 minutos (NASCIMENTO; VAN DER SAND, 2008). O produto foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

A banda contendo o fragmento de DNA esperado foi excisada do gel e purificada com o kit Illustra GFX (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. A seguir, a amostra foi enviada para a realização do sequenciamento na empresa Ludwig Biotecnologia.

2.2.3 Experimento 3 – Estudo de patogenicidade de *Exserohilum* sp em plântulas de arroz.

Para determinação da patogenicidade de *Exserohilum* sp. em plântulas de arroz, foram semeadas 20 sementes das cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424, mais as respectivas testemunhas, em caixas gerbox contendo vermiculita como substrato e recebendo irrigação diariamente, sendo as mesmas incubadas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

Aos 21 dias foram realizadas as inoculações das plântulas com uma solução de conídios. Para isso o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (bata-dextrose-ágar) por 7 dias. Logo após foi preparado o inóculo adicionando 10 ml de água destilada nas placas, em seguida as colônias foram raspadas com pincel de sedas macias. A solução obtida foi vertida em uma camada dupla de gaze.

A concentração do inóculo foi ajustada para 2×10^4 conídios . ml⁻¹. A inoculação foi procedida sobre as plântulas de arroz quando estas apresentavam de 3 a 5 folhas, com um pulverizador manual (modelo sx-217) até próximo do escorrimento superficial. As plântulas controle foram pulverizadas com água destilada estéril. Ambas (tratamentos e controle) foram mantidas em câmara úmida com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

As plântulas foram avaliadas até o aparecimento dos primeiros sintomas, sendo analisadas quanto à presença de sintomas por meio de inspeção visual diária e, após o aparecimento dos sintomas posteriormente, para confirmação foi realizado o preparo de lâminas com tecido foliar lesionado para visualização em microscópio ótico.

2.3 Resultados e discussões

2.3.1 Experimento 1- Identificação morfológica de *Exserohilum* sp.

Observou-se a presença de conidióforos de coloração marrom escuro, simples sem ramificação, com a presença de septos e apresentando dilatação da hifa no ponto de origem do conidióforo as dimensões encontradas variaram de 41,7 a 183,5 µm com uma média de 93 µm (Fig. 1). A partir da análise microscópica dos conídios, observou-se a presença expressiva de um hilum

(cicatriz) proeminente na extremidade, unindo os conídios ao conidióforo, com a forma obclavada, coloração escura e a presença de vários septos (Fig. 2). Ao se realizar a análise de germinação, foi possível a visualização de conídios germinando em um pólo (unipolar) e em ambos os pólos (bipolar), iniciando a emissão do tubo germinativo após 1 hora de incubação (Fig. 3A e B). Os conídios e septos apresentam coloração escura e formato obclavado, (Fig. 4A, B, C e D), com dimensões médias de 98 μm de comprimento, (variando de 11,5 a 911 μm), 9, 25 μm de largura (variando de 7,6 a 18) e 8 septos por conídio, variando de 3 a 16 septos.

As características e comparações com a literatura possibilitaram a confirmação com a espécie *Exserohilum rostratum*. Sivanesan (1987) apresenta as seguintes medidas para essa espécie: conidióforos com comprimento até 200 μm , septos presentes, cilíndricos e de coloração oliváceo a marrom, conídios lisos ou ligeiramente curvos, obclavado, marrons ou oliváceos, com até 8 septos por conídio, 15 a 200 μm comprimento X 7 a 29 μm largura e germinação nas células finais.



Figura 1 - Morfologia dos conidióforos de *E. rostratum*, mostrando os diferentes tamanhos e número de conídios. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2014.



Figura 2 - Morfologia dos conídios de *E. rostratum*, apresentando com a presença de um hilum em destaque. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2014.

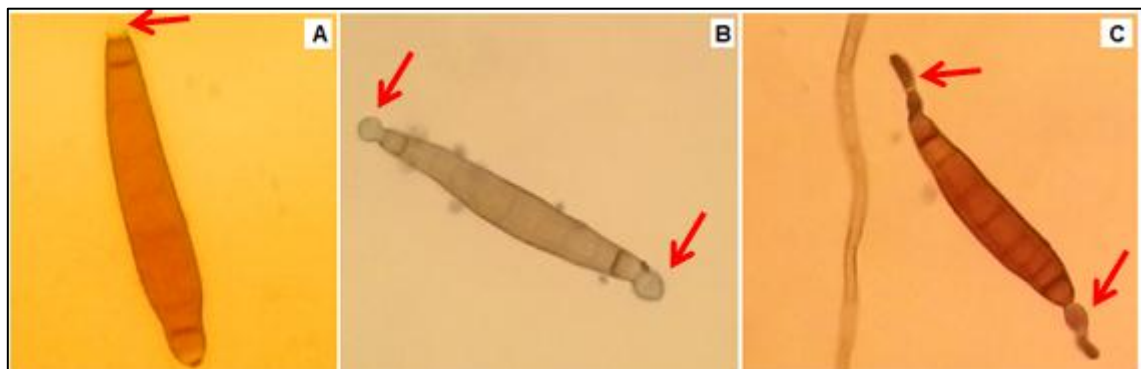


Figura 3 - Germinação de conídios de *E. rostratum*, A – 2, B – 4 e C - 6 horas após a incubação. Todas as figuras foram visualizadas com lentes de magnificação de 40x. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2014.

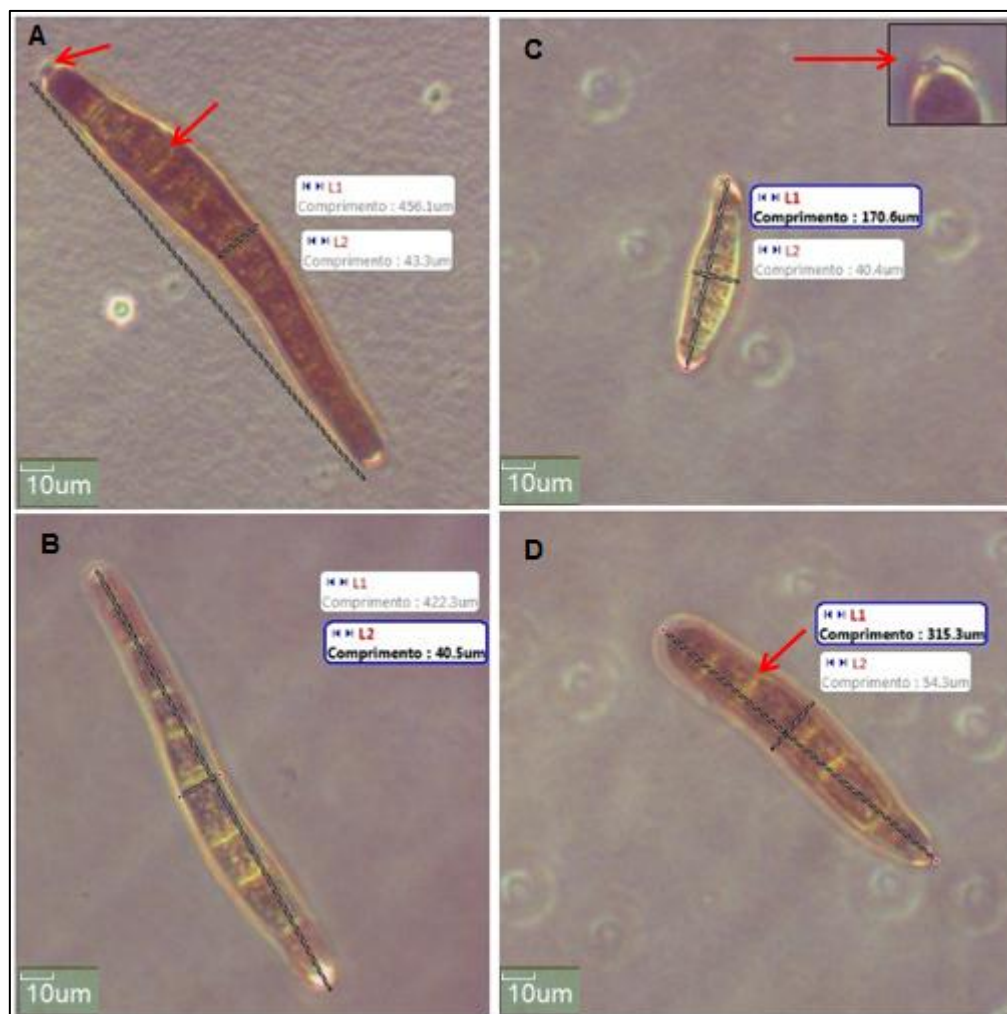


Figura 4 - Morfologia dos conídios de *E. rostratum*, apresentando a diversidade de formas e tamanhos. Em A e B – conídios grandes e curvos com seta indicando os septos, C e D – conídios menores com seta indicando septos e a presença do hilum em C. FAEM/UFPEL, Capão do Leão, RS, 2014.

2.3.2 Experimento 2- Identificação molecular de *Exserohilum* sp.

Na caracterização molecular foi gerado um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pares de bases (Fig. 5) o qual foi sequenciado. Após esta etapa, a sequência obtida foi comparada através do algoritmo BLASTn. A análise mostrou que a sequência obtida possui 99% de identidade com a região ITS de outros isolados de *E. rostratum*.

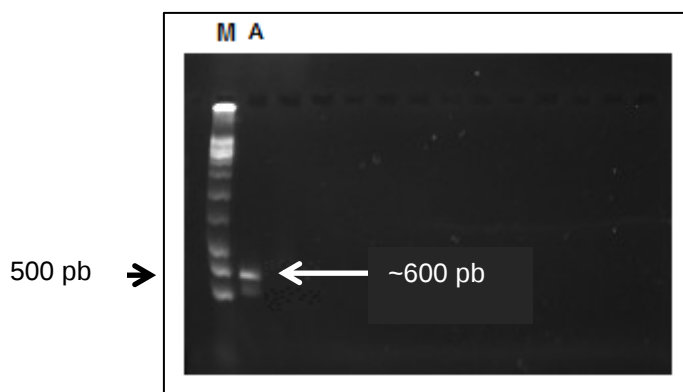


Figura 5 - Confirmação da amplificação do fragmento correspondente a região ITS do rDNA de um isolado de *E. rostratum*. M: Marcador molecular "1 Kb DNA ladder", A: Fragmento de ~ 600nt. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2014.

2.3.3 Experimento 3- Patogenicidade de *Exserohilum* sp.

A partir do teste de patogenicidade foi possível observar às 120 horas após a inoculação (hai), pequenas manchas foliares no centro das folhas e posteriormente evoluindo para as margens (Fig. 6A, B e C). Também foi possível observar a presença de lesões na aurícula de todas as cultivares, sete dias após a inoculação (Fig. 7A, B e C).

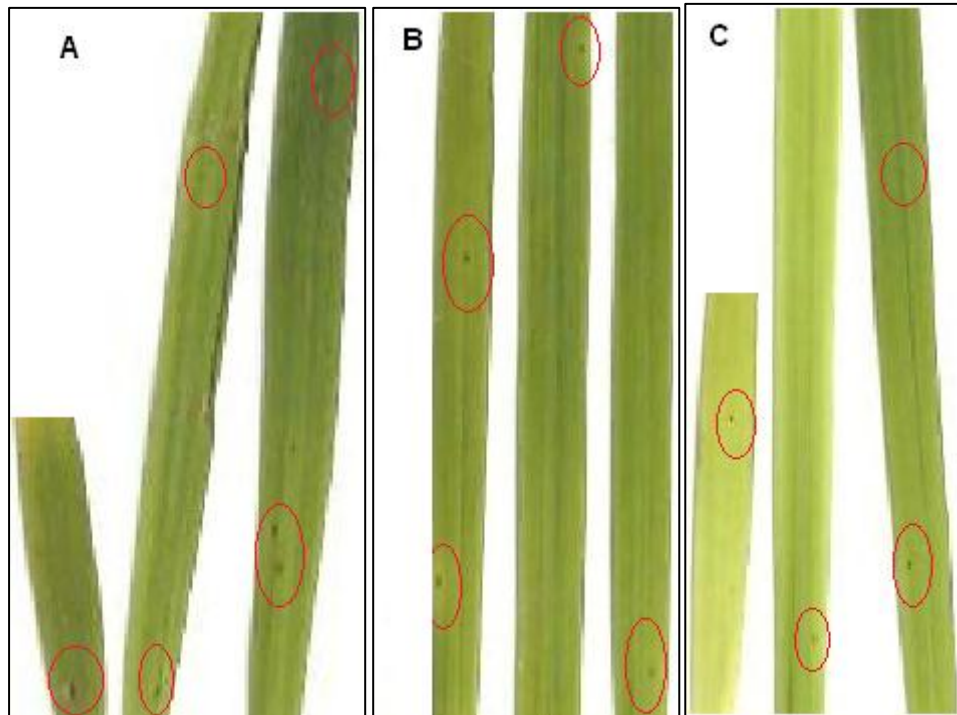


Figura 6 - Manchas foliares em cultivares de arroz: BRS Pelota (A), Puitá INTA CL (B) e IRGA 424 (C), com idade de 25 dias. Sintomas observados as 120 hai com *E. rostratum*. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2014.

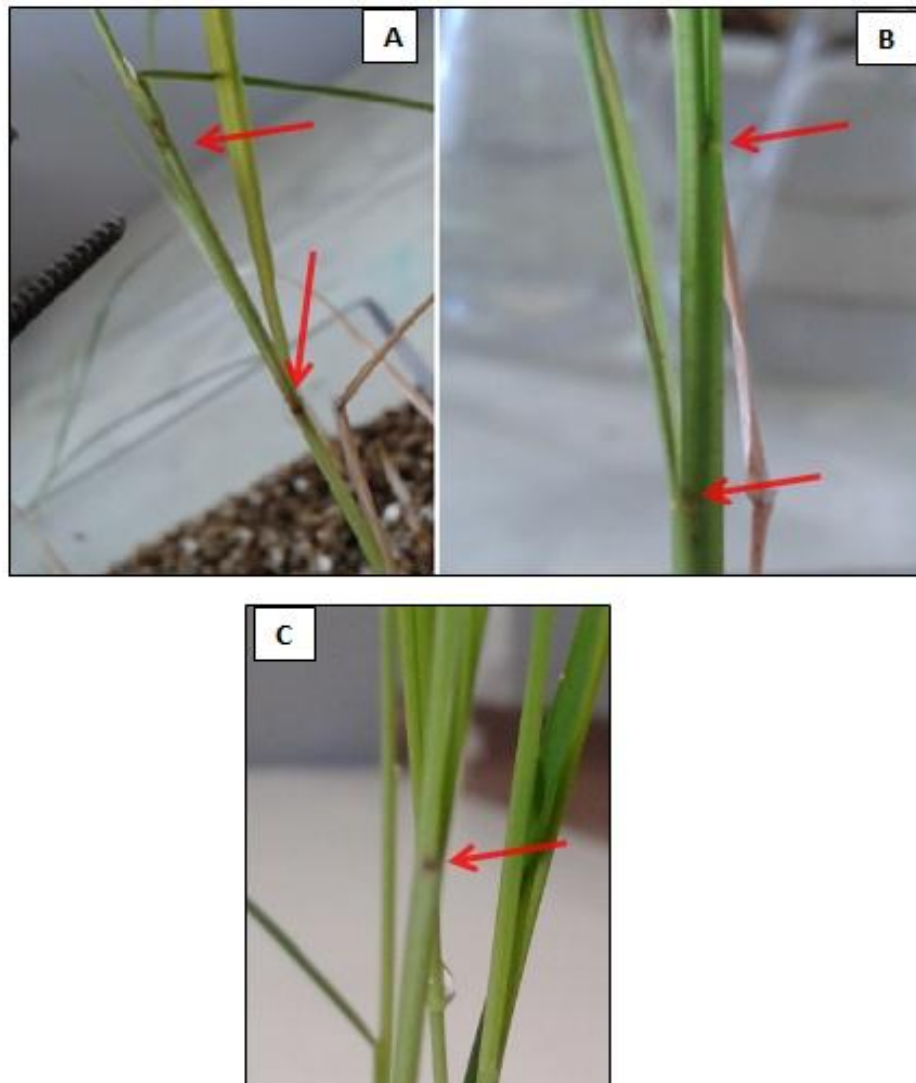


Figura 7 - Sintomas no caule, aurícula e parte central da folha, dos genótipos BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C), inoculados com *E. rostratum*. FAEM/UFPeI, Capão do Leão, RS, 2014.

A partir das lesões macroscópicas, prepararam-se lâminas com fragmentos foliares contendo lesões, onde foi possível a visualização dos conídios com apressórios sobre células necrosadas (Fig. 8A, B e C). Após a visualização e confirmação dos sintomas, foi possível o isolamento do fungo *E. rostratum* sendo possível a visualização da colônia fúngica, conidióforos e conídios em câmaras úmidas com tecido foliar das diferentes cultivares (Fig. 9A, B e C).

