

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade**



**Tese**

Etiologia da mancha ocular na cultura do arroz causada por *Bipolaris gigantea* e alterações metabólicas desencadeadas nas plantas

**Priscila Rossatto Meneses**

Pelotas, 2017

**PRISCILA ROSSATTO MENESES**

Etiologia da mancha ocular na cultura do arroz causada por *Bipolaris gigantea* e alterações metabólicas desencadeadas nas plantas

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

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias

Coorientador: Prof. Dr. Leandro José Dallagnol

Coorientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Danielle Ribeiro de Barros

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M111e Meneses, Priscila Rossatto

Etiologia da mancha ocular na cultura do arroz causada por *Bipolaris gigantea* e alterações metabólicas desencadeadas nas plantas / Priscila Rossatto Meneses; Cândida Renata Jacobsen de Farias, orientadora; Leandro José Dallagnol, Danielle Ribeiro de Barros, coorientadores.

— Pelotas, 2017.

88 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Atividade bioquímica. 2. *Drechslera gigantea*. 3. Mancha ocular. 4. *Oryza sativa*. 5. Taxonomia. I. Farias, Cândida Renata Jacobsen de, orient. II. Dallagnol, Leandro José, coorient. III. Barros, Danielle Ribeiro de, coorient. IV. Título.

CDD : 633.18

**Banca examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cândida R. Jacobsen de Farias (Orientadora)  
(Departamento de Fitossanidade, FAEM-UFPel)

---

Dr. Cley Donizeti Martins Nunes  
(Embrapa Clima Temperado)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Ribeiro de Barros  
(Departamento de Fitossanidade, FAEM-UFPel)

---

Dr. Eduardo Guatimosim  
(Departamento de Fitossanidade, FURG)

---

Prof. Dr. Sidnei Deuner  
(Departamento de Botânica/Fisiologia Vegetal, UFPel)

*Aos meus pais*  
*Verani Rossatto; Domingos Sávio R. Meneses e Jose Pedro C. Morales*

*À minha avó*  
*Maria Salla Rossatto (in memoriam)*

*Aos meus irmãos (ãs) e sobrinhos (ãs)*

***Dedico e Ofereço***

*Primeiramente agradeço a Deus por ter me privilegiado com a vida e por estar ao meu lado em todos os momentos me pegando no colo e dando forças para seguir em frente*

*À Dr<sup>a</sup>. Cândida R. Jacobsen de Farias, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo apoio, pela confiança depositada durante toda pós-graduação e pela amizade. Por quem sempre guardarei carinho e respeito de uma eterna orientadora.*

*Aos meus coorientadores, Dr<sup>a</sup>. Danielle Ribeiro de Barros e Dr. Leandro José Dallagnol, pela orientação e por terem possibilitado parte da realização deste trabalho.*

*À Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, em especial, ao Programa de Pós Graduação em Fitossanidade (PPGFS), extensivo a todos os professores e funcionários.*

*Aos funcionários Serginho e Rosaria incansavelmente disponíveis, colaborando com os conhecimentos, bom funcionamento da estrutura e dos laboratórios, sempre de maneira gentil e prestativa.*

*Ao Dr. Eduardo Guatimosim que se disponibilizou em contribuir enormemente para a execução deste projeto.*

*Aos estudantes e futuros colegas Jessica U. Tavares, Alexandre M. Neumann, Guilherme Longaray e Ligiani Simões pela amizade, carinho e auxílio prestado.*

*Aos colegas e amigos Viviana Gaviria, Victoria Moreira, Keilor Dorneles, Caliandra Bernardi, Vanessa Gonçalves, Cristiano Bellé, Wellington Rodrigues, Renata Moccelin e Silvia Maich que foram literalmente “os anjos” que tornaram todos os momentos muito mais doces ao longo dessa jornada.*

*À todos os colegas do PPGFS, que dividiram comigo todos os momentos (difíceis, de descontração, de apuro) vivenciados ao longo do curso;*

*Á colega e grande amiga Elen Bonilha, por estar ao meu lado em todos os momentos possíveis da minha jornada na pós graduação e na minha vida, pelo auxílio, apoio, amor, carinho e companheirismo.*

*Ao meu amigo e namorado Elton Dalke, por estar sempre ao meu lado me motivando e em todos os momentos da minha vida, pela paciência, carinho, atenção e amor.*

*À minha amada família e amigos, meus maiores incentivadores, por todo suporte, amor e carinho.*

*E por fim, meu mais profundo e especial agradecimento à minha mãe, Verani Rossatto, meu maior exemplo de vida, de mulher, a pessoa que sempre esteve e está incondicionalmente ao meu lado.*

*A todos meu carinhoso, sincero e eterno, MUITO OBRIGADA!*

## Resumo

Meneses, Priscila Rossatto. **Etiologia da mancha ocular na cultura do arroz causada por *Bipolaris gigantea* e alterações metabólicas desencadeadas nas plantas.** 2017. 88f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

A Região Sul do Brasil apresenta-se em posição de destaque no cenário orizícola brasileiro, com grande potencial de crescimento. A ocorrência de doenças está entre os fatores que podem restringir a expressão do seu potencial produtivo, reduzindo a área fotossintética, acarretando perdas na produção de grãos e queda na produtividade. Manchas foliares, relacionadas à doença conhecida como mancha ocular, venham sendo observadas desde a safra 2006/07 no estado do Rio Grande do Sul (RS). O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar a etiologia do patógeno causador da doença, bem como, informações referentes aos testes de patogenicidade e avaliar os componentes de resistência, variáveis bioquímicas de mecanismos de defesa e respostas citológicas envolvidas no processo de infecção. Para isso o patógeno foi isolado de plantas sintomáticas e analisado quanto as suas estruturas reprodutivas e colônias, comparando-as com a literatura padrão. A extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento e análise de regiões conservadas do genoma, consistiram nas etapas para obter a descrição molecular do isolado. Componentes de resistência, atividade enzimática, peroxidação lipídica e quantificação de lesões foram analisados em diferentes períodos de inoculação e estádios fenológicos, para as cultivares BRS Querência e Puitá Inta CL. O presente estudo conclui, satisfatoriamente, que o agente causal da mancha ocular do arroz é o fungo *Bipolaris gigantea*. Ainda, independente do estágio, a cv BRS Querência mostrou maior suscetibilidade à doença, causando danos celulares, a nível de membrana, devido a ação desencadeada pelo fungo, através do acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Puitá Inta CL apresentou resposta de defesa através da ação de enzimas antioxidantes. Os resultados esclareceram a correta taxonomia do agente causal da mancha ocular da cultura do arroz e demonstraram as primeiras evidências das respostas de defesa de cultivares ao patógeno.

**Palavras-chave:** atividade bioquímica, *Drechslera gigantea*, mancha ocular, *Oryza sativa*, taxonomia.

## Abstract

Meneses, Priscila Rossatto. **Etiology of eyespot in the rice crop culture caused by *Bipolaris gigantea* and metabolic alterations unleashed on the plants.** 2017. 87f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

The lands in southern Brazil are in a highlighted position of the rice cropping area, with great potential to increase. The occurrence of diseases is among the factors that can restrict its potential, reducing the photosynthetic area, causing losses on the grains' production and reduction of yield. Foliar leaf spots related to the eyespot disease are being observed since 2006/07's rice harvest, in the state of Rio Grande do Sul (RS). The objective of the study is identify and characterize the etiology of the pathogen causing the disease, as well, acquire information regarding the pathogenicity tests and evaluate the resistance components, biochemical variables of defense mechanisms and cytological responses involved in the infection process. In order to accomplish that, the pathogen was isolated from symptomatic plants and its reproductive structures and its colonies were analyzed and compared to the literature. The DNA extraction, amplification by PCR and sequencing and analysis of genome consisted on the steps to obtain the molecular description of the isolate. Components of resistance, enzymatic activity, lipid peroxidation and lesion quantification were analyzed in different periods of inoculation and phenological stages, for cultivars BRS Querência and Puitá Inta CL. The present study concludes that the agent which is causing the eyespot on rice is the *Bipolaris gigantea* fungus. Moreover, independently of stage the cv BRS Querência showed major susceptibility to the disease, causing cellular damages at membrane level, due to the action triggered by the fungus, through the accumulation of reactive oxygen species. Puitá Inta CL showed defense response by action of antioxidant enzymes. The results showed the correct taxonomy of the causal agent of zonate eyespot on rice crop culture and demonstrate the first evidence of defense responses of cultivars pathogen.

**Keyword:** activity biochemical, *Drechslera gigantea*, *Oryza sativa*, taxonomy, zonate eyespot.



## Lista de Tabelas

### Artigo 1

- Tabela 1 - Lista de pares de primers, utilizados para amplificação das regiões genômicas estudadas, suas respectivas sequências, tamanho de fragmento esperado e referências bibliográficas. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....37
- Tabela 2 - Condições de amplificação para regiões analisadas. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....38
- Tabela 3 - Descrição das espécies utilizada neste estudo, conforme isolado e referência. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....39

### Artigo 2

- Tabela 1 - Taxa de expansão de lesão ( $r$ ), comprimento final de lesão (CFL), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e severidade final (SF) de plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Puitá Inta CL quando inoculadas com *Bipolaris gigantea*. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....75
- Tabela 2 - Número final de lesão (NFL) de plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Puitá Inta CL nos estádios de floração e grão leitoso quando inoculadas com *Bipolaris gigantea*. UFPel, Pelotas, RS, 2017. ....76
- Tabela 3 – Análise da variância na comparação da atividade da enzima superóxido dismutases (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e concentração de aldeído malônico (MDA) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRs Querência e Puitá Inta CL nos estádios fenológicos de floração (R4) e grão leitoso (R6) inoculadas ou não com *Bipolaris gigantea* nos diferentes tempos após a inoculação. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....77
- Figura 4 - P-valores do teste t da atividade da enzima superóxido dismutases (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e concentração de aldeído malônico (MDA) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência (Q) e Puitá

Inta CL (P) nos estádios fenológicos de floração (R4) e grão leitoso (R6) inoculadas (I) ou não inoculadas (NI) com *Bipolaris gigantea*, nos diferentes horários após inoculação. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....78

## Lista de Figuras

### Artigo 1

Figura 1 – Sintomas de mancha ocular em lavoura de arroz na cultivar BRS Querência, ocasionados por *Bipolaris gigantea*. Capão do Leão, RS, safra 2013-14. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....42

Figura 2 – Inferência filogenética bayesiana, das regiões ITS, GPDH e tef1 concatenadas, pelo modelo de substituição de bases GTR+I+G e HKY+I e probabilidades a posteriori (pp) determinadas por MCMC. *Curvularia lunata* (CBS 730.96) foi aplicada como outgroup. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....43

Figura 3 – Sintomas de mancha ocular em folhas de arroz. a) Pequenos pontos de coloração marrom com halo amarelado, em destaque. b) Lesões ovais em forma de olho, cor marrom claro com halo clorótico, centro acinzentado e margens irregulares marrom avermelho. Capão do Leão, RS, safra 2013-14. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....44

Figura 4 - Características morfológicas da fase assexuada de *Bipolaris gigantea*. a) Conidióforo solitário; b) Conídio; c) Detalhe da cicatriz conidial; d) Tubo germinativo terminais; e) Tubo germinativo intercalares. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....45

Figura 5 – Características das culturas de *Bipolaris gigantea*. a) Meio Agar-Água. b) Meio BDA. c) Meio V8. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....46

### Artigo 2

Figura 1 - Fluxograma da metodologia utilizada nos experimentos. PI: período de incubação, ERI: eficiência relativa de infecção, r: taxa de expansão de lesão, CFL: comprimento final de lesão, NFL: número final de lesão, AACPD: área abaixo da curva do progresso da doença, SF: severidade final, SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, APX: ascorbato peroxidase, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, MDA: aldeído malônico. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....79

Figura 2 - Atividade da enzima superóxido dismutases (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e concentração de aldeído malônico (MDA) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Puitá Inta CL nos estádios fenológicos de floração (R4) e grão leitoso (R6) a qual foram ou não inoculadas com *Bipolaris gigantea*. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....80

Figura 3 - Número de células epidérmicas afetadas nos sítios de infecção de *Bipolaris gigantea* em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Puitá Inta CL no estágio de floração (cor clara) e grão leitoso (cor escura). UFPel, Pelotas, RS, 2017.....81

Figura 4 - Grau de escurecimento das células epidérmicas nos sítios de infecção de *Bipolaris gigantea* em folhas de arroz das cultivares BRS Querência e Puitá Inta CL nos estádios de floração e grão leitoso. UFPel, Pelotas, RS, 2017.....82