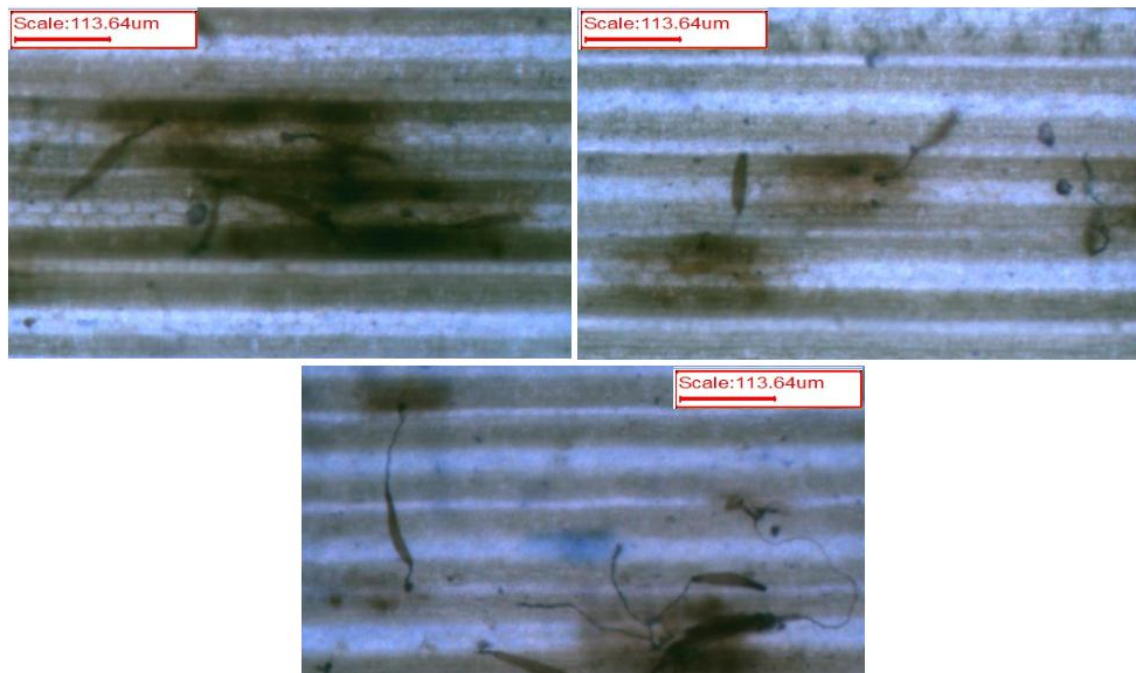


Figura 8 - Células necrosadas da face adaxial das folhas de arroz, cultivares: BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C). Sintomas visualizados 120 hai após a inoculação com o fungo *E. rostratum*. FAEM/UFPel, Capão do Leão, RS, 2014.



Figura 9 - Câmara úmida de tecido foliar de diferentes cultivares de arroz, infectados com *E. rostratum*, BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C). Capão do Leão, RS, 2014.

2.3.4 Discussão

A caracterização morfológica tem sido uma ferramenta empregada na identificação de fitopatógenos ao longo do tempo. Na literatura há muitos exemplos da utilização de identificação morfológica de fitopatógenos. Morejon; Moraes; Bach, (2006), por meio dessa ferramenta Araujo et al. (2009), identificaram os principais fungos incidentes em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.), da mesma maneira em levantamento da flora fungica em sementes de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) identificaram 12 gêneros fúngico.

Muitas espécies fungicas podem apresentar similaridade entre si, tornando a caracterização morfológica insuficiente para identificação, com o avanço científico, novas tecnologias como as técnicas de utilização da região ITS surgiram e vem sendo empregadas para o estudo da identificação e determinação de variabilidade existente entre as espécies de eucariotos (WEIKERT-OLIVEIRA et al., 2002; MENEZES et al., 2010).

No Brasil, esse é o primeiro relato de *E. rostratum* sobre a cultura do arroz. No entanto, o mesmo já foi reportado na Venezuela associados a essa cultura causando manchas necróticas e sendo transmitido via semente Cardona González (2008). Deve-se, portanto, haver um monitoramento desses patógenos emergentes, uma vez que estes podem ser transportados via sementes que aliado a fatores como mudanças climáticas, sistema de manejo adotado e a comercialização de grãos e sementes podem estar favorecendo a migração desse patógeno de uma área para outra.

O transporte via semente constitui-se em um dos fatores responsáveis pela introdução de patógenos em áreas isentas de um país para outro. Marshall; Work; Cavey (2003) demonstram a influência da comercialização de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) na introdução do fungo *Tilletia indica* Mitra, causador da carie do trigo, para vários estados americanos. Exemplos da migração de populações de fitopatógenos, influenciada por fatores como estes, também é relatado por KALISCHUK et al. (2012), onde, reportam a influência de fatores geográficos, condições meteorológicas e a comercialização de tubérculos relacionados com a migração de genótipos do fungo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, para regiões do Canadá, favorecendo a reprodução sexual entre os isolados introduzidos e os locais.

Outro fato a se destacar é quanto à incidência e quantidade de inóculo presente sobre os grãos e sementes, uma vez que esses fatores estão estreitamente relacionados com possíveis epidemiologias no campo, decorrentes da transmissão semente-planta como demonstrado por Araújo et al. (2006), com o patógeno *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa, no algodoeiro. Também, no sentido de avaliar a dispersão espacial da mancha manteigosa causada por *Colletotrichum* spp., na cultura do café (*Coffea arábica* L.), Ferreira; De Abreu; Pereira (2009), observaram que a transmissão semente-planta, corresponde como a principal fonte de disseminação, sugerindo que, mesmo com plantio adensado, contendo plantas doentes e sadias a principal forma de transmissão se dá via sementes. O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Magnus) Cavara, é conhecido por causar a antracnose no feijoeiro, e também é um exemplo de patógeno que pode ser transmitido via sementes e chegando a taxas de transmissão de 70 a 80% interferindo negativamente no rendimento final da cultura e na qualidade dos grãos (REY et al., 2009).

Portanto, evidenciado a importância da semente na veiculação de patógenos, um monitoramento adequado no que se refere à incidência, quantificação de inóculo, infecção e demais parâmetros de dispersão deve ser dado para o patossistema arroz-*E.rostratum*.

2.4 Conclusões

O fungo identificado, associado às sementes de arroz no Rio Grande do Sul é a espécie *Exserohilum rostratum*. O mesmo é patogênico a essa cultura, podendo causar manchas foliares a cultivares como: BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424.

3 CAPÍTULO II – Patogenicidade de *Exserohilum rostratum* em diferentes cultivares de arroz

3.1 Introdução

A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) está entre os cereais mais cultivados no mundo, sua importância se deve ao fato de ser base alimentícia de muitos países, segundo a FAO (2013), a produção mundial dessa cultura na safra 2012/13, foi de 500 milhões de toneladas no Brasil, as projeções é que até 2019 a produção no país atinja os 14,12 milhões de toneladas (MAPA, 2015). O Rio Grande do Sul apresenta-se como principal produtor, com 1.116,7 mil hectares plantados chegando a uma produção de 8, 3 milhões de toneladas, participando ativamente na economia Brasileira (CONAB, 2013).

Com o aumento crescente da população, espera-se atingir níveis cada vez mais elevados na produção dos cultivos agrícolas, para que haja uma maior oferta de alimentos. Esses ganhos passam por uma série de medidas de manejos culturais que se iniciam na instalação, condução até a colheita. Uma dessas medidas corresponde ao controle das doenças, que podem estar relacionadas com reduções na produtividade agrícola (CELMER et al., 2007).

A cultura do arroz é acometida por uma série de doenças, sendo a mancha parda causada por *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker uma das principais incidentes na cultura, conhecida por causar mancha de grãos. Algumas das características desse patógeno são: a capacidade de sobreviver de uma safra

para outra em hospedeiros secundários (ARTIGIANI FILHO; BEDENDO, 1995) e disseminação via sementes (MALAVOLTA et al., 2006, FÀRIAS et al., 2011) tornando-os de difícil controle.

B. oryzae, junto com os gêneros *Drechslera* e *Exserohilum*, faziam parte do antigo gênero *Helminthosporium*, sendo reclassificados por Alcorn (1988), o que possibilitou, uma identificação adequada das espécies que ocasionalmente possam surgir sobre os cultivos.

Espécies de *Exserohilum* têm sido registradas na cultura do arroz em Cuba e na Venezuela (BARRIOS; PEREZ, 2005, CARDONA; GONZÁLEZ, 2008). No Brasil, a espécie *Exserohilum rostratum* foi identificada em lotes de grãos, de três safras consecutivas (2009/2010 – 2010/2011 – 2011/2012), oriundas de diferentes regiões do estado do Rio grande do Sul. Isso chama a atenção por esse fungo já ter pertencido ao mesmo grupo que *B. oryzae* (*Helminthosporium*) e também pela capacidade de ser veiculado via semente. Diante disso, há a possibilidade deste fungo estar sendo confundido com *B. oryzae* e sendo introduzido em novas áreas de cultivo.

A introdução de novos patógenos em áreas isenta acarreta em risco futuros para os cultivos agrícolas, uma vez que características inerentes ao patógeno, bem como, estratégias de manejo são desconhecidas. Exemplo semelhante ocorreu com o fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sidow causador da ferrugem asiática na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), detectada na safra 2001/02 em alguns estados Brasileiros e se espalhando para todos os estados produtores nas safras seguintes.

Com a associação da espécie fúngica *E. rostratum* a sementes de arroz e a temática das mudanças climáticas influenciando na relação dos agroecossistemas é necessário o conhecimento de possíveis danos de um novo agente fúngico sobre a cultura, com isso, o objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos ocasionados por *E. rostratum* em grãos de arroz, inoculado na fase de florescência.

3.2 Material e métodos

O trabalho foi conduzido na casa de vegetação e no Laboratório de Patologia de sementes da Universidade Federal de Pelotas. Para estudar o efeito do fungo *E. rostratum* sobre plantas de arroz, o patógeno foi inoculado nas plantas e verificado posteriormente a incidência, quantificação de conídios e

prevalência em grãos granados, índice da doença e avaliação do componentes de produção.

3.2.1 Material vegetal e seu cultivo:

As cultivares de arroz BRS Pelota (EMBRAPA), IRGA 424 (IRGA) e Puitá INTA CL (BASF S/A) foram utilizadas nos experimentos. As sementes foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1% v/v) e em seguida plaqueadas em caixas gerbox. 7 dias após o plaqueamento, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 4,5 L. Utilizou-se 4 kg de solo vaso⁻¹, apresentando as características químicas descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Características químicas do solo utilizado para o plantio das cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424. Capão do Leão, RS, 2014.

pH água 1:1	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC _{efetiva}	Saturação (%)		Índice SMP
	cmol _c /dm ³					Al	Bases	
4,9	2,7	0,9	0,8	4,4	4,8	16,7	47	6,0

%MO	%Argila	Clas. Arg.	S	P-Mehlich	K	CTCpH 7	K	
M/V			Mg/dm ³			cmol _c /dm ³		
2,07	21	3	X	3,5	76	8,4	0,19	

Cu	Zn	B	Mn	Na	%Fe	Relações molares		
cmol _c /dm ³						Ca/Mg	Ca/K	Mg/k
1.7	1.8	X	96	40	0.25	6.0		

A fertilização e o manejo cultural foram realizados conforme as recomendações técnicas para a cultura do arroz no estado do Rio Grande do Sul (SOSBAI, 2012).

3.2.2 Delineamento experimental

O experimento em casa de vegetação foi realizado no delineamento blocos casualizados (DBC), com seis tratamentos e três repetições (6X3): BRS Pelota inoculado, Puitá INTA-CL inoculado, IRGA 424 inoculado, BRS Pelota não inoculado, Puitá INTA-CL não inoculado e IRGA 424 não inoculado. As análises estatísticas foram realizadas conforme a variável a ser testada.

3.2.3 Isolado, cultivo de *E. rostratum* e inoculação das plantas de arroz

O isolado fúngico LPS-01 de *E. rostratum* foi obtido da micoteca pertencente ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Elizeu Maciel (FAEM), na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), preservado em meio BDA (batata-dextrose-ágar), sobre temperatura de 5 °C.

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio BDA (batata – dextrose – ágar) a temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Colônias com sete dias de crescimento foram utilizadas para preparo da suspensão de inóculo. Para tal, adicionou-se 10 mL de água esterilizada nas placas contendo o fungo e com um pincel de cerdas macias foi realizado a raspagem das colônias fúngicas. A suspensão resultante foi filtrada em dupla camada de gaze e a concentração de conídios ajustadas para $2,8 \times 10^4$ conídios.mL⁻¹. A suspensão foi pulverizada na superfície foliar das plantas de arroz na fase de florescimento usando um pulverizador manual (modelo sx-217) até próximo do escoamento superficial.

Após a inoculação, todas as plantas (inoculadas e não inoculadas) foram postas em câmara úmida por meio de uma cobertura plástica individual por um período de 72 h sobre condições de temperatura variando de 18 a 40 °C e umidade relativa entre 80 e 95 (%). As condições ambientais foram registradas diariamente após a inoculação por meio de Data logger modelo OM-62 (OMEGA[®]).

Ao atingir a maturidade fisiológica todas as panículas foram colhidas e armazenadas em sacos de papel kraft para posterior análises de sanidade, quantificação e localização de inóculo, manchas em grãos (índice da doença) e componentes de rendimento.

3.2.4 Avaliação da incidência, quantificação e prevalência do inóculo de *E. rostratum* em grãos de arroz.

A incidência de *E. rostratum* em grãos granados e chochos, na cultura do arroz, foi realizada segundo as regras para análises de sementes (BRASIL, 2009), onde os grãos granados e chochos foram submetidos ao *Blotter test* (método do papel-de-filtro). Caixas gerbox foram previamente desinfestadas com

hipoclorito de sódio 1% (v/v) e duas camadas de papel-de-filtro depositado no interior de cada gerbox, em seguida umedecidos com água destilada estéril e semeado 25 sementes por gerbox totalizando 200 sementes por tratamento. As sementes foram incubadas em câmara de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas por um período de sete dias. Ao final desse período os grãos foram submetidos à leitura em microscópio estereoscópios e o patógeno identificado com base nas características morfológicas, segundo Sivanesan (1987).

A quantificação de inóculo nos grãos foi realizada por meio de metodologia adaptada de suspensão e lavagem, segundo as regras para análises de sementes (BRASIL, 2009), sementes que apresentaram *E. rostratum*, foram depositadas em 10 mL de água destilada e agitada em vortex por 5 min, em seguida tomou-se uma alíquota de 10 µL que foi colocada em câmara de Neubauer.

Para determinar a Prevalência do patógeno nos grãos granados das cultivares em estudo, 200 grãos por tratamento, foram submetidos a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 5 min, adaptado de Galli; Panizi; Vieira (2007), posteriormente foram plaqueados conforme descrito para determinação da incidência.

3.2.5 Índice da doença (ID)

Para verificação do índice da doença foi determinado à severidade das manchas em grãos. Para isso, três repetições de 100 grãos por tratamento foram tomados ao acaso e distribuídos de acordo com o grau de mancha na superfície, com base em escala desenvolvida por Irri (1996), constituída pelos seguintes graus: 0 = Ausência de manchas, 1 = abaixo de 1%, 2 = De 1.1 a 5%, 3 = De 5.1 a 10%, 4 = De 10.1 a 25%, 5 = De 25.1 a 50%, 6 = De 50.1 a 75% e 7 = acima de 75%. Os resultados obtidos foram utilizados para determinar o ID através da fórmula de Mckinney (1923):

$$\text{Índice da doença} = \frac{\sum (\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{(\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$$

2.2.6 Componentes de produção

A patogenicidade de *E. rostratum* nos componentes de rendimentos foram avaliados em 10 panículas por repetição, sendo analisado os seguintes componentes de rendimento: número de espiguetas granadas (NEG), número de espiguetas chochas (NEC), número de espiguetas por panícula (NEP), peso de panículas (PDP) e massa de 1000 grãos (M1000).

2.2.7 Análise dos dados

Os resultados para incidência e localização de *E. rostratum* foram expressos em percentual (%) de grãos com a presença do patógeno em relação ao total. As médias de manchas em grãos e quantificação do inoculo sobre grãos, foram submetidas à verificação da homogeneidade das variâncias e normalização dos dados pelos testes de Hartley e Shapiro wilk, posteriormente comparadas pelo teste *t* de Student e Tukey respectivamente ($p \leq 0.05$).

Com relação aos componentes de rendimento os dados foram avaliados como um bifatorial do tipo 3×2 , sendo os fatores: cultivares (BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424) e presença (inoculado) ou ausência (não inoculado) do patógeno. Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudantizados externamente (*RStudent*) versus valores preditos (variável Y) e também, pelo gráfico da distância de Cook.

A partir do *RStudent*, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (ROUSSEEUW; LEROY, 1987; BARNETT; LEWIS, 1994). Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos das cultivares foram avaliados pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) e da inoculação pelo teste t ($p \leq 0,05$). A presença de correlações entre as variáveis dependentes do estudo foi analisada através do coeficiente de correlação de Pearson de forma geral e também, separando o efeito da inoculação (SAS Institute, 2002).

2.3 Resultados

2.3.1 Avaliação da incidência, quantificação e Prevalência do inóculo de *E. rostratum* em grãos de arroz

O teste de sanidade de sementes em grãos oriundos de plantas inoculadas com *E. rostratum*, mostrou elevado nível de incidência fungica, para as duas classes de grãos avaliadas (grãos granados e chochos) (Fig. 10), chegando a expressar uma incidência de 63% para a cultivar BRS Pelota nos grãos granados, 43% para Puitá INTA-CL e 36% para IRGA 424 (Fig. 11). Com relação aos grãos chochos, houve incidência de 34% para a cultivar BRS Pelota, 62% para Puitá INTA-CL, 41% para IRGA 424 (Fig. 11).

As cultivares BRS Pelota e IRGA 424 (grãos granados), não inoculadas chegaram a apresentar 1 a 1,5% de incidência, assim como nos grãos chochos (Fig. 11).

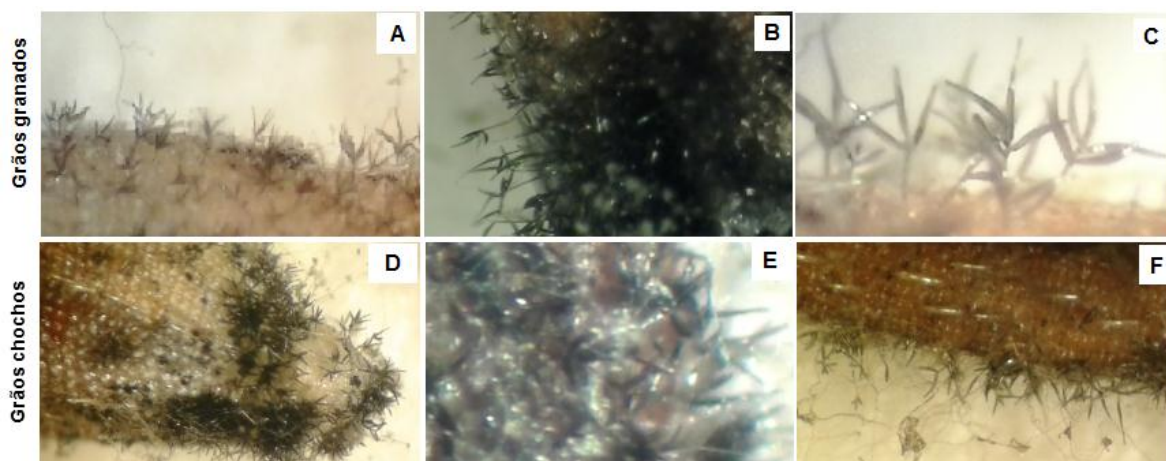


Figura 10 - Incidência de *E. rostratum* em grãos granados BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e Irga 424 (C) e chochos BRS Pelota (D), Puitá INTA-CL (E) e Irga 424 (F) de arroz, inoculados na fase de floração da cultura. Capão do Leão, RS, 2014.

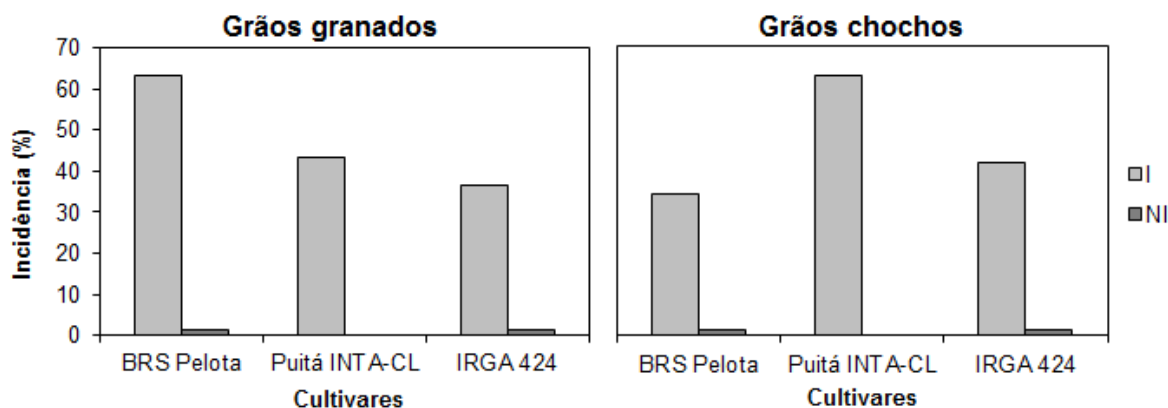


Figura 11 - Incidência de *E. rostratum* em grãos granados e chochos de arroz, inoculados e não inoculados na fase de floração da cultura. Capão do Leão, RS, 2014.

A análise de quantificação de inóculo, mostrou diferença significativa entre as cultivares, com maiores valores para a cultivar BRS Pelota ($4,5 \cdot 10^4$), seguida pela cultivar Puitá INTA-CL ($2,3 \cdot 10^4$), a cultivar IRGA 424 apresentou o menor valor ($0,3 \cdot 10^4$) (Fig. 12).

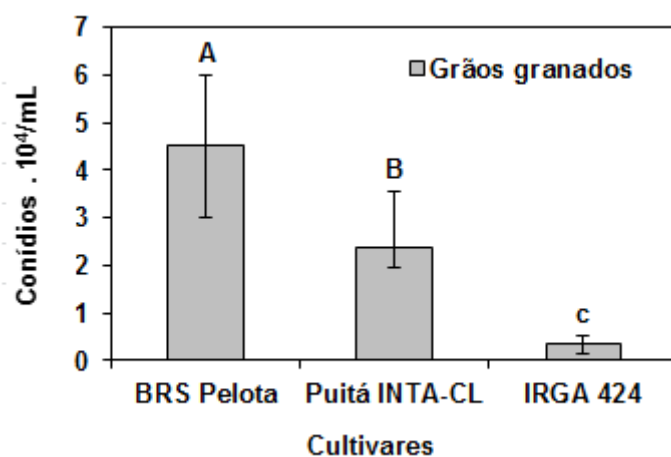


Figura 12 - Quantificação de inóculo em grãos granados de arroz, inoculados na fase de floração com *E. rostratum*. Capão do Leão, RS, 2014.

Os grãos granados oriundos dos tratamentos submetidos à inoculação, mesmo após a desinfestação superficial, apresentaram incidência de *E. rostratum* (Fig. 13). A cultivar BRS Pelota manteve uma maior incidência de 63 e 24% nos grãos desinfestados e não desinfestados respectivamente (Fig. 14).



Figura 13 - Presença de *E. rostratum* em grãos granados de arroz: BRS Pelota (A), Puitá INTA- CL (B) e IRGA 424 (C), submetidos a desinfestação superficial. Capão do Leão, RS, 2014.

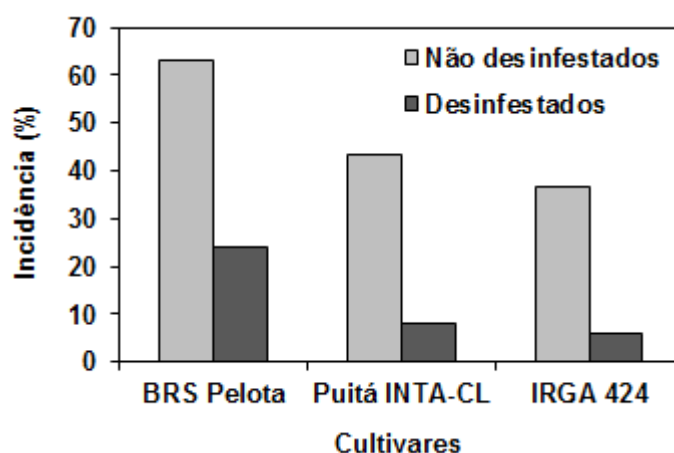


Figura 14 - Incidência de *E. rostratum* em grãos granados submetidos a desinfestação superficial. Capão do Leão, RS, 2014.

3.3.2 Índice da doença

Com relação à severidade da mancha nos grãos ocasionada por *E. rostratum* e representada pelo índice da doença, foi possível constatar diferença significativa do inóculo sobre os grãos granados e chochos, para todas as cultivares em estudo (Tab. 2).

Tabela 2 - Índice da doença em grãos de arroz granados e chochos, inoculados (I) e não inoculados (NI) com o fungo *E. rostratum* na fase de florescência. Capão do Leão, RS, 2014.

Cultivares	Grãos granados		Grãos chochos	
	Inoculado	Não inoculado	Inoculado	Não inoculado
BRS Pelota	23,40**	8,30	31,8*	4,5
	$p = 0,004$		$p = 0,030$	
Puitá INTA-CL	11,3*	6,0	17,3*	7,3
	$p = 0,051$		$p = 0,019$	
IRGA 424	13,6*	5,6	12,27**	4,6
	$p = 0,038$		$p = 0,001$	

3.3.3 Componentes de produção

Para peso de mil grãos não ocorreu diferença significativa para os efeitos de cultivar ($F = 0,86$; $p = 0,45$), inoculação ($F = 1,41$; $p = 0,26$) e interação dos fatores de tratamentos testados ($F = 0,14$; $p = 0,87$) (Tab. 4). Para as demais variáveis respostas avaliadas (Tab. 3 e 4). Houve interação entre os fatores de tratamento cultivar e inoculação,

Com relação ao número de espiguetas granadas sem a presença da inoculação, não ocorreu diferença entre as cultivares. Mas, quando foi realizada a inoculação com *E. rostratum*, a maior resposta ocorreu na cultivar Puitá INTA-CL, que diferiu da cultivar IRGA 424. Ao se realizar a comparação da inoculação, somente na cultivar IRGA 424 ocorreu diferença entre com e sem inoculação (Tab. 3). Para o número de espiguetas chochas, sem a presença da inoculação, ocorreu diferença para a cultivar BRS Pelota, com a presença de inoculação houve diferença significativa para a cultivar IRGA 424. A comparação da inoculação, apenas para a cultivar Puitá INTA-CL, não ocorreu diferença entre com e sem inoculação (Tab. 3). Quanto ao número de espiguetas por panículas, sem a presença da inoculação, ocorreu diferença para a cultivar Puitá INTA-CL, igualmente com a presença de inoculação. Ao se comparar o fator inoculação, apenas para a cultivar Puitá INTA-CL ocorreu diferença entre com e sem inoculação (Tab. 3). Para o peso de panículas sem a presença da inoculação, não

ocorreu diferença entre as cultivares, ao passo que quando foi realizada a inoculação, houve diferença significativa para a cultivar Puitá INTA-CL com uma menor resposta em relação as demais cultivares. Para comparação da inoculação, foi possível observar diferença significativa para as cultivares BRS Pelota e IRGA 424 entre com e sem inoculação (Tab. 3). Quanto a incidência sem a presença da inoculação, ocorreu diferença significativa para a cultivar Puitá INTA-CL, com a presença da inoculação, a maior resposta ocorreu na cultivar BRS Pelota, que diferiu das demais cultivares. Ao se comparar cultivares inoculadas com não inoculadas, ocorreu diferença significativa para as três cultivares (Tab. 4).

Tabela 3 - Número de espiguetas granadas, de espiguetas chochas e de espiguetas por panículas de arroz das cultivares BRS Pelota, IRGA 424 e Puitá INTA-CL em função da inoculação com *E. rostratum*. Capão do Leão, RS, 2014.

Cultivar	Número de espiguetas granadas		Número de espiguetas chochas		Número de espiguetas por panículas	
	Sem inoculação	Com inoculação	Sem inoculação	Com inoculação	Sem inoculação	Com inoculação
BRS Pelota	49,53±8,20a ^{ns}	27,97±7,44ab ^{1/}	45,10±2,50b *	78,93±4,02b	1012,33±26,03a ^{ns}	1069±55,56b
IRGA 424	36,71±7,68a *	10,33±0,82b	70,83±3,09a *	100,17±2,56a	1081,67±55,98a ^{ns}	1107±30,61b
Puitá	27,87±7,78a ^{ns}	36,00±5,97a	81,95±2,05a ^{ns}	83,03±4,30b	940,50±7,50b *	1279±16,00a

^{1/} Média de quatro determinações ± erro padrão. Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) comparando as cultivares, dentro da inoculação. ^{ns} e *, Não-significativo e significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação, para cada cultivar.

Tabela 4 - Peso de panículas, de mil grãos e incidência em arroz das cultivares BRS Pelota, IRGA 424 e Puitá INTA-CL em função da inoculação com *E. rostratum*. Capão do Leão, RS, 2014.

Cultivar	Peso de panículas		Peso de mil grãos ^{NS}		Incidência	
	Sem inoculação	Com inoculação	Sem inoculação	Com inoculação	Sem inoculação	Com inoculação
BRS Pelota	1,62±0,18a *	0,84±0,03b ^{1/}	2,58±0,04	2,62±0,13	2,50±1,04a *	31,50±1,50a
IRGA 424	1,14±0,03a *	0,68±0,10b	2,45±0,08	2,55±0,05	1,50±0,87a *	15,67±2,33b
Puitá	1,07±0,21a ^{ns}	1,19±0,16a	2,45±0,10	2,57±0,03	0,00±0,00b *	21,50±1,94b

^{NS}: não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$). ^{1/} Média de quatro determinações ± erro padrão. Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) comparando as cultivares, dentro da inoculação. ^{ns} e *, Não-significativo e significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação, para cada cultivar.

Correlacionando os componentes de rendimento com a incidência, que é o principal objetivo desse trabalho, a única correlação positiva ocorreu entre número de espiguetas por panículas com a incidência ($r = 0,70$; $p = 0,007$), demonstrando que o acréscimo do número de espiguetas por panículas resultou no aumento da incidência.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Pearson e valores de $p \leq 0.05$ entre as variáveis dependentes das cultivares de arroz BRS Pelota, IRGA 424, Puitá INTA-CL submetidas à inoculação com *E. rostratum*. Capão do Leão, RS, 2014.

Variáveis	NEG ^{1/} (1)	NEC (2)	NEP (3)	PDP (4)	PMG (5)	Incidência (6)
(1)	1,000					-0,160 0,569
(2)		1,000				0,416 0,157
(3)			1,000			0,700 0,007
(4)				1,000		-0,203 0,526
(5)					1,000	0,400 0,156
(6)						1,000

* Coeficientes de correlação de Pearson. ** Valores de p . NEG: Número de espiguetas granadas; NEC: Número de espiguetas chochas; NEP: Número de espiguetas por panículas; PDP: Peso de panículas; PMG: Peso de mil grãos.

3.4 Discussão

Através do método *Blotter test* foi observado uma elevada incidência de *E. rostratum*, tanto em grãos granados como grãos chochos de arroz, evidenciando a capacidade do fungo em colonizá-los, indicando baixa qualidade sanitária dos grãos, além da utilização destas como meio de veiculação, o qual, pode resultar na introdução do patógeno em áreas isentas.

O parâmetro incidência de patógenos nas sementes é importante, pelo fato de estabelecer as condições sanitárias para comercialização dos lotes de sementes. As medidas a serem adotadas, uma vez que há exigências com relação à sanidade, propondo-se limites de tolerância para certos patógenos.

Para *Pyricularia griseae* (T.T. Hebert) M.E. Barr e *B. oryzae* no arroz, essa tolerância pode chegar a 5%, para outros patossistemas como: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, (1889), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897)

Vauterin, Hoste, Kersters & Swinger (1995) (Xap) / feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a tolerância é 0% (MACHADO, 1994; APPS, 2004). Grãos que apresentam elevado grau de incidência e sejam destinados a serem utilizadas como insumos agrícolas, podem contribuir com acréscimos de inóculo fúngico no campo, uma vez que há a presença no lote de um maior número de sementes com a presença do patógeno, podendo ocasionar elevados níveis de doenças. Em estudo realizado por Araújo et al. (2012), sementes de algodão (*Gossipium hirsutum* L.) com a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, apresentaram, de acordo com o tempo de exposição da semente ao patógeno, um grau de severidade crescente.

À incidência em grãos de tratamentos que não receberam inoculação neste trabalho, se deve a contaminação, uma vez que, tratamentos inoculados e não inoculados estavam dispostos no mesmo ambiente (adensamento), podendo haver a transferência de inóculo entre plantas. Esse é um fato conhecido na literatura, como citado por Casa et al. (2007), em que houve elevada influência do adensamento em plantios de milho (*Zea mays* L.) no aumento da incidência de podridões do colmo causada por uma associação de patógenos.

Associado a incidência, a concentração de inóculo sobre os grãos é outro parâmetro fitossanitário relevante, as grandes concentrações de inóculos presentes nas amostras analisadas, como na cultivar BRS Pelota e Puitá INTA-CL, demonstram a importância das sementes poderem ser fonte de inóculo para futuros ciclos da cultura.

A transmissão de patógenos via sementes, pode está ligada estreitamente a outros fatores, dentre os quais, à localização. Inóculo localizado em tecidos mais internos conseguem sobreviver a condições adversas. Reis et al. (2006), observaram elevado índice de *Alternaria duci* (J.G. Kühn) J.W. Groves; Skolko, (1944) e *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (1912), em sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.), mesmo ao serem submetidas a tratamento químico.

Com relação a *E. rostratum*, é possível que o fungo infecte tecidos internos, pois mesmo após a desinfestação, foi possível detectá-lo associado aos grãos. Há relatos na literatura de casos, em que patógenos infestando sementes foram eliminados pela utilização de hipoclorito de sódio, assim como observado por Hadas et al. 2001. Esse fato enfatiza e reforça a hipótese de *E. rostratum* está infectando partes internas dos grãos, isso se deve, possivelmente ao fato de que

esse patógeno foi inoculado na fase de florescência, conhecida por ser uma das fases mais crítica dos cultivos agrícolas ao ataque de patógenos, concordando com May-de Mio et al. (2008); Nechet; Halfeld-Vieira (2011).

Segundo Bordin et al. (2014), na cultura do arroz, os valores de severidade das manchas foliares quantificados na fase de florescência, mostraram níveis mais elevados em relação a fases anteriores (final de perfilhamento, iniciação da panícula e emborrachamento), indicando uma maior susceptibilidade da cultura a patógenos na fase de floração.