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>7</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>9</b>
<b>Sumário</b> .....	<b>11</b>
<b>Introdução geral</b> .....	<b>13</b>
<b>Artigo 1</b> .....	<b>20</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>21</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>22</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>MATÉRIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>Coleta e isolamento</b> .....	<b>24</b>
<b>Características morfológicas</b> .....	<b>25</b>
<b>Descrição de culturas</b> .....	<b>25</b>
<b>Extração de DNA, amplificação e sequenciamento</b> .....	<b>26</b>
<b>Análise filogenética</b> .....	<b>27</b>
<b>Testes de patogenicidade</b> .....	<b>28</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>Análise filogenética</b> .....	<b>29</b>
<b>Taxonomia</b> .....	<b>29</b>
<b>Testes de patogenicidade</b> .....	<b>31</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>
<b>Artigo 2</b> .....	<b>47</b>

<b>RESUMO</b> .....	<b>48</b>
<b>ABSTRAT</b> .....	<b>49</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
<b>Delineamento experimental</b> .....	<b>53</b>
<b>Experimento 1: Análise bioquímica e componentes de resistência</b> .....	<b>53</b>
<b>Experimento 2: Análise citológica</b> .....	<b>53</b>
<b>Material vegetal e cultivo</b> .....	<b>54</b>
<b>Inoculação de plantas de arroz</b> .....	<b>54</b>
<b>Avaliação dos componentes de resistência à doença</b> .....	<b>55</b>
<b>Determinação de atividade enzimática e concentração de aldeído malônico (MDA)</b> .....	<b>56</b>
<b>Quantificação das células epidérmicas afetadas pelo patógeno</b> .....	<b>58</b>
<b>Análises dos dados</b> .....	<b>60</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
<b>Efeito da mancha ocular na ativação de enzimas</b> .....	<b>61</b>
<b>Efeito do patógeno <i>B. gigantea</i> no número de células epidérmicas afetadas</b> .....	<b>62</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>Conclusões</b> .....	<b>83</b>
<b>Referências</b> .....	<b>84</b>

## **Introdução geral**

O arroz (*Oryza sativa* L.) planta da classe monocotiledônea é um dos cereais mais importantes para a alimentação humana, ficando atrás apenas da cultura do trigo. Possui participação importante na alimentação dos brasileiros, no qual consomem cerca de 25 quilogramas de arroz por ano (CONAB, 2017). Sua produção atinge cerca de 759 milhões de toneladas em área cultivada de 164 milhões de hectares. A China é o maior produtor (208 milhões de toneladas), seguida pela Índia (165 milhões de toneladas) e Indonésia (74 milhões de toneladas) (FAOSTAT, 2017).

O Brasil está em nono lugar na produção mundial de arroz, sendo o maior produtor da América Latina, com mais de 12 milhões de toneladas em uma área de 2 milhões de hectares, ocupando o terceiro lugar em área cultivada entre as culturas anuais (CONAB, 2017). A maior produção entre as regiões do país está na região Sul, responsável por 81,6% da produção, o que significam 9,7 milhões de toneladas, em área superior a 1 milhão de hectares, com produtividade de 7,7 ton/ha. O Rio Grande do Sul (RS) está em primeiro lugar entre os estados com 71,1% da produção nacional, o que representa 8,5 milhões de toneladas, em 1.100,7 mil hectares, alcançando uma produtividade de 7,7 ton/ha, seguido do estado de Santa Catarina (SC) com 1 milhão de toneladas e Paraná (PR) com 160 mil toneladas (CONAB, 2017).

Desta forma, a região Sul apresenta-se em posição de destaque no cenário orizícola brasileiro, com grande potencial de expressão do seu potencial produtivo. Entretanto, ainda há diversos fatores limitantes a expressão do seu potencial produtivo, principalmente em função das condições fitossanitárias, devido à presença de fitopatógenos (SOSBAI, 2016).

As doenças como brusone (*Pyricularia oryzae*), mancha parda (*Bipolaris oryzae*), mancha estreita (*Passalora jansseana*), escaldadura (*Microdochium albescens*), queima das bainhas (*Rhizoctonia oryzae*) e o complexo de fungos manchadores de grãos (*Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Phoma sorghina* e *Trichoconiella padwickii*) são limitantes para a cultura, reduzindo a área fotossintética, acarretando danos na produção de grãos e consequentes quedas na produção (EMBRAPA, 2005; SOSBAI, 2016).

Outras doenças tem despertado a atenção dos pesquisadores do Rio Grande do Sul. Lesões semelhantes à mancha parda, porém com o centro mais claro, foram observadas durante a safra 2006/07, nas cultivares BRS Querência e BRS Atalanta no município do Capão do Leão/RS, sendo o agente etiológico identificado, em um primeiro momento, através de características morfológicas, com *Drechslera* sp., atribuindo a doença à mancha ocular (NUNES, 2008). Posteriormente, safra 2007/08, a doença manifestou-se novamente na mesma região, na Depressão Central do RS no Estado do Mato Grosso, principalmente na cultivar BRS Querência, em estádios de final de ciclo (NUNES, 2008).

Na safra agrícola de 2014, em comunicado técnico, Gulart et al. (2015) reportaram a doença em plantações comerciais de arroz na região central e fronteira do Rio Grande do Sul, observando sintomas na fase de plântula e de perfilhamento. A doença foi identificada como mancha zonada, e o agente etiológico adotado, baseado apenas em características morfológicas, como *Drechslera gigantea*.

Este fato chama atenção para uma nova doença na cultura do arroz causada por um fungo dentro do complexo *Helminthosporium*, no qual pode se tornar um problema potencial aos orizicultores devido à suscetibilidade das cultivares citadas serem utilizadas comercialmente no RS e no melhoramento genético de novas cultivares.

*Drechslera gigantea* foi identificado pela primeira vez em 1909, como *Helminthosporium giganteum* em grama bermuda (*Cynodon dactylon* L.), através do resultado de um levantamento de doenças de 293 plantas silvestres em San Antônio Texas, EUA (HEALD; WOLF, 1911). Posteriormente, relatou-se *Agropyron repens* e *Eleusine* sp. como hospedeiros alternativos e, mais tarde, descreveu a mancha zonada em diferentes plantas distribuídas nos sul dos Estados Unidos



(DRECHSLER, 1928; DRECHSLER, 1929).

Meredith em 1963 observou o patógeno em plantações de banana, na Jamaica, porém a doença não causou danos econômicos. Sendo sua maior incidência nos locais com pastagens e plantas daninhas no interior ou perto da plantação. Ahn (1980) reportou sua ocorrência na cultura de arroz na cultivar CICA 7, no Panamá, CICA 6, na Colômbia, e Naylamp, no Perú, com sintomas nas folhas durante todo o ciclo da cultura. Foi relatado ainda, que lesões provenientes da inoculação artificial mostravam-se similares às causadas pela brusone.