O índice da doença (Tab. 2) mostra os efeitos causados por *E. rostratum* nos grãos granados, indicando que esse patógeno é capaz de causar manchas aos grãos de arroz em todas as cultivares estudadas, além de promover altos níveis de índice de doenças, chegando a valores similares aos de alguns patógenos como *B. oryzae* (MALAVOLTA et al., 2007). Toxinas podem estar envolvidas com altos graus de severidade em grãos, patógenos sintetizam metabólitos de baixo peso molecular que auxiliam na habilidade de infecção e deterioração dos grãos, um exemplo é a produção de cercosporina por *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) MW Garner (ALMEIDA et al., 2005).

Elevada incidência de *E. rostratum* como as encontradas nesse trabalho, em grãos granados e chochos de arroz, diminuem a qualidade dos grãos sobre vários aspectos, no que diz respeito à qualidade sanitária, visual e a produção. É importante salientar ainda que as diferenças encontradas nos grãos chochos para todas as cultivares, evidenciam a presença do inóculo como promotor de esterilidade.

De modo geral houve uma forte influência do fator cultivar, sobre os componentes de produção, com relação a cultivar Puitá INTA-CL, esta se mostrou superior às demais para quase todas as variáveis estudadas.

A anatomia e arquitetura das plantas têm sido relatadas como fatores de proteção, mecanismos estruturais como tricomas, estômatos e cutícula, constituem-se como a primeira barreira de defesa dos vegetais contra fitopatógenos. Kim et al. (2004), conferiram esses aumentos na espessura da cutícula de frutos de pimenta (*Capsicum annuum* L.) em cultivares resistentes a antracnose. Um fato importante relacionado com a cultivar Puitá INTA-CL é a média suscetibilidade a brusone e a mancha dos grãos, em trabalho realizado por

Meneses et al. (2014), os níveis de incidência de *B. oryzae* e *Bipolaris cynodontis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker, principais espécies associadas com sementes de arroz no sul do Brasil, mostraram-se próximo a 0% para essa cultivar.

Quase todos os componentes de produção estudados foram influenciados pelo fator inoculação (Tab. 3 e 4), com exceção do peso de 1000 grãos, explicado por ser um componente que consiste na seleção dos grãos para sua realização. No número de espiguetas granadas houve redução desse componente apenas para a cultivar IRGA 424 refletindo também no número de espiguetas chochas. Para a cultivar BRS Pelota, mesmo não havendo diferença significativa para o componente número de espiguetas granadas, o efeito inoculação foi refletido no número de espiguetas chochas (Tab. 3) e peso por panícula (Tab 4). A presença de inóculo fúngico na fase de floração, aliado aos resultados obtidos, reforça a hipótese dessa fase ser uma das mais críticas ao ataque de patógenos. Esse fato se deve possivelmente a instalação do patógeno, já nos primeiros instantes de formação do grão havendo, portanto, o contato direto do inóculo com as partes internas das glumas. Em estudo realizado por Teplizky et al. (2011), avaliando os rendimentos na cultura do arroz, obtidos de um experimento onde se testou o controle químico em diferentes fases da floração, observaram redução em componentes de rendimento e elevada incidência de patógenos machadores nos grãos, resultantes de atrasos na aplicação.

Danos recorrentes de infecções florais também podem ser notados em outras interações, no patossistema *Gibberella zeae* (Schw) Petch-trigo, é comum a perda por infecção floral, Casa et al. (2004), relatam reduções de até 70%. Em pessegueiro, a podridão parda causada por *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey, é conhecida por iniciar o processo de infecção na primavera, atacando os botões florais chegando a índices elevados de botões florais infectados dependendo do manejo adotado (MIO et al., 2008).

A correlação entre incidência e componentes de rendimentos revela uma baixa eficiência deste parâmetro em expressar a influência de *E. rostratum* nos danos ocasionados aos componentes de rendimentos, talvez pelo fato da incidência ser uma variável categórica, indicando apenas a presença ou ausência do patógeno sobre os grãos, não determinando a severidade do patógeno sobre os mesmos.

Em relação à correlação positiva ocorrida entre incidência e número de espiguetas por panícula, se deve ao fato de que no momento da inoculação, (estádio de floração), as espiguetas já estavam formadas, não havendo influência do patógeno sobre as mesmas, indicando que quanto maior o número de espiguetas conseqüentemente maior incidência.

3.5 Conclusão

E. rostratum apresentou elevada incidência e concentração de inoculo em grãos de arroz das cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424;

E. rostratum Prevaleceu em grãos das cultivares BRS Pelota Puitá INTA-CL e IRGA 424, após serem submetidos a desinfestação superficial;

As cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424 apresentam suscetibilidade a *E. rostratum*, havendo danos aos grãos e nos componentes de rendimentos.

4 CAPÍTULO III – Resposta celular e mecanismos bioquímicos ativados em arroz na interação com *Exserohilum rostratum*

4.1 Introdução

As plantas estão sujeitas aos efeitos de fatores ambientais (abióticos) e ao ataque de fitopatógenos (bióticos) resultando em doenças que é a interrupção da realização adequada das funções fisiológicas (AGRIOS, 2005). Os registros de doenças em plantas remontam desde os tempos em que o homem iniciou os cultivos agrícolas, inicialmente atribuídas a causas sobrenaturais, e com o avanço no conhecimento microbiológico foi possível confirmar a natureza biótica das doenças em plantas (BERGAMIM FILHO; KITAJIMA, 2011).

Ao longo do processo evolutivo, plantas e patógenos coevoluíram desenvolvendo e aprimorando uma diversidade de mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa e ataque resultando em compatibilidade ou incompatibilidade nas suas interações (DE MELO et al., 2008). Nas interações compatíveis, que resultam em doença, após a deposição do conídio no hospedeiro, ocorre o reconhecimento e início do processo infectivo com a adesão na superfície vegetal e a formação de estruturas de penetração, seguido da colonização dos tecidos vegetais resultando na alteração funcional de estruturas e tecidos do hospedeiro como a epiderme, parênquimas lacunoso e paliçádico (GOMES et al., 2010, MUSSURY et al., 2012). Por outro lado, como resposta e tentativa de defesa por parte do hospedeiro, ocorre a ativação de uma complexa

cadeia de eventos bioquímicos e fisiológicos resultando no acúmulo de importantes compostos como o hormônio ácido salicílico envolvido na resistência basal e sistêmica a fitopatógenos (SANCHEZ et al., 2013), a formação de espécies ativas de oxigênio (EROs) e aumento da atividade enzimática, tanto envolvidas no sistema antioxidante, como as peroxidases, polifenoloxidasas e catalases (ALMEIDA et al., 2012, ITAKO et al., 2012, BARBOSA et al., 2014), quanto as de ação direta sobre o patógeno como as quitinases (OBLESSUC et al., 2012, MORKUNAS; BERDNASKI; KOZŁOWSKA; 2004).

Por outro lado, na natureza a regra é a resistência, uma vez que, diante de uma infinidade de patógenos poucos conseguem invadir e se multiplicarem nos tecidos do hospedeiro. Esse fato leva a classificação de plantas quanto à resistência a fitopatógenos, em dois grupos distintos: resistência de não hospedeiro e resistência hospedeiro, ambas mediadas por componentes estruturais e bioquímicos (PASCHOLLATI, 2011).

Ambas as resistências são controladas por caráter polimórfico, que podem ser vencidas por um caráter controlador da virulência em algumas espécies de patógenos também polimórficos, mediante processos coevolutivos nas interações planta-patógeno (ARAYA, 2003). Cabe destacar que dentre os patógenos fungicos que atacam o arroz (*Oryza sativa* L.) verifica-se que nas condições atuais, as doenças de maior impacto são a brusone (*Magnaporthe oryzae* Corr.), mancha parda (*Cochliobolus miyabeanus* Ito & Kuribayashi), escaudadura (*Monographella albescens*) (Thuemen) Parkinson et al.), mancha-estreita (*Esphaerulina oryzina* K. Hara), queima das glumelas (*Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema et al.), mal do colo (*Fusarium oxysporum* (Schi.) Snyder & Hansen), queima das bainhas (*Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk.), falso carvão (*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takah) e podridão do arroz (*Leptosphaeria salvinii* Cat) (BEDENDO; PRABHU, 2005).

Com a expansão das áreas agrícolas e as condições dos constantes tráfegos comerciais de insumos internos e entre os países, corre-se o risco da veiculação de patógenos em áreas onde antes não existia. Na literatura há muitos relatos de casos de surgimento de novos patógenos nas culturas agrícolas no Brasil, como o *Sporothrix eucalypti*, agente causal da esporotricose do eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e o fungo *Puccinia kuehnii*, agente causal da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (ALFENAS et al., 2001;

BARBASSO et al., 2010). Para que sejam impostas as melhores condições de manejo adequado a novos fitopatógenos, é de grande importância o conhecimento preliminar dos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro, uma vez que sobre influência de constantes mudanças climáticas e a tendência da uniformização dos cultivos agrícolas, têm-se a possibilidade deste tornarem-se pragas de grande importância para as culturas.

Nesse sentido, diante da identificação de *Exserohilum rostratum* associado a grãos de arroz, uma espécie fúngica até então reportado no Brasil apenas na cultura do açaizeiro (POLTRONIERI et al., 2008), surge a necessidade de maior conhecimento da interação arroz/*Exserohilum rostratum*. Visando à compreensão do patossistema foi desenvolvido este estudo buscando elucidar mecanismos de defesa citológicos e bioquímicos durante o processo de patogênese, bem como alguns mecanismos de ataque do patógeno.

4.2. Material e métodos

4.2.1 Material vegetal e seu cultivo

As cultivares de arroz (*O. sativa* L.) BRS Pelota (EMBRAPA), IRGA 424 (IRGA) e Puitá INTA-CL (BASF S/A) foram utilizadas nos experimentos. As sementes foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1% v/v) e em seguida plaqueadas em caixas gerbox. Sete dias após, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 4,5 L. Utilizou-se 4 kg de solo vaso⁻¹, apresentando características químicas conforme descrito na tabela 1. A fertilização e os tratos culturais foram realizados conforme as recomendações técnicas para a cultura do arroz no estado do Rio Grande do Sul (SOSBAI, 2012).

4.2.2 Delineamento experimental

O experimento foi realizado no delineamento em blocos casualizados e analisado como um trifatorial do tipo 3 × 2 x 5 sendo os fatores: cultivares (BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424), inoculação do patógeno (com e sem inoculação) e os tempos de avaliações (12, 18, 24, 36 e 48 hai), com 3 repetições

para cada tratamento. As repetições foram constituídas por um vaso com três plantas.

4.2.3 Isolado, cultivo de *E. rostratum* e inoculação das plantas de arroz

O isolado fúngico LPS-01 de *E. rostratum*, foi obtido da micoteca pertencente ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Elizeu Maciel (FAEM), na Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), preservado em meio BDA (batata-dextrose-ágar), sobre temperatura de 5 °C, conforme metodologia descrita em Mafia; Alfenas; (2007).

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio BDA a temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Colônias com sete dias de idade foram utilizadas para preparo da suspensão de inóculo. Para tal, adicionou-se 10 mL de água esterilizada nas placas contendo o fungo e com um pincel de cerdas macias foi realizado a raspagem das colônias fúngicas. A suspensão resultante foi filtrada em dupla camada de gaze e a concentração de conídios ajustadas para $2,8 \times 10^4$ conídios.mL⁻¹. A suspensão foi pulverizada na superfície foliar das plantas de arroz na fase de florescimento (SOSBAI, 2012) usando um pulverizador manual (modelo sx-217) até próximo do escoamento superficial. As plantas que não foram inoculadas foram pulverizadas com água e utilizadas como testemunhas nos testes bioquímicos. Após inoculação, todas as plantas (inoculadas e não inoculadas) foram postas em câmara úmida por meio de uma cobertura plástica individual por um período de 72 h sobre condições de temperatura variando 18 a 40 °C e humidade relativa entre 80 e 95 (%). As condições ambientais foram registradas diariamente após a inoculação por meio de Data logger modelo OM-62 (OMEGA®).

4.2.4 Avaliação do período de incubação (PI) e respostas citológicas

O período de incubação (PI), definido como período em horas da inoculação até a manifestação dos sintomas da doença, foi determinado como o tempo médio necessário para que pelo menos uma planta em cada vaso apresentasse os sintomas da doença. Para tanto, as plantas foram avaliadas a cada 3 horas após a inoculação utilizando-se uma lupa de bolsa com magnificação de 20X.

Para a avaliação das alterações citológicas das plantas induzidas pela presença do *E. rostratum* foram coletadas 40 amostras por cultivar (1.5 cm²) de folhas equidistantes nas plantas inoculadas com o patógeno às 12, 18, 24, 36 e 48 horas após a inoculação (hai). Após a coleta, os fragmentos de tecido foliar foram descoloridos em etanol 75% (v/v) e clareados por duas semanas em uma solução de cloral hidratado 1 g.mL⁻¹ (Sigma Aldrich, St. Luis, MO). Para montagem das lâminas, foram utilizados 20 fragmentos de tecido foliar por repetição totalizando 60 fragmentos por cultivar em cada horário. Foram fixados com a face adaxial voltada para cima, adicionando-se duas (2) gotas do meio de Hoyer's (CUNNINGHAM, 1972) e 10 µl do corante Trypan blue.

Em pelo menos 10 sítios de infecção por repetição foram avaliados: a porcentagem de conídios com apressório para cada horário observando; quantos conídios em reação aos 10 sítios haviam diferenciados apressórios; o número de células epidérmicas necrosadas (NCN) e a intensidade do escurecimento celular (IEC). Cada sítio de infecção foi constituído por um conídio germinado, onde foram observadas aproximadamente 30 células por sítio. O número e a intensidade do escurecimento nas células epidérmicas foram agrupados em três categorias conforme Rodrigues et al. (2005) e Dallagnol et al. (2011): 1 – Parede das células epidérmicas com bordas levemente amareladas; 2 – Parede das células epidérmicas completamente amareladas; 3 – Células epidérmicas completamente amarelas a marrom e evoluindo para as células vizinhas. As células epidérmicas foram consideradas necrosadas quando apresentavam as bordas levemente amareladas a completamente marrons e expandindo-se evoluindo para as células vizinhas.

4.2.5 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs) e derivados lignina ácido tioglicólico (DLAT), e atividade das enzimas catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1)

Para determinação das análises bioquímicas, tecido foliar das diferentes cultivares inoculadas e não inoculadas foram coletadas às 12, 18, 24, 36 e 48 hai, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra-freezer (-70 °C) para posterior análise.

A extração dos compostos fenólicos solúveis totais (CSFTs) foi realizada em 0,1g de tecido foliar. Para tal, a amostra foi macerada em almofariz e pistilo contendo N₂, em seguida levados para tubos eppendorf e homogeneizado com 1,5 mL de metanol 80%, seguido por agitação em mesa agitadora a 200 rpm a 25 °C por 24 h. O extrato metanólico foi centrifugado a 12.000 x g por 4 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf, a partir do qual determinou-se a CSFTs. O resíduo foi armazenado em ultra-freezer (-70 °C) para determinação da DLAT.

A determinação dos CSFTs foi realizada segundo metodologia adaptada de Zieslin; Bem-Zaken (1993). A mistura de reação csonteve 0,75 µL do reagente Fenol Folin-Ciocalteu (0,25 N) (Sigma-Aldrich) mais 0,50 µL do extrato metanólico, 0,75 µL de carbonato de sódio (1M) e 1,5 mL de água destilada, a leitura foi realizada a 725 nm em espectrofotômetro (Bel[®] modelo UV-UM51) e os resultados expressos em µg de CFST kg⁻¹ de matéria fresca. Para determinação da curva padrão e quantificação dos CFST, foi utilizado o ácido Pirogálico P.A.-A.C.S. (SYNTH[®]).

A concentração de DLAT foi determinada pelo método de Barber; Ride (1988). O resíduo da extração de CFSTs foi lavado com água destilada por meio de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e levando o resíduo a estufa por 24 horas a 65°C. O resíduo alcoólico-insolúvel seco, contendo lignina e ácidos fenólicos foi reidratado com 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e HCl a 2 N (1:10), seguido por aquecimento em banho-maria a 100 °C por 4 horas. Ao final das 4 horas, os eppendorfs foram imersos em gelo (4°C) por 10 minutos e centrifugados a 12000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1,5 mL de NaOH a 0,5 N. Submeteu-se a mistura por 24 horas em mesa agitadora (200 rpm) em temperatura de 25 °C, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo eppendorf onde adicionou-se 200 µL de HCl concentrado ao sobrenadante e os mesmos foram conservados a 4 °C por 4 horas para precipitação dos DLAT. Uma última centrifugação a 10.000 g por 10 minutos foi realizada, o sobrenadante descartado e o precipitado (castanho-alaranjado) foi dissolvido em 2 mL de NaOH a 0,5 N. A absorbância dos DLAT no

sobrenadante foi mensurada em espectrofotômetro a 280 nm e a concentração expressa em mg de DLAT kg^{-1} de matéria fresca, por meio de curva padrão com diferentes concentrações de lignina alcalina, éter 2- hidroxipropílico de lignina, éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Para a quantificação de atividade enzimática, os extratos foram obtidos conforme Peixoto et al. (1999) adaptado, macerando 0,5 g de tecido foliar em N_2 líquido e solução de extração constituída de tampão fosfato de potássio (concentração e pH), contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (1 mM) e polivinilpolipirrolidona (40 mg). Sendo centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para determinação das atividades enzimáticas.

A atividade da enzima catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) foi definida pela quantificação da degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (AZEVEDO et al., 1998). O meio de reação foi composto por 1.500 μL do tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescido de H_2O_2 (2,5 $\mu\text{L}:\text{mL}^{-1}$ do tampão de reação) e 25 μL do extrato vegetal. As leituras foram realizadas a 240 nm e os resultados expressos em μmol de H_2O_2 degradado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A metodologia utilizada para a quantificação da atividade das enzimas, peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1), foi conforme descrita por Dallagnol et al. (2011). A atividade da POX foi determinada pela quantificação colorimétrica da oxidação do pirocatecol. Tendo como meio de reação 475 μL de água destilada, 375 μL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 300 μL pirogalol 100mM, 300 μL H_2O_2 100mM e 15 μL do extrato vegetal. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm. Para o cálculo da atividade da POX foi utilizado o coeficiente de extinção de $0,00247 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANC; MAEHLEY, 1955). A determinação da atividade da PFO foi conforme descrita para a POX, com a exceção da utilização do peróxido de hidrogênio na solução de reação e utilizando 150 μL do extrato vegetal, a leitura para essa enzima foi realizada a 500 nm.

A concentração de proteínas utilizada para o cálculo da atividade das enzimas foi obtida pelo método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

4.2.6 Análise dos dados

Após verificação da homogeneidade das variâncias e normalização dos dados pelos testes de Cochran e Shapiro wilk respectivamente, procedeu-se a análise de variância (ANOVA) as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *t* de Student ou Tukey ($P \leq 0.05$). As análises foram realizadas no programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 2002).

4.3 Resultados

4.3.1 Avaliação do período de incubação (PI) e respostas citológicas

Na primeira avaliação realizada às 12 horas após a inoculação já foram observados conídios germinados com apressórios diferenciados para todas as cultivares (Fig. 15A, B e C), nos horários 18 e 24 hai é possível visualizar diferença significativa entre as cultivares e a partir das 36 hai todos os conídios observados para as 3 cultivares, apresentavam apressórios diferenciados (Fig. 16).

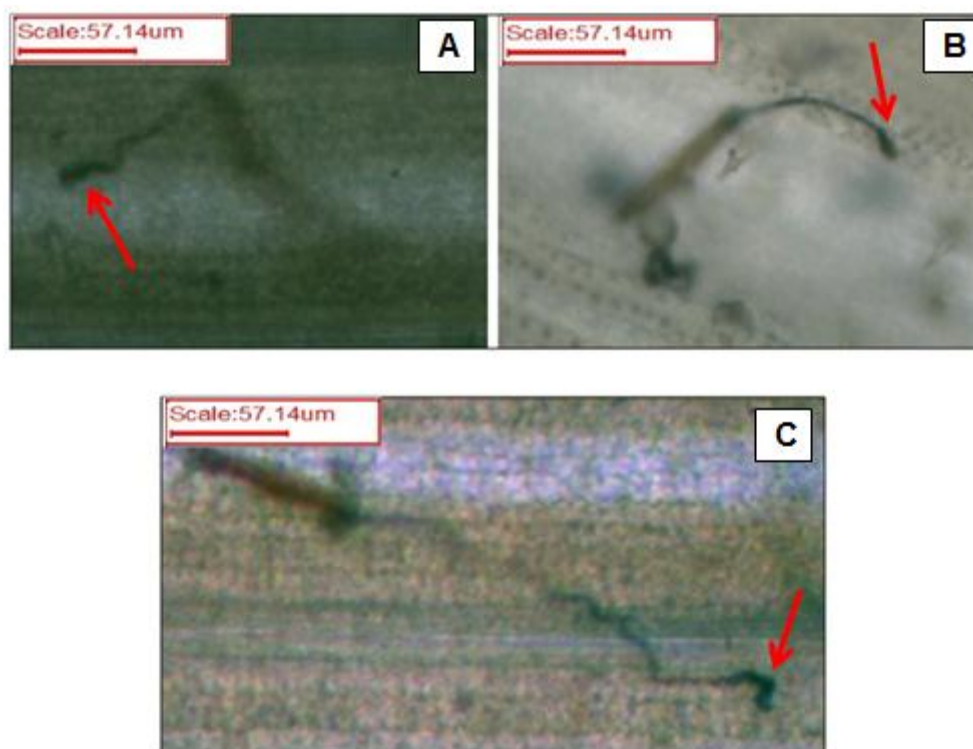


Figura 15 - Apressórios de *E. rostratum* na superfície adaxial de folhas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA -CL (B) e IRGA 424 (C) às 12 horas após a inoculação. Todas as imagens foram ampliadas 20x. Capão do Leão, RS, 2014.

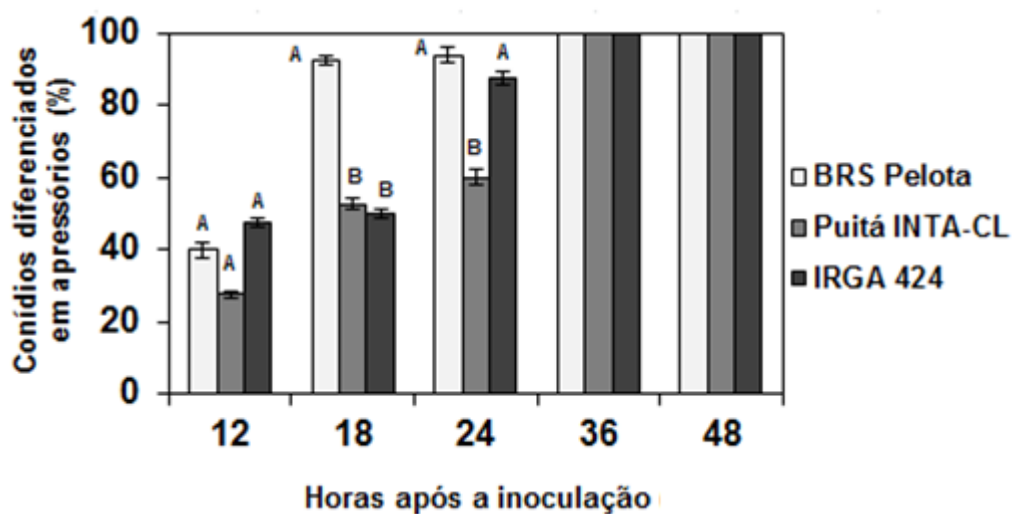


Figura 16 - Porcentagem de conídios com apressórios diferenciados na face adaxial das folhas de face adaxial das folhas de arroz das cultivares: BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) em diferentes horários após a inoculação de *E. rostratum*. Barras representam o desvio padrão, n=4. Capão do Leão, RS, 2014.

As primeiras células epidermais necrosadas foram observadas as 18 hai para as cultivares BRS Pelota e IRGA 424, para a cultivar Puitá INTA-CL só foi possível a visualização de células necrosadas a partir das 24 hai (Fig. 17). É

possível observar ainda na figura 17, diferença significativa às entre as cultivares às 18 e 24 hai.

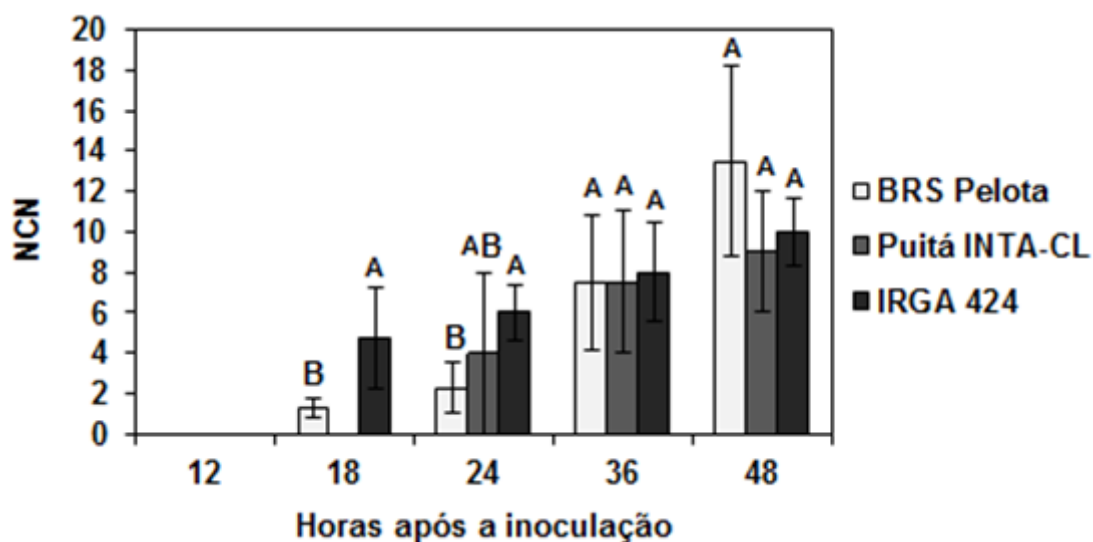


Figura 17 - Número de células necrosadas (NCN) na face adaxial em folhas de arroz, cultivares: BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424, em diferentes horários após a inoculação com *E. rostratum*. Capão do Leão, RS, 2014.

Os diferentes níveis de escurecimento das células epidérmicas estão categorizados na figura 18. A figura 19 apresenta a intensidade de escurecimento celular dos locais de apressórios, observados ao longo do tempo expressando parede das células epidérmicas com bordas levemente amareladas (nível 1) e células epidérmicas completamente amareladas (nível 2) a partir das 18 hai para a cultivar BRS Pelota apresentando leve diminuição ao longo do período de avaliação para o nível 1 e aumento no nível 2, com aparecimento de células epidérmicas completamente amarelas a marrom e evoluindo para as células vizinhas (nível 3) às 36 hai. Para a cultivar Puitá INTA-CL, foi possível a visualização de células necrosadas nos níveis 1 e 3 às 24 hai, com leve diminuição ao longo do tempo de avaliação para o nível 1 e estabilização para o nível 2, a presença de células no nível 3 foi possível às 36 hai sem apresentar aumentos ao longo do tempo de avaliação. A cultivar IRGA 424, apresentou os três níveis de escurecimento celular a partir das 18 hai, mantendo uma leve diminuição do nível 1 ao longo do tempo e aumento dos níveis 2 e 3.

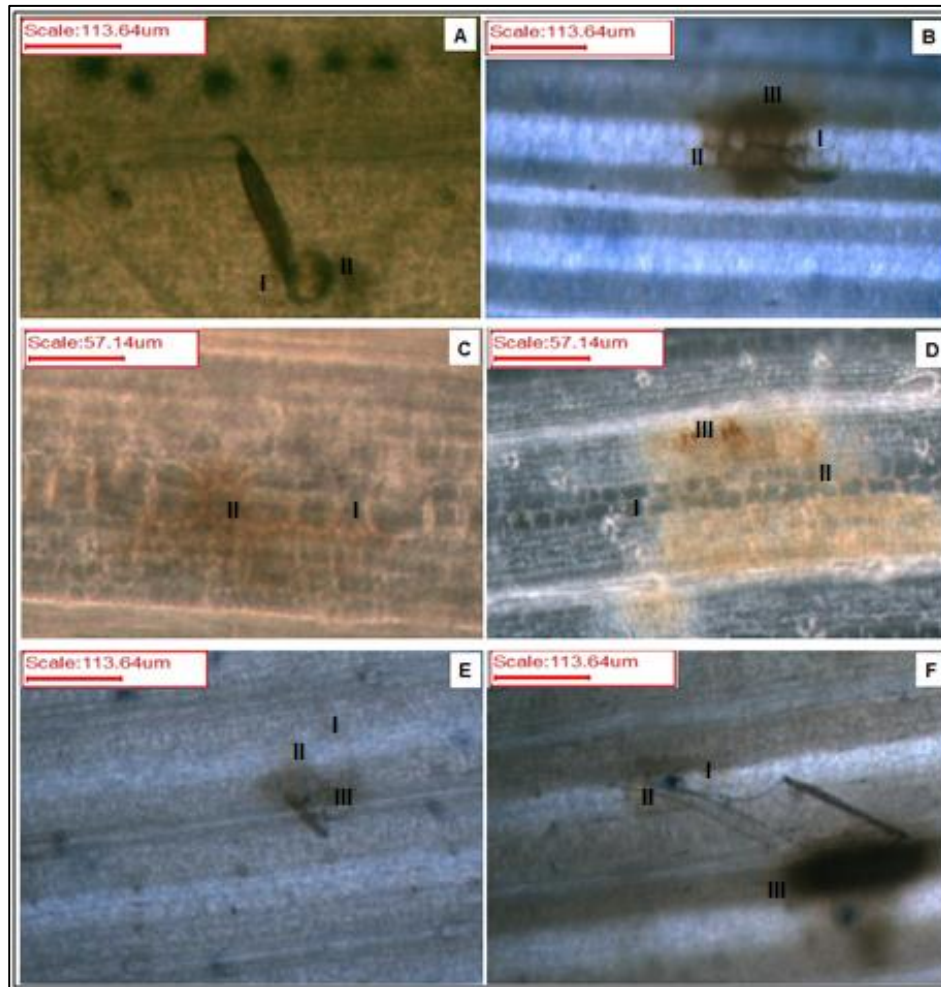


Figura 18 - Células necrosadas na face adaxial de folhas de arroz inoculadas com *E. rostratum*, onde: A - BRS Pelota com presença de células necrosadas nos níveis 1 e 2 às 18, B - BRS Pelota com presença de células necrosadas nos níveis 1, 2 e 3 às 48 hai, C - Puitá INTA-CL com células necrosadas nas categoria 1, 2 às 24 hai, D - Puitá INTA-CL com células necrosadas nas categorias 1, 2 e 3 às 36 hai, E - IRGA 424 com a presença de células necrosadas na categoria 1, 2 e 3 às 18 hai e F - IRGA 424 com a presença de células necrosadas nas categorias 1, 2 e 3 às 48 hai. Capão do Leão, RS, 2014.

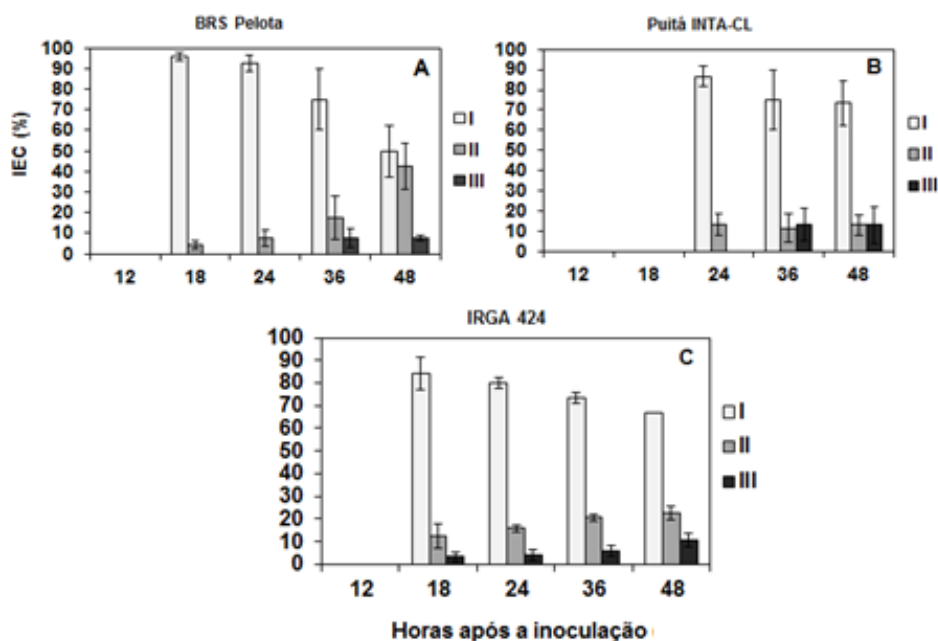


Figura 19 - Índice de escurecimento celular em tecido foliar de plantas de arroz cultivares: BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424, em diferentes tempos após a inoculação com *E. rostratum*. A intensidade do grau das manchas epidérmicas foi agrupada nas categorias: 1 - Parede das células epidérmicas com bordas levemente amareladas; 2 - Células epidérmicas completamente amareladas (amarelo palea); 3 - Células epidérmicas completamente amarelas a marrom e evoluindo para as células vizinhas. As barras representam o desvio padrão. Foram observados 10 locais de apressórios por repetição com conídio e tubo germinativo formado, n=4. Capão do Leão, RS, 2014.

4.3.2 Determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs) e derivados lignina ácido tioglicólico (DLAT), e atividade das enzimas catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1)

A enzima POX teve sua atividade aumentada em resposta a inoculação do patógeno em 33% para a cultivar BRS Pelotas às 48 hai (Fig. 20A), em 35% para a cultivar Puitá INTA-CL não inoculada as 12 hai, 33 e 53% às 18 e 24 hai para essa mesma cultivar inoculada, havendo uma estabilização às 36 hai, voltando a ocorrer um novo aumento de 40% às 48 hai (Fig. 20B). Para a cultivar IRGA 424 não foi detectada variação significativa na POX em resposta a inoculação do patógeno (Fig. 20C).