Kardin e colaboradores (1982) identificaram a infecção em arroz selvagem (*Zizania aquática*), em Minnesota, EUA, destacando como hospedeiro alternativo, *Bromus inermis*, *Agropyron repens* e *Phalaris arundinacea*. Em 1987, *D. gigantea* foi relatada ocasionando sintomas no capim pé de galinha (*Eleusine indica*) no Brasil, sendo o primeiro relato do patógeno no país (MUCHOVEJ, 1987).

Zhang e Berbee (2001), por técnicas moleculares, demonstraram que um isolado proveniente do Japão, de *D. gigantea*, agrupava no clado de *Cochliobolus* (junto a outras espécies de *Bipolaris*).

Em 2003, o fungo foi constatado afetando cultivares de cevada no Uruguai (GAMBA; EKAUZ, 2003), e durante os anos de 2003 e 2004, em plantações de trigo, na Índia, provocando numerosas lesões circulares a ovais, de margens marrons e centro cinza, associadas aos sintomas típicos de *Bipolaris sorokiniana* (CHOWDHURY et al., 2005).

Recentemente, *D. gigantea* foi relatada causando mancha foliar em cevada nos Estados Unidos, país de origem da espécie tipo, e assim como o isolado japonês, este também agrupou dentro do clado de *Bipolaris* (ISAKEIT et al., 2017).

Espécies de *Drechslera* foram inicialmente descritas no gênero *Helminthosporium* Link (1809). As espécies graminícolas descritas em *Helminthosporium* foram determinadas como sendo diferentes, passando por vários refinamentos taxonômicos (GRAY, 1821; PERSON 1822; LINK, 1824; LUTTRELL, 1963; ELLIS, 1971). Diferentes morfologias dos conídios quanto à forma e tamanho, morfologia do hilo, origem dos tubos germinativos a partir das células polares ou outras células conidiais, localização e desenvolvimento dos septos conidiais e associação com a fase sexuada segregaram *Helminthosporium* em diversos outros gêneros como, por exemplo, *Bipolaris* e *Curvularia* (*Cochliobolus*), *Drechslera*

(*Pyrenophora*) e *Exserohilum* (*Setosphaeria*) (SIVANESAN 1987; ALCORN, 1988).

*Drechslera* (Pleosporaceae) apresenta conídios cilíndricos e retos, com capacidade de desenvolver tubo germinal a partir de qualquer célula conidial e hilo não protuberante, com uma leve cicatriz (SIVANESAN 1987; ALCORN 1988). *Bipolaris* apresenta conídios fusiformes ou curvos, no qual germinam por células polares com hilo levemente protuberante. Ambos os gêneros podem ser separados com base em seus teleomorfos; *Drechslera* é associada ao gênero *Pyrenophora*, enquanto *Bipolaris* associado ao gênero *Cochliobolus* (DRECHSLER, 1934, ALCORN, 1983).

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

Esta variabilidade pode ser explicada por uma série de fatores baseados, principalmente, no grande número de núcleos ocorrentes nas células tanto das hifas como nos conídios, o que propicia a heterocariose e principalmente a formação da fase sexual. Ainda a ocorrência de novos genótipos podem estar associada à mutações, heterocarios, dissociação de heterocarios, possibilidade de diplóides e haplóides recombinantes através do ciclo parassexual. (VIÉGAS, 1989; GLASS et al., 2000; MCDONALD; LINDE, 2002).

A alta variabilidade encontrada em fungos fitopatogênicos, em especial nas espécies dos gêneros *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum*, favorece a suplementação da resistência das plantas hospedeiras (NASCIMENTO; VAN DER SAND, 2008) e a ocorrência de diversidade das formas e tamanhos de conídios, os quais podem dificultar a real identificação do agente causal.

A identificação destes agentes etiológicos tem sido baseada na morfologia da fase anamórfica, no entanto, isto é pouco confiável devido a sua alta variabilidade. Um meio seguro de identificação seria a formação da fase sexual, no qual é realizada, em laboratório, a partir de pareamentos entre indivíduos da mesma espécie (VIÉGAS, 1989; FARIAS et al., 2011). Entretanto, à técnica, embora útil, é bastante laboriosa quando se trata principalmente de indivíduos heterotáticos sendo necessários numerosos pareamentos e tempo para formação das estruturas reprodutivas.

Desta forma, a identificação do agente etiológico de doenças baseada somente em características morfológicas e de crescimento, pode apresentar uma variabilidade durante as avaliações, acarretando em erros de classificação (LEE et al., 1993; MESQUITA et al., 1998).

Contudo, a partir do avanço científico, novas tecnologias baseadas em estudos moleculares, proporcionaram uma nova dimensão na área de fitopatologia, muito mais precisa na identificação de fungos novos. Técnicas moleculares de classificação e identificação contribuem de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos, bem como contribuem para uma melhor classificação de novas espécies. Além disso, a utilização de métodos moleculares, como o sequenciamento de genes conservados, para a identificação de microrganismos pode possibilitar o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiologia e genética de populações (AZEVEDO et al., 2006).

Técnicas moleculares como análise por Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (FRAZZON et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002; SANTOS et al., 2002; MULLER et al. 2005; JAISWAL et al., 2007), Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizando oligonucleotídeos sítio específicos (OLIVIER; LORIA, 1998), “Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP” (TSENG et al., 1992) e “Amplified Fragment Length Polymorphism- AFLP” (ZHONG; STEFFENSON, 2001; PERES et al., 2003) têm sido aplicadas para o estudo de sistemática de fungos.

Os métodos utilizados estão baseados na análise de sequências de DNA ribossomal (rDNA). Estas sequências contem regiões conservadas e variáveis permitindo a discriminação microbiana em diferentes níveis taxonômicos (BERBEE et al. 1999; KUMAR; SHUKLA, 2005; NASCIMENTO; VAN DER SAND, 2008). A análise das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e sequencias variáveis do DNA ribossomal 18S, contribuem para caracterizar os isolados e estudo da variabilidade inter e intraespecífica de patógeno (WHITE et al., 1990)

Além da correta identificação do agente causal da doença cabe-se ressaltar que a cultura do arroz no RS sofre modificações no zoneamento agroclimático. 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. Estas mudanças poderão fazer com que ocorra a adaptação de patógenos com potenciais danos econômicos a cultura (STEINMETZ; BRAGA, 2001).