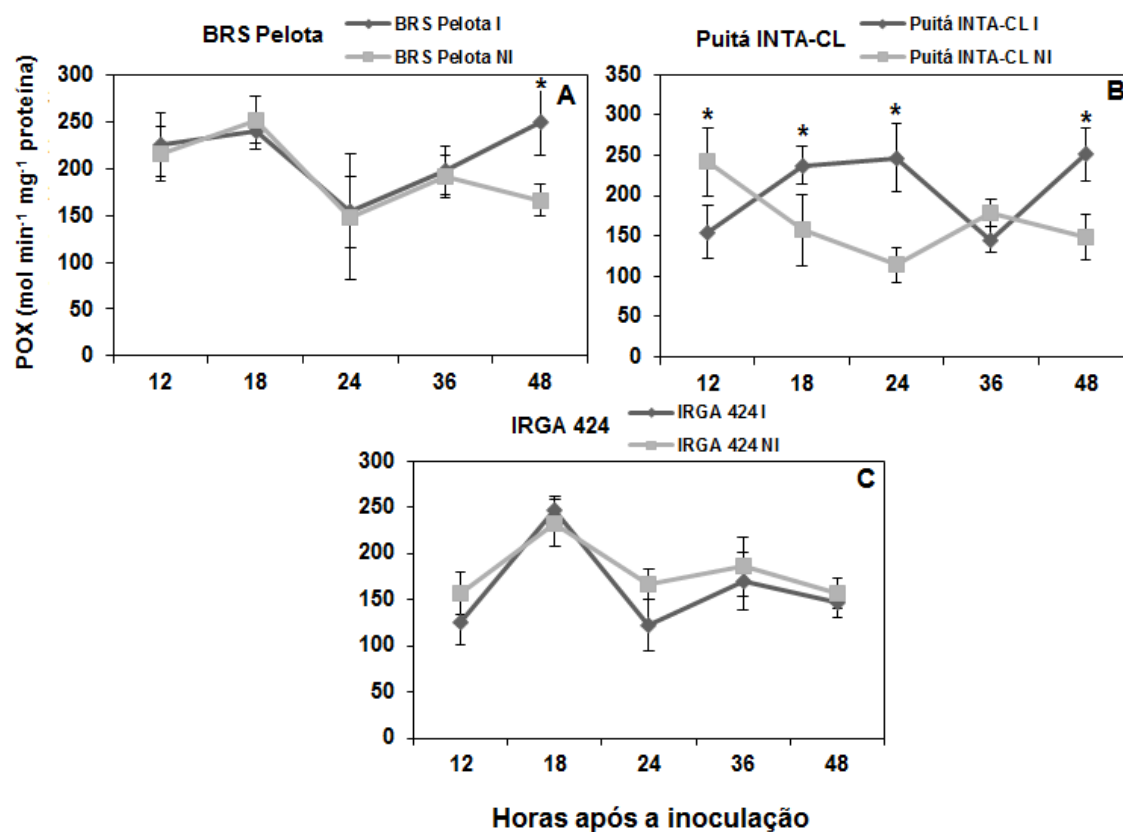


Figura 20 - Atividade da enzima peroxidase (POX) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempos após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, entre plantas inoculadas e não inoculadas. Capão do Leão, RS, 2014.

Quanto a atividade da enzima PFO, houve um aumento na sua atividade, em resposta a inoculação com o patógeno de 20 e 29%, respectivamente às 18 e 24 hai para a cultivar BRS Pelota (Fig. 21A), de 27,32 e 38%, respectivamente às 12, 24, 36 hai para a cultivar Puitá INTA-CL e 8% às 48 hai para a cultivar não inoculada (Fig. 21B). Para a cultivar IRGA 424, houve aumento de 36% na atividade da PFO em resposta a inoculação às 36 hai (Fig. 21C).

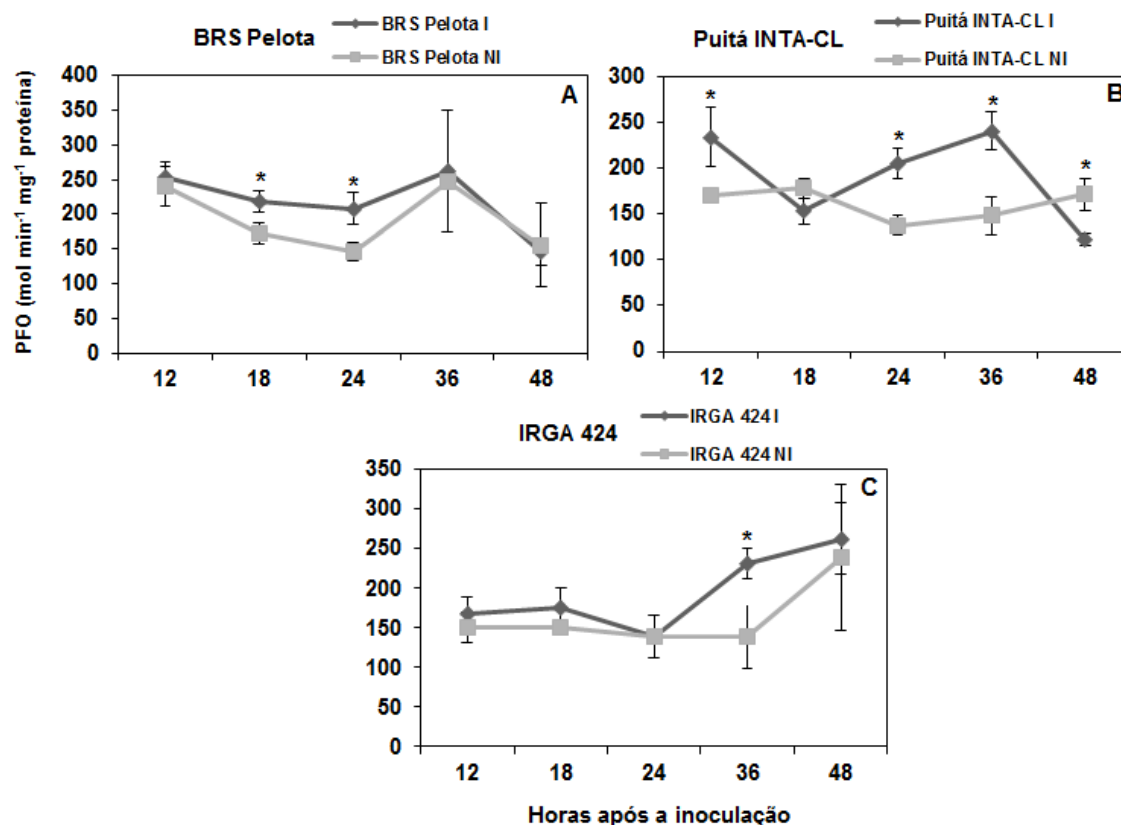


Figura 21 - Atividade da enzima Polifenoloxidase (PFO) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempos após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, entre plantas inoculadas e não inoculadas. Capão do Leão, RS, 2014.

Análise enzimática da CAT demonstrou um aumento de 24% na atividade na cultivar BRS Pelota não inoculada às 18 hai, 38 e 34%, respectivamente às 36 e 48 hai em resposta a inoculação com o patógeno (Fig. 22A). Houve um aumento de 41% às 48 hai para a cultivar Puitá INTA-CL (Fig. 22B) e para a Cultivar IRGA 424 não inoculado, houve aumento de 40 e 39%, respectivamente às 12 e 24 hai, e às 36 hai em 50% resposta a inoculação (Fig. 22C).

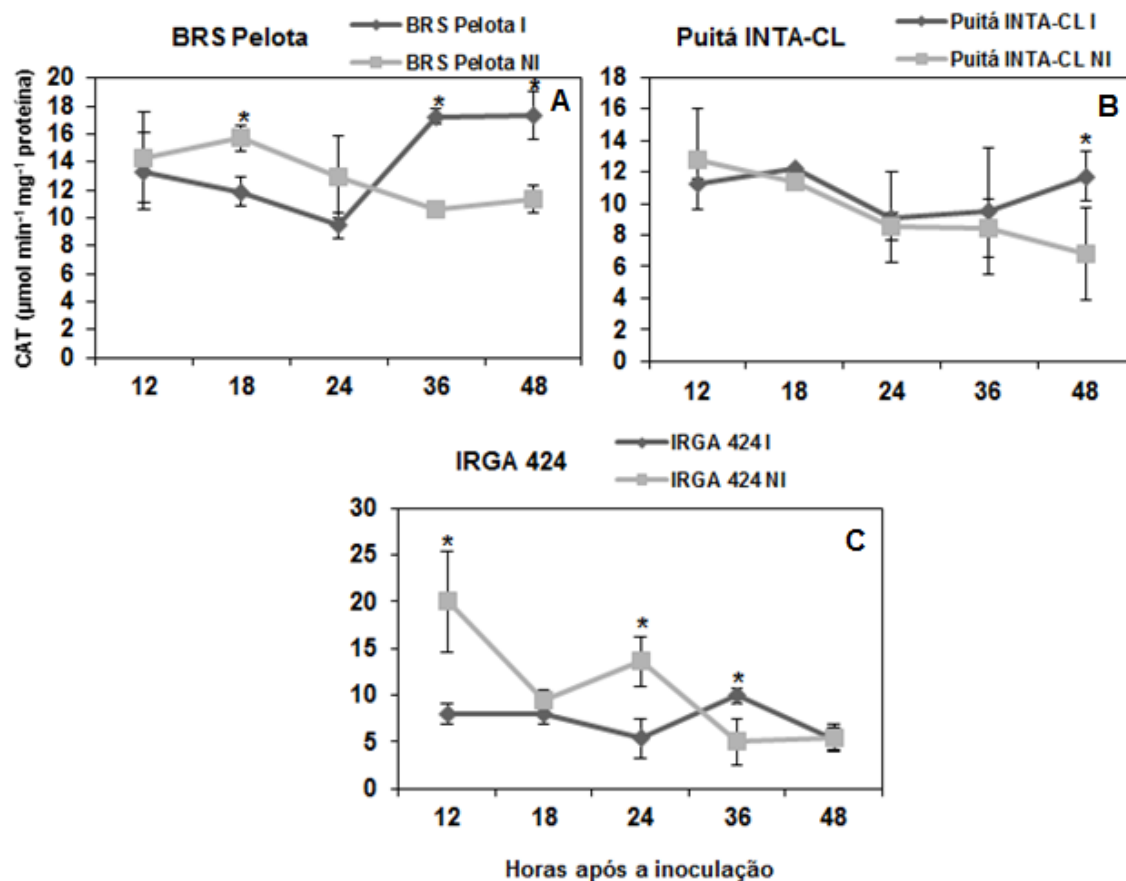


Figura 22 - Atividade da enzima catalase (CAT) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempos após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, entre plantas inoculadas e não inoculadas. Capão do Leão, RS, 2014.

Para a concentração de CFSTs não foi detectado diferença significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, independente da cultivar e do horário avaliado (Fig. 23A-C).

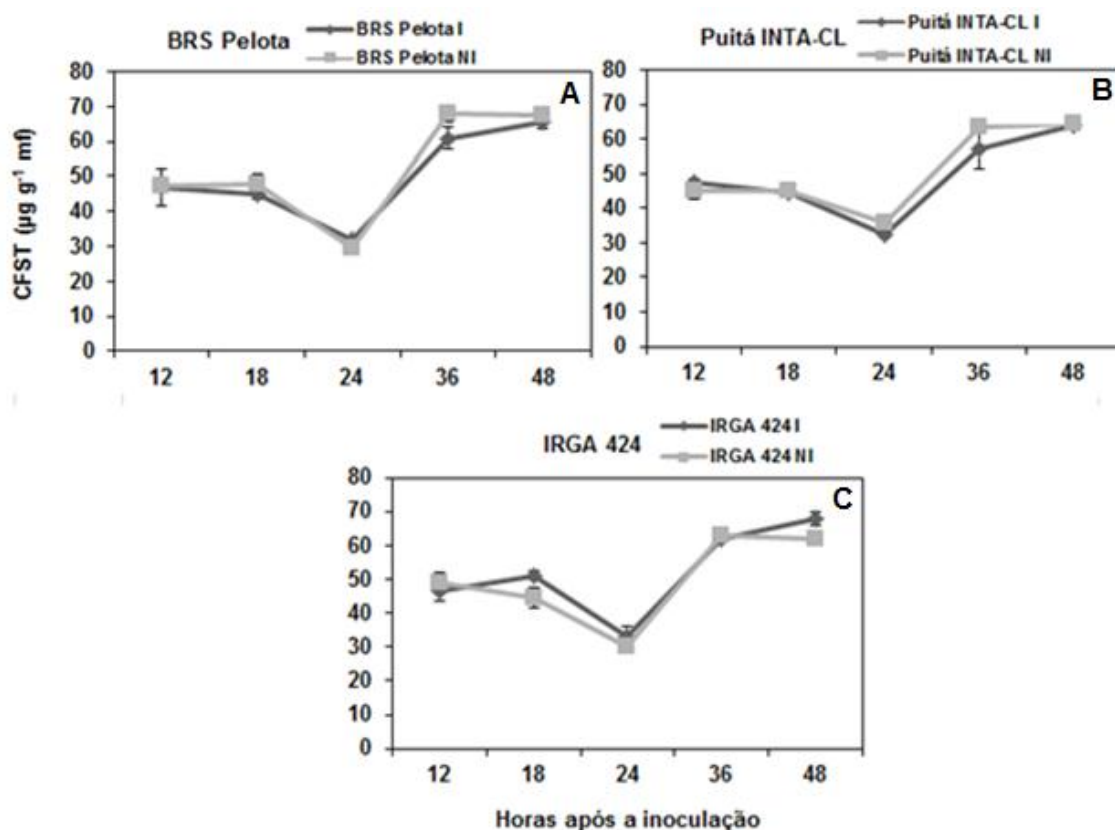


Figura 23 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempos a após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, entre plantas inoculadas e não inoculadas. Capão do Leão, RS, 2014.

A concentração do DLAT aumentou significativamente em 37% às 18 hai nas plantas inoculadas da cultivar BRS Pelota em comparação às plantas não inoculadas (Fig. 24A). Na cultivar Puitá INTA-CL não inoculada, a concentração de DLAT aumentou em 31% às 12 hai (Fig. 24B). Nas plantas inoculadas da cultivar Puitá INTA-CL houve aumento de 28 e 41%, respectivamente às 18 e 36 hai em comparação as plantas não inoculadas (Fig. 24B). Para a cultivar IRGA 424 a concentração do DLAT aumentou significativamente em 25% às 36 hai nas plantas inoculadas (Fig. 24C).

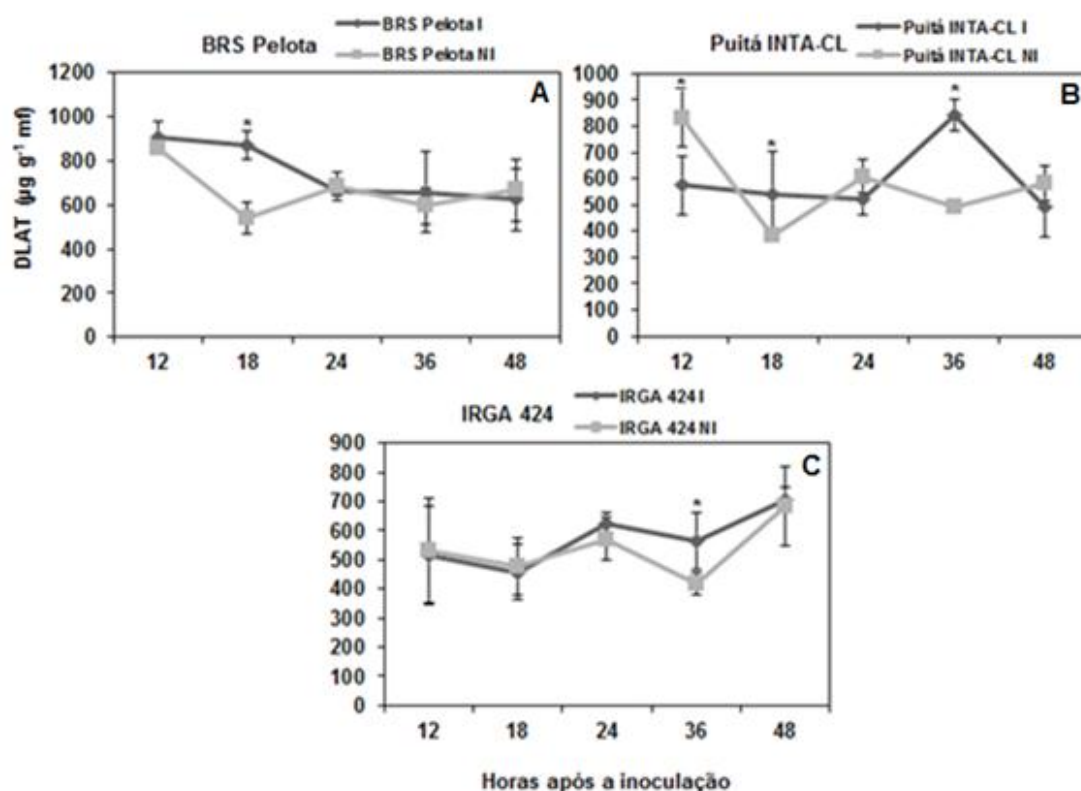


Figura 24 - Concentração dos derivados lignina ácido tioglicólico (DLAT) em tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pelota (A), Puitá INTA-CL (B) e IRGA 424 (C) não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com o fungo *E. rostratum* em diferentes tempo após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) pelo teste *t*, entre plantas inoculadas e não inoculadas. Capão do Leão, RS, 2014.

4.4 Discussão

E. rostratum foi capaz de causar sintomas em todas as cultivares de arroz estudadas, estabelecendo a condição de doença nas plantas. O período de incubação (PI) constitui-se, em um componente epidemiológico de grande importância, pois representa o tempo necessário para o patógeno causar danos no tecido vegetal. A variação nesse componente se dá, além das condições ambientais (GHINI et al., 2010), também, pela nutrição da planta e a espécie do patógeno (MICHEREFF et al., 2003; GUERRA et al., 2013). Nas condições em que foi realizado o experimento, o PI para *E. rostratum* destaca-se, por apresentar um valor relativamente baixo (de 24 até 36 hai), similar a patógenos como *B. oryzae* (CURVELO et al., 2013). Esse fato chama a atenção para a rapidez da infecção, levando ao aparecimento de sintomas em um curto espaço de tempo.

Um conjunto de fatores é necessário para a ocorrência de doenças em plantas, as condições climáticas, constituem-se como um desses fatores para que o processo de patogênese se estabeleça culminando com o aparecimento de sintomas na superfície foliar. Na literatura há vários exemplos relatando tal influência sobre patossistemas vegetais (ROSA; BASSETO; FURTADO, 2010; MEGETO; et al., 2014).

No presente trabalho, os dados referentes às condições climáticas para esse experimento avaliados por meio de Data logger modelo OM-62 (OMEGA[®]), revelam uma alta variação das condições médias de temperatura e humidade durante o período de avaliação, sendo que há registros de temperaturas absolutas de 43 °C (dados não mostrados). É possível que isso tenha sido a causa do baixo número de lesões foliares, talvez afetando componentes posteriores aos apressórios na escala de patogênese, uma vez que o número de conídios diferenciados já era elevado às 12 hai, com variações às 18 e 24 hai para as cultivares BRS Pelota e IRGA 424, porém, estabelecendo um crescimento gradativo, indicando portanto, ser suficiente para a continuidade do processo de infecção.

As informações a cerca de *E. rostratum* na literatura são escassas, no entanto, para *B. oryzae* (fitopatogeno com similaridade a *E. rostratum*) variações no número de lesões em função das condições ambientais tem se mostrado presentes, como em trabalho realizado por Percich et al. (1997), avaliando a influência de fatores ambientais na densidade de lesões produzidas por *B. oryzae*. Esses autores observaram uma relação positiva entre o aumento da temperatura, até certo limite e período de molhamento com o aumento no número de lesões no tecido da folha bandeira. Castejón-Umñoz, (2008) demonstrou que variações em torno de 1 °C podem conduzir aumentos significativos na intensidade da brusone em plantios de arroz. A densidade de lesões e severidade sendo influenciadas pela temperatura e período de molhamento, também foram observados no patossistema *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishihara/*Helianthus annuus* L. com pontos ótimos de temperatura para maior expressão de lesões (LEITE; AMORIM, 2002).

O efeito dos fatores ambientais pode ter influenciado o grau de intensidade da necrose celular (Fig. 19), uma vez que, não houve o desenvolvimento dos sintomas ao longo do ciclo da cultura, como indicado pela presença do baixo

número de células no nível III. Este resultado pode ser a consequência da não formação de hifas infectivas secundárias, impedindo a colonização inter e intracelular das células epidérmicas o qual, proporcionaria um maior grau de escurecimento como ocorre nos patossistema *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque-*Paulinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke e *E. longirostratum*-*O.sativa* (BENTES; MATSUOKA, 2002; NG; KADIR; HAILMI, 2012).

As enzimas POX e PFO são chaves para a ocorrência de processos metabólicos como a oxidação de compostos fenólicos (REIMERS et al., 1992; CAMPOS et al., 2004), com funções importantes nos vegetais como as relacionadas com a proteção contra o ataque de fitopatógenos (MAZZAFERA; GONÇALVES; FERNANDES; 1998, SHAHBAZI et al., 2010). A POX é conhecida como um dos componentes de maior importância para a polimerização oxidativa, componente para a formação da lignina (STAFFORD, 1974). Neste estudo é possível associar a atividade dessa enzima com a formação dos derivados lignina-ácido tioglicólico (DLAT). Na cultivar Puitá INTA-CL inoculada, onde foi constatado aumento na sua atividade as 18 hai correspondendo com aumento na concentração desse composto no respectivo horário (Fig. 20B e Fig. 24B), indicando a participação dessa enzima na polimerização de DLAT e possível associação com o baixo número de células necróticas (NCN) (Fig.17), uma vez que DLAT atua na defesa contra fitopatógenos promovendo proteção mecânica fortalecendo a parede celular (PELTIER; HATFIELD; GRAU, 2009).

O aumento na atividade as 24 e 48 hai para a cultivar Puitá INTA-CL e às 48 hai para a cultivar BRS Pelota (Fig. 20A) não se refletiu no acúmulo de DLAT (Fig. 24A e 24B) talvez pelo processo incompleto da polimerização de fenóis. Na cultivar IRGA 424 não se notou aumentos na atividade da POX em relação ao inoculo, porém, é possível observar aumento na concentração de DLAT às 36 hai (Fig. 24B), esse fato chama a atenção para a possível atuação das demais enzimas oxidases como a lacase, que também pode atuar na oxidação dos fenóis possibilitando ações catalíticas e a polimerização dos diferentes grupos de molignóis (álcool cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil) em lignina que será ligada a parede celular e demais constituinte (WHETTEN et al., 1998; RAMOS et al., 2001, RANOCHA et al., 2002).

Aumentos na atividade enzimática da PFO, em relação às plantas inoculadas, foram observados nas cultivares BRS Pelota as 18 e 24 hai (Fig.

21A), Puitá INTA-CL 12, 24 e 36 hai (Fig. 21B) e IRGA 424 às 36 hai (Fig. 21C), é possível que essa enzima também esteja relacionada com a intensidade de escurecimento celular, uma vez que foram observados aumentos na atividade enzimática correspondendo com diferentes níveis de escurecimento celular para todas as cultivares (Fig. 17A-C). A PFO é conhecida por está associada com a oxidação de compostos fenólicos possibilitando a formação de compostos mais tóxicos aos patógenos como o ácido clorogênico (NAGADZE et al., 2012). Não houve uma relação entre os aumentos relacionados à PFO e o acúmulo de CFST para as 3 cultivares. Esse fato chama a atenção para o não acúmulo de CFST em relação ao inóculo e possível direcionamento dos precursores presentes na rota dos fenilpropanoides, seguindo para formação da lignina.

Os aumentos nas concentrações da enzima CAT, em relação ao inóculo as 36 e 48 hai na cultivar BRS Pelota, 48 hai na cultivar Puitá INTA-CL e 36 hai na IRGA 424, refletem o envolvimento do sistema oxidativo na defesa das plantas contra *E.rostratum*, com possíveis acúmulos de espécies ativas de oxigênio (EAO's) nesses horários, uma vez que a atividade dessa enzima está relacionada com a detoxificação celular inativando o H_2O_2 , quando acumulado em altas concentrações na célula, sendo de composto em H_2O e O_2 (IGAMBERDIEV; LEA, 2002).

Nesse experimento foram constatados diferenças significativas em relação às plantas não inoculadas, para as variáveis POX, PFO, CAT e DLAT em determinados horários, tais diferenças, podem está relacionadas, com o fato de que as condições de instalação do experimento não foram em ambiente totalmente controlado, a presença de fatores externos como lagartas (*Spodoptera frugiperda*) (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e percevejos (*Tibraca limbativentris* Stal) (Hemiptera: Pentatomidae) observados na cultura do arroz, podem ser os responsáveis, uma vez que as plantas ao entrarem em contato com herbívoros mobilizam esses sistemas defesa (MELLO; SILVA-FILHO, 2002, PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

4.5 Conclusões

E. rostratum promove necrose celular nas cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424;

No patossistema *E. rostratum*/*O. sativa* o período de incubação (PI), varia entre de 24 a 36 h dependente das condições ambientais;

As cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424 aumentam a atividade das enzimas Peroxidase (POX), Polifenoloxidase (PFO), Catalase (CAT) e tendem a acumular lignina na defesa contra *E. rostratum*.

5 Conclusões finais

A espécie fúngica identificada em sementes de arroz no estado do Rio Grande do Sul trata-se de *Exserohilum rostratum*, causador de manchas em folhas e grãos;

As três cultivares em estudo (BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424), se mostraram susceptíveis a *E. rostratum*, nas condições em que foi realizado o experimento;

As plantas de arroz (cultivares BRS Pelota, Puitá INTA-CL e IRGA 424) ativam o sistema de defesa enzimático em resposta ao ataque por *E. rostratum*.

6 Referências bibliográficas

- AGRIOS, GEORGE. N. Plant Pathology. 5. ed. San Diego: California: Elsevier Academic Press, 2005. 948 p.
- AHMADPOUR, A.; KARAMI, S.; HEIDARIAN, Z.; JAVAN-NIKKHAH, M. *Exserohilum rostratum* causing sugarcane leaf spot in Iran. **Plant Dis.**, v. 8, p, 97–99, 2013.
- ALCORN, J. L. The taxonomy of “*Helminthosporium*” species. **Annual Review Phytopathological**. v. 26, p. 37-56, 1988.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; ROSA, O. P. P.; ASSIS, T. F. *Sporothrix eucalypti*, Um novo patógeno do eucalipto no Brasil. **Fitopatol. bras.**, v. 26, n. 2, 2001.
- ALMEIDA, Á. M. R. PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; SARTORI, F.; COSTAMILAN, L. M. M.; TEIXEIRA, R. O.; LOPES, M. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 594-602, 2005.
- ALMEIDA, H. O. BARBOSA, M. O. MARQUES, A. E.; T. H. A. PEREIRA, MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G.; STOLF-MOREIRA, R.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; PEREIRA, P. R. G.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesq. agropec. bras.**, v.47, n. 2, p. 163-172, 2012.
- AMARAL, A. S.; SANTOS, E. C. Efeito da umidade e da temperatura do solo na emergência de plântulas de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 5, n. 1, p. 43-54, 1983.
- APPS. Padrões Fitossanitários nas Sementes – Proposta de Regulamentação (2004). Disponível em: <<http://www.apps.agr.br/informes/?INFOCOD=47>>. Acesso em 20/02/2015.
- ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CARVALHO, E. M.; CELANO, F. A. O. Relação entre níveis de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e o progresso da ramulose do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 147-151, 2006.
- ARAÚJO, A.V.; SALES, N. L. P.; FERREIRA, I. C. P. V.; BRANDÃO JUNIOR, D.; MARTINS, E. R. Germinação, vigor e sanidade de sementes de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) obtidas de frutos coletados no solo e na planta. **Rev. bras. plantas med.**, v. 11, n. 2, p.170-175, 2009.
- ARAÚJO, D. V.; ZAMBENEDETTI, G. B.; DALLACORT, R.; AZEVEDO, V. H.; MAINARDI, J. T. Progresso da ramulose em campo a partir de sementes de

algodoeiro inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 204-209, 2012.

ARAYA, C. M. Coevolución de Interacciones Hospedante – Patógeno en Frijol Común. **Fitopatol. bras.**, v. 28, n. 3, 2003.

ARTIGIANI FILHO, V. H.; BEDENDO, I.P. Patogenicidade de *Helminthosporium oryzae* a algumas espécies de gramíneas. **Sci. agric.** v. 52, n.1, p. 132-134, 1995.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.

BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, j.; BRESSIANI, J. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Brazil. **Plant disease**, v. 94, n. 9, p. 1170, 2010.

BARRIOS, L. M.; PÉREZ, I. O. Nuevos registros de hongos en semillas de *Oryza sativa* en Cuba. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, costa Rica, n. 75, p. 6 4-6 7, 2005.

BARBER, M. S.; RIDE, J. P. A. Quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. physiological and molecular. **Plant Pathology**, v. 32, n. 2, p. 185-197, 1988.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARNETT, V.; LEWIS, T. **Outliers in Statistical Data**, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1994.

BAYER, T.; LOECK, A. E.; GUERRERO, M. F. C.; ELIAS, M. C. Aplicação aérea de fungicidas com diferentes equipamentos e volumes sobre a produtividade, qualidade de grãos e controle de doenças em arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p.1377-1383, 2014.

BEDENDO, I. P.; PRABHU, A. S. Reação de algumas gramíneas a *Helminthosporium oryzae* agente causal da mancha-parda do arroz. **Summa Phytopatol.**, v. 7, p. 34-38, 1981.

BEDENDO, I. P.; PRABHU, A. S. Doenças do arroz. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. p. 79-80.

BENTES, J. L.S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* E *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 071-077, 2002.

BENTES, J. L. S.; COSTA NETO, P. Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. **ACTA AMAZÔNICA**, v. 41, n. 2, p. 251-256, 2011.

BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. *Cochliobolus* phylogenetics and origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde – 3 - phosphate dehydrogenase sequences. **Mycologia**, v. 91, n. 6, p. 964-977, 1999.

BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E. W. História da Fitopatologia. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 4. ed., v.1, cap.1, p. 3-17, 2011.

BORDIN, L. C.; CASA, R. T.; MARCUZZO, L. L.; SANGOI, L.; ZANCAN, R. L. Intensidade de doenças foliares, produtividade, massa de mil grãos e grãos manchados em resposta ao número de aplicações de fungicida no cultivar de arroz irrigado SCS 116 Satoru. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 4, p. 329-333, 2014.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

CAMPOS, Â. D. FERREIRA, A. G. HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; DA SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CASA, R.T., REIS, E.M., BLUM, M.M.C., BOGO, A., SCHEER, O. & ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 289-293, 2004.

CASA, R. T.; MOREIRA, E. N.; BOGO, A.; SANGOI, L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 353-357, 2007.

CARDONA, R.; GONZÁLEZ, M. S. Caracterización y patogenicidad de hongos del complejo *Heminthosporium* asociados al cultivo del arroz em Venezuela. **Bioagro**, v. 20, n. 2, p. 141-145, 2008.

CATÃO, H. C. R. M.; MAGALHÃES, H. M.; SALES, N. L. P.; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; ROCHA, F. S. Incidência e viabilidade de sementes crioulas de milho naturalmente infestadas com fungos em pré e pós-armazenamento. **Ciência Rural**, v. 43, n. 5, p. 764-770, 2013.

CASTEJÓN-MUÑOZ, M. The effect of temperature and relative humidity on the airborne concentration of *Pyricularia oryzae* spores and the development of rice blast in southern Spain. **J. Agric. Res.**, v. 6, n. 1, p. 61-69, 2008.

CELMER, A.; MADALOSSO, M. G.; DEBORTOLI, M. P.; NAVARINI, L.; BALARDIN, R. S. Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 42, n. 6, p. 901-904, 2007.

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 2, p. 764-775, 1955.

CIVIDANES, F. J.; YAMAMOTO, F. T. Pragas e inimigos naturais na soja e no milho cultivados em sistemas diversificados. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 683-687, 2002.

CONAB. Acompanhamento da safra Brasileira: grãos. **Observatório agrícola**, v. 1, n. 3, p. 1- 72, 2013.

CUNNINGHAM, J. L. A miracle mounting fluid for permanent whole mounts of microfungi. **Mycologia**, v. 64, p. 906-911, 1972.

CURVÊLO, C. R. S.; RODRIGUES, F. Á. L.; SILVA, C. K. J.; NASCIMENTO, T.; BERGER, P. G. Mecanismos bioquímicos da defesa do algodoeiro à mancha de ramulária mediados pelo silício. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 41-51, 2013.

DALLAGNOL, L. J.; RODRIGUES, F. A.; DA MATTA, F. M.; MIELLI, M. V. B.; PEREIRA, S. C. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. **Phytopathology**, v. 101, n. 1, p. 92-104, 2011.

DE ASCENSAO, A. R. D. C. F.; DUBERY, I. A. Panama Disease: Cell Wall Reinforcement in Banana Roots in Response to Elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race Four. **Phytopathology**, v. 90, p. 1173-1180, 2000.

DE MELO, C. L. P.; RAGAGNIN, V. A.; ARRUDA, K. M. A.; DE BARROS, E. G.; CARNEIRO, P. C. S.; DE PAULA JÚNIOR, T. J.; MOREIRA, M. A.; CARNEIRO, J. E. S. Caracterização fenotípica e molecular de genitores de feijão tipo carioca quanto à resistência a patógenos. **Pesq. agropec. bras.**, v. 43, n. 4, p. 495-504, 2008.

DOYLE, J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, n. 12, p. 13-18, 1990.

DUDIENAS, C.; FANTIN, G. M.; DUARTE, A. P.; TICELLI, M.; BÁRBARO, I. M.; FREITAS, R. S.; LEÃO, P. C. L.; CAZENTINI FILJO, G.; BOLONHEZI, D.; PÂNTANO, A. P. Severidade de ferrugem polissora em cultivares de milho e seu efeito na produtividade. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.1, p.16-23, 2013.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **All about rice**. Genova: FAO, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice>> Acesso em 15/07/2011.

FAO. PRODUÇÃO MUNDIAL DE CEREAIS DEVE ATINGIR ALTA HISTÓRICA EM 2013. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/pmcdaah2013.asp>>. Acesso em: 26/02/2015.