A ação dos patógenos sobre plantas ocasionam reações deletérias ao seu desenvolvimento, como a diminuição da fotossíntese e ao conseqüente crescimento, associadas com a alteração do metabolismo do carbono e nitrogênio (LAW; CRAFTS-BRANDNER, 2001), e produção de espécies reativas de oxigênio - ROS (GUO et al., 2006), tais como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio singleto e radicais hidroxila. Estas moléculas tóxicas são formadas durante funções metabólicas normais nos peroxissomos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, citosol ou induzidas por estímulos ambientais aos quais as plantas estão constantemente expostas (MITTLER, 2002). Podendo causar peroxidação lipídica e de membranas, danos a proteínas, enzimas e ácidos nucléicos (GOMEZ et al., 1999) e efeitos comuns em plantas submetidas a condições de estresse de baixas temperaturas (MORSY et al., 2007).

No decorrer da evolução, as plantas superiores desenvolveram inúmeros mecanismos de respostas a estresses. Estes 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).

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. O referido mecanismo protege a integridade das membranas contra o efeito das ROS, as quais são produzidas a taxas elevadas quando as plantas estão expostas a condições de estresse, possibilitando uma maior seletividade de certas espécies a condições ambientais adversas (NOCTOR; FOYER, 1998).

A enzima superóxido dismutase é encarregada de catalisar a transformação de superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio. No entanto, o peróxido de hidrogênio também é tóxico para as células, devendo ser eliminado através da enzima catalase e/ou peroxidase, formando água e oxigênio (SUDHAKAR et al., 2001). A ascorbato e glutathione reduzida contribuem adicionalmente na detoxificação

por ROS como superóxidos e radicais hidroxila.

Diante do exposto, justifica-se a importância da correta identificação deste patógeno, considerando a alta incidência relatada nas últimas safras e a ampla gama de hospedeiros alternativos, podendo vir a se tornar um risco fitossanitário para a cultura do arroz. Além disso, a planta poderá apresentar diferentes formas de defesa a este patógeno e o conhecimento destes mecanismos é de suma importância para o entendimento da interação.

Desta forma, o trabalho teve com objetivo caracterizar morfogeneticamente o novo agente causal associado à plantas de arroz na região sul do RS, bem como identificar as respostas de defesa da planta e os danos do processo de infecção foliar ocasionados pelo fungo.

**Artigo 1**

***Bipolaris gigantea* o real agente causal da mancha ocular da cultura do arroz  
(Revista Tropical Plant Pathology)**

1 ***Bipolaris gigantea* o real agente causal da mancha ocular da cultura do arroz**

2  
3 Priscila R. Meneses<sup>1</sup>, Eduardo Guatimosim<sup>2</sup>, Danielle R. de Barros<sup>1</sup>, Cândida R.J.  
4 Farias<sup>1</sup>

5  
6 <sup>1</sup>Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade  
7 Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil; <sup>2</sup>Agroecologia, Universidade Federal do  
8 Rio Grande, 96170-000, São Lourenço, RS, Brasil.

9  
10 Autor para correspondência: Priscila Rossatto Meneses, email: prisrossatto@hotmail.com

11  
12  
13 **RESUMO**

14 Manchas foliares, relacionadas à doença conhecida como mancha ocular foram  
15 observadas na cultura do arroz na região sul do estado do Rio Grande do Sul, a partir  
16 das safras 2006 e 2007. Um fungo pertencente ao antigo gênero *Helminthosporium*  
17 foi recorrentemente encontrado associado a estas lesões. Após isolamento,  
18 demonstração da patogenicidade e da caracterização morfológica e genética, foi  
19 possível concluir que o fungo apesar de rotineiramente ser tratado como pertencente  
20 ao gênero *Drechslera*, é na verdade uma espécie de *Bipolaris*. A nova combinação  
21 *Bipolaris gigantea* é introduzida, descrita e ilustrada no presente trabalho.

22  
23 **Palavras-chave:** *Drechslera gigantea*, *Helminthosporium*, *Oryza sativa*, postulados  
24 de Koch, taxonomia.

## 1 ABSTRACT

2 Leaf spots related to the known disease eyespot of rice were observed at southern  
3 Rio Grande do Sul, during 2006/07's harvest. A fungus from the antique genus  
4 *Helminthosporium* was recurrently found related to the spots. After isolation,  
5 pathogenicity demonstration and genetic and morphologic characterization, it was  
6 concluded that despite the fungus had been recurrently treated as part of *Drechslera*,  
7 it is actually a *Bipolaris* species. The new combination of *Bipolaris gigantea* is  
8 introduced, described and illustrated herein.

9

10 **Keywords:** *Drechslera gigantea*, *Helminthosporium*, *Oryza sativa*, Koch's postulates,  
11 taxonomy.

12

13

## 14 INTRODUÇÃO

15 O Brasil está em nono lugar na produção mundial de arroz (*Oryza sativa*),  
16 figurando como o maior produtor da América Latina, com mais de 12 milhões de  
17 toneladas em uma área de 2 milhões de hectares, ocupando o terceiro lugar em  
18 área cultivada com culturas anuais (FAO, 2017).

19 A maior produção entre as regiões do país está na região Sul, responsável  
20 por 81,6% da produção, o que significa 9,7 milhões de toneladas, em área superior a  
21 1 milhão de hectares, com produtividade de 7.668 kg/ha (CONAB, 2017). O estado  
22 do Rio Grande do Sul ocupa a primeira posição entre os demais estados da região,  
23 com 71,1% da produção nacional, o que representa 8,5 milhões toneladas em 1,1  
24 milhões de hectares e produtividade de 7.725 kg/ha (CONAB, 2017).



1           Apesar do grande potencial de produção no estado, ainda há diversos fatores  
2 que restringem a expressão do seu potencial produtivo, sobretudo condições  
3 fitossanitárias (SOSBAI, 2016). Doenças como a brusone (*Pyricularia oryzae*),  
4 mancha parda (*Bipolaris oryzae*), mancha estreita (*Passalora janseana*),  
5 escaldadura (*Microdochium albescens*), queima das bainhas (*Rhizoctonia oryzae*) e  
6 o complexo de fungos manchadores de grãos (*Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*,  
7 *Fusarium* sp., *Phoma sorghina* *Trichoconiella padwickii*) representa, um dos  
8 principais fatores limitantes para a cultura, reduzindo a área fotossintética,  
9 acarretando danos na produção de grãos e conseqüente quedas na produção  
10 (EMBRAPA, 2005; SOSBAI, 2016).