FARIAS, C. R. J.; AFONSO, A. P. S.; PIEROBOM, C. R.; DEL PONTE, E. M. Regional survey and identification of *Bipolaris* spp. associated with rice seeds in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 3, p. 369-372, 2011.

FERREIRA, J. B.; DE ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciênc. agrotec.**, v. 33, n.1, p. 24-30, 2009.

FOYER, C. F.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. **New Phytologist**, v. 146, n. 3, p. 359–388, 2000.

FRAZZON, A.P. G.; MATSUMURA, A.T.S.; VAN DER SAND, S.T. Morphological characterization and genetic analysis of *Dreschslera teres* isolates. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, n. 2, p. 235 -241, 2002.

FUNCK, G.R.D. KEMPF, D. Doenças do Arroz Irrigado no Rio Grande do Sul. **Boletim Técnico**, nº 5. Cachoeirinha/RS: IRGA. 2008. pág. 7-33.

GALLI, J. A.; PANIZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Sobrevivência de patógenos associados a sementes de soja armazenadas durante seis meses. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 205-213, 2007.

GARRETT, K. A.; NITA, M.; WOLF, E. D. D.; GOMEZ, L.; SPARKS, A. H. Plant pathogens as indicators of climate change. In: LETCHER, T. (Ed.). Climate change: observed impacts on planet Earth. Amsterdam: Elsevier, 2009. cap. 25, p. 425-437.

GHINI, R.; HAMADA, E.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; GONÇALVES, R. R. V. Incubation period of *Hemileia vastatrix* in coffee plants in Brazil simulated under climate change. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.2, p.85-93, 2011.

GLASS, N.L., JACOBSEN, D.; SHIU, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics** . v. 34, p.165-186. 2000.

GODOY, C. V.; FLAUSINO, A. M.; SANTOS, L. C. M.; DEL PONTE, E. M. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de

aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, 2009.

GOMES, M. R. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 69-72, 1678-457, 2001.

GOMES, R. T.; KITAJIMA, E. W.; TANAKA, F. A. O.; MARQUES, J. P. R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomia de lesões foliares causadas pelo vírus da mancha clorótica do clerodendrum, transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* em diferentes espécies. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 4, p. 291-297, 2010.

GOPALAKRISHNAN, C.; KAMALAKANNAN, A.; VALLUVAPARIDASAN, V. Survey of Seed-Borne Fungi Associated with Rice Seeds in Tamil Nadu, India. **Libyan Agric. Res. Cen. J. Intl.**, v. 1, n. 5: 307-309, 2010.

GUERRA, A. M. N. D. M.; RODRIGUES, F. Á.; BERGER, P. G.; BARROS, A. F.; DA SILVA, Y. C. R.; LIMA, T. C. Aspectos bioquímicos da resistência do algodoeiro à ramulose potencializada pelo silício. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 3, p. 292-303, 2013.

GUO, Z.; OU, W.; LU, S.; ZHONG, Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 11-12, p. 828-836, 2006.

HADASA, R.; KRITZMANB, G.; GEFENA, T.; MANULISB S. Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* contaminating pepper seeds. **Plant Pathology**, v. 50, p. 117-123, 2001.

HAILMI, M. S.; KADIR, J.; JURAIMI A, S.; NORHAYATI M, Z.; Plant-Pathogen Interaction between *Exserohilum monoceras* with *Oryza sativa* and *Echinochloa crus-galli*. **J. Agrobiotech**, v. 2, p. 73-82, 2011.

HAMADA, E.; GHINI, R.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; GONÇALVES. R. R. V. Incubation period of *Hemileia vastatrix* in coffee plants in Brazil simulated under climate change. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 2, p. 85-93, 2011.

IRRI. Standard evaluation system for rice. 4^a ed. Manila, the Philippines. International rice research institutes, 1996.

ITAKO, A. T.; JÚNIOR, J. B. T.; DA SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **IDESIA**, v. 30, n. 2, 2012.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, v. 60, p. 651-674, 2002.

JAISWAL, S.K.; SWETA, L.C.; PRASAD, S.; SHARMA, S.; KUMAR, S.; PRASAD, R.; PANDLEY, S. P.; CHAND, A.K.; JOSHI, A.K. Identification of molecular marker and aggressiveness for different groups of *B. sorokiniana* isolates causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Current Microbiol**, v. 55, p. 135-141, 2007.

JERBA, V. F.; RODELLA, R. A.; FURTADO, E. L. Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 40, p. 217-223, 2005.

KALISCHUK, M. L.; AL-MUGHRABI, K. I.; PETERS, R. D.; HOWARD, R. J.; PLATT, H. W.; KAWCHUK, L. M. Genetic composition of *Phytophthora infestans* in Canada reveals migration and increased diversity. **Plant Dis.**, v. 96, p. 1729-1735, 2012.

KIM, K.-H.; YOON, J.-B.; PARK, H.-G.; PARK, E. W.; AND KIM, Y. H. Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. **Phytopathology**, v. 94, p. 1295-1304, 2005.

KUMAR, M.; SHUKLA, P.K. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single stranded conformational polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. **J. Clinical Microbiol**, n. 43, v. 2, p. 662-668, 2005.

LAW, R.D.; CRAFTS-BRANDNER, S. J. High temperature stress increases the expression of wheat leaf ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase activase protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 386, n. 2, p. 261-267, 2001.

LAZAROTO, A.; DOS SANTOS, V.; KONFLANZ, A.; MALAGI, G.; CAMOCHENA, R. C. Escala diagramática para avaliação de severidade da helmintosporiose comum em milho. **Ciência rural**, v. 42, n.12, p. 2131-2137, 2012.

LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIM, L. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo da mancha de alternaria em girassol. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 193-200, 2002.

LEONARD, K. J.; SUGGS, E. G. *Setosphaeria prolata*, the ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. **Mycologia**, n. 66, p. 281-97, 1974.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados às sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 229-263, 1994.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Preparações e observações morfológicas de espécimes fúngicas. In: MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Métodos em fitopatologia. Viçosa, ed. UFV, 2007. cap. 9, p. 425-437.

MALAVOLTA, V. M. A; PARISI, J. J. D.; TAKADA, H. M.; PARISI, M. C. M. **Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz**

sobre aspectos fisiológicos, transmissão do patógeno às plântulas e produção. 2006. Artigo em Hypertexto Disponível em:

<http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/bipolaris/Index.htm>. Acesso em: 15/2/2015.

MALAVOLTA, V. M. A.; SOLIGO, E. A.; DIAS, D. D.; AZZINI, L. E.; BASTOS, C. R. Incidência de fungos e quantificação de danos em sementes de genótipos de arroz. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 280-286, 2007.

MAPA (Ministério da agricultura pecuária e abastecimento). Saiba mais. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz/saiba-mais>>. Acesso em: 26/02/2015.

MARSHALL, D.; WORK, T. T.; CAVEY, J. F. Invasion pathways of Karnal bunt of wheat into the United States. **Plant Dis.**, v. 87, p. 999-1003, 2003.

MAY-DE MIO, L. L.; MOREIRA, L. M.; MONTEIRO, L. B.; JUSTINIANO JUNIOR, P. R. Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Trop. plant pathol.**, v. 33, n. 3, p. 227-234, 2008.

MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, E.; FERNANDES, J. A. R. Fenóis, peroxidase e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incógnita*. **Bragantia**, Campinas, v. 48, n. 2, p. 131-142, 1998.

MCDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, St. Paul, v. 26, p. 195-218, 1923.

MEGETO, G. A. S.; OLIVEIRA, S. M.; DEL PONTE, E. M.; MEIRA, C. A. A. árvore de decisão para classificação de ocorrências de ferrugem asiática em lavouras comerciais com base em variáveis meteorológicas. **Eng. Agríc.**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 590-599, 2014.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 14, n. 2, p. 71-81, 2002.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C.G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Ciênc. agrotec.**, v. 34, n. 1, p.132-139, 2010.

MENESES, P. R.; FARIAS, C. R. J.; CANIELA, A. R. A.; SCHWANCK, A. A. DEIBLER, A. N.; FUNCK, G. D.; DEL PONTE, E. M. Regional and varietal

differences in prevalence and incidence levels of *Bipolaris* species in Brazilian rice seedlots. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 349-356, 2014.

MICHEREFFI, A. J.; NORONHA, M. A.; ROCHA JR, O. M.; SILVA, J. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Variabilidade de Isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p, 656-663, 2003.

MIO, L. L. M.; MOREIR, L. M.; MONTEIRO, L. B.; JUSTINIANO JÚNIOR, P. R. Infecção de *Monilinia fruticola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 227-234, 2008.

MOREJON, K. R.; MORAES, M. H. D.; BACH, E. E. Identification of *Bipolaris bicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p, 247-250, 2006.

MORKUNAS. I.; BEDNARSKI, W.; KOZŁOWSKA, M. Response of embryo axes of germinating seeds of yellow lupine to *Fusarium oxysporum*. **Plant Physiol Biochem.**, v. 42, n. 6, p. 493-9, 2004.

MÜLLER, M.V.G.; GERMANI, J.C.; VAN DER SAND, S.T. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. **Genet. Mol. Res.**, v. 4, p. 642-652, 2005.

MUSSURY, R. M.; BETONI, R.; SILVA, M. A.; SCALON, S. P. Q. Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 18-25, 2012.

NASCIMENTO, E.J.M.; VAN DER SAND, S.T. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana*. **World J. Microbiol. Biot.**, v. 24, p. 647-652, 2008.

NASCIMENTO, E. J. M.; VAN DER SAND, S. T. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. **World J. Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 647-652, 2008.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Efeito do inóculo, período de molhamento foliar e do estágio fenológico do feijão-caupi no desenvolvimento da mela. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 104-109, 2011

NG, S. C.; KADIR, J.; HAILMI, M. S. Histological Study of the Interaction between *Exserohilum Longirostratum*, Barnyard Grass, and Rice var. MR219. **Pertanika J. Trop. Agric. Sci.**, v. 35, p. 57-70, 2012.

NGADZE, E.; ICISHAHAYO, D.; COUTINHO, T. A.; VAN DER WAALS, J. E. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonialyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. **Plant Dis.**, v. 96, p. 186-192, 2012.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, **Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 249–279, 1998.

OBLESSUC, P. R.; BORGES, A.; CHOWDHURY, B.; CALDAS, D. G. G.; MUI TSAI, S.; CAMARGO, L. E. A.; MELOTTO, M. Dissecting Phaseolus vulgaris Innate Immune System against *Colletotrichum lindemuthianum* Infection. **PLOS ONE**, v. 7, 2012.

OLIVEIRA, A. M.; PRESTE, A.; MATSUMURA, A. T.; SAND, S. V. D. T.; MATTOS, G. S. Study of intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* by random polymorphic DNA. **Genet. Mol. Res.**, v. 1, n. 4, p. 350-358, 2002.

PARLEVLIET, J. E. Components of resistance that reduce of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 17, p. 203-222, 1979.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed). **Manual de fitopatologia**: Princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011, p. 523-633.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PERCICH, J. A.; NYVALL, R. F.; MALVICK, D. K.; KOHLS, C. L. Interaction of Temperature and Moisture on Infection of Wild Rice by *Bipolaris oryzae* in the Growth Chamber. **Plant Disease**, october, 1997.

PERES, A.P.; SILVA – MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. da. Variabilidade morfo cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência Agrotécnica**, v. 27, n. 5, p.1054-1062, 2003.

PELTIER, A. J., HATFIELD, R. D., GRAU, C. R. Soybean stem lignin concentration relates to resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Dis.**, v. 93, p.149- 154. 2009.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; MARTINS, C. B. C.; PELLEGRINO, A. C.; ZARBIN, P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Quim. Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

POLTRONIERI, L. S.; VERZIGNASSI, J. R.; BENCHIMOL, R. L.; FREIRE, F. C. O. Primeiro registro de *Exserohilum rostratum* (anamorfo de *Setosphaeria rostrata*) causando manchas foliares em açaizeiro no Brasil. **Summa Phytopathol.**, v. 34, n. 2, p. 195, 2008.

RAMOS, R. L. B.; TOVAR, F. J.; JUNQUEIRA, R. M.; LINO, F. B.; SACHETTO-MARTINS, G. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes

involved in lignin biosynthesis pathways. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 235-241, 2001.

RANOCHA, P.; CHABANES, M.; CHAMAYOU, S.; JAUNEAU, A.; BOUDET, A. M.; GOFFNER, D. Laccase Down-Regulation Causes Alterations in Phenolic Metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p. 145-155, 2002.

REIMERS, P. J.; GUO, A.; LEACH, J. E. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). **Plant Physiology**, v. 99, p. 1044-1050, 1992.

REIS, A.; SATELIS, J. F.; PEREIRA, R. S.; NASCIMENTO, W. M. Associação de *Alternaria dauci* e *A. alternata* com sementes de coentro e eficiência do tratamento químico. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 107-111, 2006.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2011.

REY, M. S.; LIMA, N. B.; DOS SANTOS, J.; PIEROBON, C. R. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*phaseolus vulgaris*). **Arq. Inst. Biol.**, v. 76, n. 3, p. 465-470, 2009.

RODRIGUES, F. A.; JURICK II, W. M.; DATNOFF, L. E.; JONES, J. B.; ROLLINS, J. A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, n. 4, p. 144-159, 2005.

ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; FURTADO, E. L. Efeito da temperatura sobre a infecção de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p. 240-243, 2010.

ROUSSEEUW, P. J.; LEROY, A. M. **Robust Regression and Outlier Detection**, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1987.

SANTOS, A. M. P.; MATSUMURA, A. T. S.; VAN DER SAND, S. T. Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici repentis* as detected by random amplified polymorphic DNA analysis. **Genet. Mol. Biol.**, p. 243-250, 2002.

SÁNCHEZ, G. R.; MERCADO, E. C.; PEÑA, E. B.; DE LA CRUZ, H. R.; PINEDA, E. G. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. **Biológicas**, v. 12, p. 90-95, 2013.

SANTOS, G. R.; CHAGAS, J.F.R.; TAVARES, A. T.; NETO, M. D. C.; SARMENTO, R. A.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; DO NASCIMENTO, I. R. Danos causados por doenças fúngicas no arroz cultivado em várzeas no Sul do Estado do Tocantins. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p. 869-875, 2011.

SAS Institute. **SAS system for Windows, version 9.1**. Cary: SAS Institute, 2002.

SHAHBAZI, H.; AMINIAN, H.; SAHEBANI, N.; HALTERMAN, D. A. Biochemical Evaluation of Resistance Responses of Potato to Different Isolates of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v. 100, p. 454-459, 2010.

SIVANESAN, A. **Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs**. CAB-International Mycological Institute. Mycological Papers, n.158, 1987, 261p.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e species reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2007.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações da pesquisa para o Sul do Brasil**. Santa Maria: Sosbai, 2012.

STAFFORD, H. A. The metabolism of aromatic compounds. **ANN. REV. PLANT PHYSIOL.**, v. 25, p. 459-86, 1974.

STEINMETZ, S., BRAGA, H. J. Zoneamento de arroz irrigado por épocas de semeadura nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 9, n. 3, p. 429-438, 2001.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v.161, n. 3, p. 613–619, 2001.

SUTTON, J. C.; SOPHER, C. R.; OWEN-INDO, T. N.; WEIZHONG, L.; GRODZINSKI, B.; HALL, J. C.; BENCHIMOL, R. L. Etiology and epidemiology of Pythium root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa phytopathol.** v. 32, n. 4, p. 307-321, 2006.

TEPLIZKY, M. D. F.; SCHUCH, L. O. B.; AMARAL, A. S. HENNING, F. A. Época e horário de aplicação de fungicida sobre a qualidade de sementes de arroz. **Rev. bras. Sementes**, v. 33, n. 1, p. 95-103, 2011.

VALIM-LABRES, M.E.; PRESTES, A.M.; SAND, S.T.V.D.; MATSUMURA, A.T.S. Variação no aspecto cultural, morfologia e virulência em isolados de *Bipolaris sorokiniana* de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 483-487, 1997.

VIÉGAS, J. **Variabilidade da morfologia, crescimento e fertilidade de isolados brasileiros de *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechsl. Ex Dastur**. 1989. 220p. Tese (Dotourado) – Universidade Estadual de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba.

ZHONG, S.; STEFFENSON, B.J. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. **Genet. Resistance**, v. 91, p. 5, p. 469-476, 2001.

ZIESLIN, N.; BENZAKEN, R. PEROXIDASE-ACTIVITY AND PRESENCE OF PHENOLIC SUBSTANCES IN PEDUNCLES OF ROSE FLOWERS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 333-339, 1993.

WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; DE RESENDE, M. A.; VALÉRIO, H. M.; CALIGIORNE, R. B.; PAIVA, E. genetic variation among pathogens causing "helminthosporium" diseases of rice, maize and wheat. **Fitopatologia Brasileira**, n. 27, p. 639-643, 2002.

WHETTEN, R. W.; MACKAY, J. J.; SEDEROFF, R. R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 49, p. 585-609, 1998.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: GELFAND MAIDH; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.), **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

VITA

Fábio Júnior é filho de Josebias Moreno e Analice Araújo, nasceu em 30 de Dezembro de 1984, no município de Cacimba de Dentro, Paraíba. No ano de 2006, ingressou no curso de agronomia pela Universidade Federal da Paraíba, no campus II na cidade de Areia-PB, onde recebeu o título de Engenheiro agrônomo em 2012. Em 2013 iniciou o curso de pós-graduação em fitossanidade a nível de mestrado, na faculdade de agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, em Pelotas-RS.