11           Apesar de existirem patossistemas profundamente conhecidos, existem  
12 outros que vêm despertando a atenção dos pesquisadores, ora pelo considerável  
13 impacto na cultura, ora pela ausência de informações acerca de seu agente causal.  
14 Este é o caso da mancha ocular, causada por *Drechslera gigantea*.

15           Durante a safra de 2006-2007, manchas foliares foram observadas em  
16 campos de produção das cultivares BRS Querência e BRS Atalanta, no município do  
17 Capão do Leão, RS (Nunes, 2008). Posteriormente, na safra 2007-2008, a doença  
18 foi relatada não só naquela região como também na Depressão Central do RS e no  
19 estado do Mato Grosso do Sul, predominantemente em campos cultivados com a  
20 cultivar BRS Querência, em estádios de final de ciclo (Nunes, 2008).

21           A doença se caracterizava a partir de pequenas manchas circulares de  
22 coloração marrom escuro, progredindo para manchas ovais, lembrando um formato  
23 de um olho, com coloração marrom claro, centro acinzentado e margens  
24 avermelhadas irregulares, coalescendo e necrosando no final do ciclo. Esta

1    sintomatologia é típica da doença conhecida como mancha ocular, observando-se  
2    associado às lesões um fungo pertencente ao antigo gênero *Helminthosporium*.

3            No presente trabalho são apresentados os resultados dos esforços realizados  
4    na caracterização da etiologia do fungo, bem como informações referentes aos  
5    testes de patogenicidade.

6

7

## 8    **MATÉRIAS E MÉTODOS**

9

### 10   **Coleta e isolamento**

11            Plantas de arroz irrigado, da cultivar BRS Querência, apresentando manchas  
12    foliares de sintomatologia atípica, foram coletadas no município do Capão do Leão  
13    (RS), durante a safra 2013/2014, 2015/2016 e 2016/2017 e levadas para análise em  
14    laboratório. Amostras representativas foram desidratadas em uma prensa de  
15    secagem. Tecidos frescos sintomáticos foram desinfestados com NaClO 1%, por  
16    1min, lavados duas vezes em água destilada estéril e submetidos a câmara úmida a  
17    25°C, com fotoperíodo de 12h (luz provida por lâmpadas fluorescentes de luz branca  
18    fria, a 40 cm acima das placas), durante cinco dias. Hifas emergentes dos tecidos  
19    foliares foram transferidas para placas contendo meio de cultura de Batata-Dextrose-  
20    Agar (BDA), utilizando uma agulha estéril, e mantida nas condições acima descritas,  
21    por sete dias. Amostras representativas do isolado foram depositadas na coleção do  
22    Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos, abrigada na  
23    Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas e  
24    identificado como LPS-04 (safra 2013/2014), LPS-05 (safra 2015/2016) e LPS-06

1 (safra 2016/2017). Bem como amostras representativas de plantas foram  
2 depositadas no Herbário da mesma universidade.

3

#### 4 **Características morfológicas**

5 Estruturas fúngicas foram removidas da superfície de folhas sintomáticas que  
6 apresentavam esporulação tanto pelo uso de um bisturi estéril, quanto pelo uso de  
7 fita adesiva. Lâminas foram montadas em ácido láctico e em lactofucsina. Lâminas  
8 contendo estruturas fúngicas foram observadas e fotografadas com microscópio de  
9 luz Motic A200, acoplado com câmara de vídeo Sony, Modelo SSC DC 54 A. Dados  
10 biométricos foram extraídos de pelo menos 100 estruturas distintas. Adicionalmente,  
11 lâminas de microcultura foram preparadas para a visualização de detalhes da  
12 conidiogênese. A fim de verificar a germinação, uma suspensão de conídios foi  
13 preparada a partir da deposição de 10 µl de água estéril sobre uma lâmina, com  
14 quatro repetições, e posteriormente incubadas em câmara de crescimento a 25° C e  
15 fotoperíodo de 12h, com avaliações repetidas a cada quatro horas.

16 Para produção da forma sexual, foi utilizada metodologia descrita por  
17 Sivanesan (1987) e Farias et al. (2011), vertendo-se uma suspensão de conídios  
18 sobre placas de petri contendo camada de papel mata-borrão esterilizado, e sobre  
19 esta, folhas de *Typha* sp. e papel filtro, estéreis. Posteriormente, as placas foram  
20 incubadas no escuro a 25° C, por 45 dias, ou até o aparecimento dos pseudotécios.

21

#### 22 **Descrição de culturas**

23 Colônias foram caracterizadas a partir de três meios de cultura, Agar-Água,  
24 BDA e V8. Discos de meio de cultura (5 mm diâmetro) obtidos de colônias (7 dias de  
25 idade) foram colocados no centro de placas de petri descartáveis (70 x 70 mm)

1 contendo cada um dos meios de cultura supracitados. Foram preparadas quatro  
2 repetições de cada meio. Placas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12  
3 horas, por sete dias. Colônias foram avaliadas quanto à morfologia e crescimento, e  
4 o resultado apresentado se refere à média do diâmetro medido ortogonalmente à  
5 data da descrição. Uma cartilha de cores padrão (MUNSELL, 2009) foi utilizada na  
6 descrição da coloração das culturas.

7

### 8 **Extração de DNA, amplificação e sequenciamento**

9 O isolado LPS-04 foi repicado em placas de Petri, contendo meio BDA, a  
10 25°C, fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. DNA genômico foi extraído a partir do  
11 micélio formado sobre as placas. Cerca de 100 mg de micélio foi coletado em  
12 microtubos de 2 ml, a partir de colônia formada sobre a placa, e então macerado  
13 com o auxílio de um pistilo em presença de nitrogênio líquido. Ao pó resultante da  
14 maceração, adicionou-se tampão de extração CTAB 2% e  $\beta$ -mercaptoetanol. A  
15 solução foi então incubada a 65°C por 45 min, invertendo gentilmente os tubos a  
16 cada 15 min. Adicionou-se 500  $\mu$ l de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), duas  
17 vezes, procedendo-se a coleta de 500  $\mu$ l do sobrenadante em tubos contendo 700  $\mu$ l  
18 de isopropanol. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o DNA genômico  
19 foi lavado em álcool 70% e ressuspendido em tampão TE contendo RNase a 37°C  
20 por 1h, e então acondicionado a -20°C (Doyle & Doyle, 1990).

21 O par de primers ITS-1 e ITS4 foi utilizado para amplificar a região *internal*  
22 *transcribed spacer region* (ITS), o par de primers GPD1 e GPD2 foi utilizado para  
23 amplificar a região *glycerol 3-phosphate dehydrogenase* (GPDH), ao passo que o  
24 par de primers EF1-983F e EF1-2218R, para amplificar a região parcial *elongation*  
25 *fator 1- $\alpha$  (tef1)*, conforme Tabela 1. As amplificações foram realizadas utilizando Taq

1 DNA Polimerase (Promega Corporation, Madison, EUA), seguindo o protocolo do  
2 fabricante. As condições da reação foram estabelecidas para cada par de primers  
3 (Tabela 2). Reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (Bio-Rad,  
4 Califórnia, USA). Produtos de PCR foram analisados por meio de eletroforese em  
5 gel de agarose (1% p/v) e corados em azul de bromofenol para checagem da pureza  
6 e qualidade dos fragmentos. Posteriormente, foram purificados através do kit GFX  
7 PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Little Chalfont,  
8 Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Produtos  
9 de PCR purificados foram sequenciados pela empresa Helixxa (Paulínia, São Paulo,  
10 Brasil). Eletroferogramas foram analisados no programa MEGA v. 7.0 (Tamura et. al.  
11 2011). Sequências resultantes foram depositadas no GenBank  
12 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

13

#### 14 **Análise filogenética**

15 Inicialmente, sequências obtidas a partir dos bancos de dados de Tan et al.  
16 (2014) e Magnamoda et al. (2014) do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e as  
17 novas sequências obtidas no presente trabalho, foram alinhadas utilizando o  
18 programa MAFFT v. 7 (Katon & Standley, 2013), e sempre que necessário,  
19 ajustadas manualmente no MEGA. Após uma análise inicial, o banco de dados foi  
20 reduzido ao isolado em estudo e seus vizinhos diretos (Tabela 3). Modelos de  
21 evolução genética apropriados foram selecionados utilizando o programa  
22 MrModeltest v. 2.3 (Nylander, 2004) e aplicados a cada partição gênica. Baseado  
23 nos resultados do MrModeltest v. 2.3, uma análise filogenética baseada em  
24 inferência Bayesiana foi realizada na plataforma on-line CIPRES (CIPRES, 2017),  
25 usando o programa MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e aplicando o

1 modelo de substituição de bases GTR+I+G para a região ITS, e o modelo HKY+I  
2 para a região GPDH e *tef1*. Probabilidades a posterior foram determinadas pela  
3 amostragem de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) no MrBayes v. 3.2.1.  
4 Seis cadeias de Markov simultâneas foram executadas para 10.000.000 de  
5 gerações e árvores foram amostradas a cada 100 gerações, até a convergência ser  
6 atingida (stopval=0.01). Árvores foram visualizadas no programa Geneious v. 8  
7 (<http://www.geneious.com>) (Kearse et al., 2012) e então exportadas para programas  
8 gráficos para futura edição. *Curvularia lunata* (isolado CBS 730.96) serviu como  
9 *outgroup* à análise filogenética.

10

### 11 **Testes de patogenicidade**

12 Os isolados LPS-04, LPS-05 e LPS-06 foram utilizados nos testes de  
13 patogenicidade, conforme os postulados de Koch. Sementes de arroz da cultivar  
14 BRS Querência, foram desinfestadas superficialmente (1 min em etanol 70%, 2 min  
15 em solução de NaClO 1%), seguidas por três lavagens consecutivas em água  
16 destilada estéril. Após foram semeadas em datas escalonadas, em solo esterilizado  
17 (três autoclavagens sucessivas a 1 atm/120 °C/1 hora) em baldes e conduzidas em  
18 casa de vegetação.

19 Ao atingirem o estágio de floração (R4) e grão leitoso (R6), as plantas foram  
20 aspergidas com suspensão de conídios ( $10^6$  esporos/mL), utilizando borrifador  
21 manual (TECBLAS® 45 mL). Água destilada estéril foi utilizada como controle.  
22 Plantas inoculadas foram acondicionadas em câmara de nevoeiro à 90% de  
23 umidade relativa do ar, a temperatura de  $\pm 25$  °C, por 72 h e fotoperíodo de 12 h.  
24 Cada ensaio consistiu de quatro repetições. Após incubação em câmara de  
25 nevoeiro, as plantas foram acondicionadas em casa de vegetação e avaliadas a

1 cada três horas até o aparecimento dos sintomas. Folhas com sintomas foram  
2 coletadas e incubadas em câmara úmida a fim de incentivar a esporulação. Culturas  
3 foram reisoladas e características morfométricas analisadas, completando os  
4 postulados de Koch.

5

6

## 7 **RESULTADOS**

8

### 9 **Análise filogenética**

10 As sequências das regiões ITS, GPDH e *tef1* foram comparadas com outras  
11 sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através da  
12 ferramenta BLASTn, e as sequências mais próximas foram: 100% com *Drechslera*  
13 *gigantea* (KY784633) para ITS, 100% com *Bipolaris gossypina* (KJ415418) para  
14 GPDH e 98% com *Bipolaris sivanesianiana* (KX452473) para *tef1*. A árvore  
15 filogenética inferida a partir da análise Bayesiana das três regiões ITS, GPDH e *tef1*,  
16 concatenadas, suporta sem sombra de dúvidas, o isolado LPS-04, não apenas como  
17 pertencente ao gênero *Bipolaris*, como separado das demais espécies conhecidas  
18 (Figura 2).

19

### 20 **Taxonomia**

21 ***Bipolaris gigantea* (Heald & F.A Wolf) P. R. Meneses, Guatimosim, Barros &**  
22 **Farias comb. nov.**

23 **GenBank ITS sequence** (2169629); **GAPD sequence** (2169625); ***tef1* sequence**  
24 (2169702) Basionimia. *Helminthosporium giganteum* Heald & F. A. Wolf. Botanical  
25 Miscellany 11: 223. 1911.

1           **Descrição em planta:** Manchas foliares anfígenas, começando como  
2 pequenos pontos circulares de coloração marrom escuro com um pequeno halo  
3 clorótico (Figura 3A), passando a lesões ovais semelhantes ao formato de olho, cor  
4 marrom claro com halo clorótico, centro acinzentado e margens irregulares de cor  
5 marrom avermelhado, 2–30 mm de comprimento × 0,5–4 mm de largura (Figura 3B),  
6 coalescendo e necrosando, reduzindo a área fotossintética.

7           **Forma sexual:** não observada. **Forma assexual:** Micélio interno ramificado,  
8 sub-hialino, septado. Micélio externo ausente. Estroma ausente. Conidióforos  
9 solitários, erumpentes, retos ou flexuosos, sub-cilíndricos, ápice arredondado, base  
10 inflada, 350–1300 × 9–16 µm de comprimento e largura, respectivamente , 10–19-  
11 septos,, marrom escuro na base, tendendo a tons mais claros em direção ao ápice,  
12 ápice sub-hialino, lisos (Figura 4a). Conídios solitários, retos, sub-cilíndricos, ápice  
13 arredondado, base truncada, 111–358,5 × 12–23,5 µm, 2–8-septado, marrom pálido,  
14 lisos (Figura 4b). Cicatriz conidial levemente espessa e escura (Figura 4c). Células  
15 conidiogênicas terminais ou intercalares, proliferação simpodial (Figura 4d) ou  
16 percorrente em condições de elevada umidade, sub-hialinas, lisas.

17           **Características da cultura:** Colônias em Ágar-água de crescimento lento,  
18 16,5 mm diâmetro após sete dias, rizoidal, margens serrilhadas e elevação plana,  
19 coloração cinza verde-oliva (Figura 5a). Colônias em BDA, de crescimento  
20 moderado, 21 mm diâmetro após sete dias, circular, margens serrilhadas e elevação  
21 plana (Figura 5b), cor preta e nas bordas cinza esverdeado. Colônias em V8 de  
22 crescimento moderado, 30 mm diâmetro após sete dias, circular, margens lobulares  
23 e elevação plana (Figura 5c), centro preta e nas bordas marrom claro. Esporulação  
24 em V8 baixa, não esporulando nos demais meios (Ágar-água e BDA). Tentativas de  
25 produção da forma sexual fértil provaram-se ineficazes.



1           **Material analisado:** Brasil, Rio Grande do Sul, Capão do Leão, campos de  
2 produção de Arroz, em folhas de *Oryza sativa*, cultivar BRS Querência, 12 fevereiro  
3 2014, 10 janeiro de 2016 e 5 março de 2017.

4           Ao seguir a chave dicotômica proposta por Sivanesan (1987), uma espécie se  
5 assemelha com o fungo Brasileiro, a saber *Drechslera gigantea*, isolada a partir de  
6 folhas de *Cynodon dactylon*, nos EUA (Heald & Wolf, 1911). Apesar das  
7 características morfológicas agruparem com aquelas descritas para o gênero  
8 *Drechslera*, a análise filogenética ora apresentada (Figura 2), mostra de forma  
9 irrefutável, que o presente isolado trata-se, na verdade de uma espécie de *Bipolaris*,  
10 o que justifica a presente combinação.

11

## 12 **Testes de patogenicidade**

13           As lesões foliares, expressadas 20 horas após inoculação, consistiram de  
14 pequenos pontos de coloração marrom (Figura 3a), independente do estágio  
15 fenológico da doença e do isolado utilizado. O progresso da doença levou ao  
16 aparecimento de manchas sintomáticas no limbo foliar, quando os sintomas das  
17 plantas inoculadas tornaram-se semelhantes aos observados nas plantas doentes  
18 coletadas a campo (Figura 3b). As plantas usadas como controle apresentaram-se  
19 bem desenvolvidas sem sintomas visíveis. O fungo foi recuperado das folhas  
20 sintomáticas de arroz inoculadas e re-isolado, completando os postulados de Koch.

21

22

## 23 **DISCUSSÃO**

24           Fungos hifomicetos dematiáceos outrora reconhecidos como  
25 *Helminthosporium* Link (1809), se tratam na verdade de um complexo de gêneros,

1 associados aos mais diversos habitats (Alcorn; 1988). A taxonomia do grupo é  
2 complexa, haja vista que frequentes mudanças nomenclaturas e refinamentos já  
3 ocorreram (Muchovej & Muchovej; 1990; Alcorn; 1991; Shoemaker; 1998; Zhang &  
4 Berbee, 2001). Morfologicamente, o grupo já foi separado, sendo as espécies  
5 fitopatogênicas transferidas para os gêneros *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* e  
6 *Exserohilum* (Sivanesan, 1987).

7 Características morfológicas são importantes atributos utilizados na  
8 identificação e classificação de fungos pertencente ao complexo *Helmintosporiuns*,  
9 no entanto, a classificação unicamente baseada nestas características é por vezes  
10 insuficiente para designar espécies, e até mesmo o gênero dentro de um grupo,  
11 sobretudo dado à elevada variabilidade fenotípica existente, assim como outras  
12 fontes de variação que incluem o substrato associado aos organismos, a idade e a  
13 maturação dos conídios (Drechsler, 1934; Alcorn 1988; Berbee et al., 1999; Dela  
14 Paz et al., 2006; Manamgoda et ai., 2012; Manamgoda et ai., 2014; Tan et al., 2014).

15 Assim, os usos de técnicas moleculares de classificação e identificação  
16 contribuem de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas  
17 entre as diferentes espécies de fungos, bem como, permitem uma classificação de  
18 maior estabilidade (Azevedo et al., 2006).

19 Apesar de *Bipolaris* e *Drechslera* apresentarem semelhanças em morfologia,  
20 a forma sexual de *Bipolaris* reside em *Cochliobolus*, ao passo que a forma sexual de  
21 *Drechslera* reside em *Pyrenophora* (Drechsler, 1934). Adicionalmente, estudos  
22 filogenéticos têm comprovado esta separação (Berbee et al., 2000; Magnamoda et  
23 al., 2014). Não obstante do fato de que todas as tentativas envolvendo a formação  
24 da fase sexual provaram-se ineficazes, o posicionamento filogenético assegura o  
25 isolado brasileiro como pertencente ao gênero *Bipolaris*.

1 Zhang & Berbee (2001) já haviam demonstrado que outro isolado de *D.*  
2 *gigantea*, proveniente do Japão, também agrupava no clado de *Cochiobolus* (junto a  
3 outras espécies de *Bipolaris*) ao invés do clado de *Pyrenophora* (onde espécies de  
4 *Drechslera* são tipicamente encontradas). Recentemente (Isakeit et al., 2017), um  
5 novo isolado de *D. gigantea* foi encontrado nos EUA – país de origem da espécie  
6 tipo, e assim como os isolados japoneses e brasileiro, o isolado norte americano  
7 agrupa dentro do clado de *Bipolaris* (dados não mostrados). Os autores, porém, não  
8 submeteram uma combinação válida. Apesar de os autores terem amplificado  
9 somente a região ITS, esta possui 100% de identidade com o isolado brasileiro.  
10 Assim como no presente trabalho, outras espécies semelhantes a *Drechslera* em  
11 morfologia, mas filogeneticamente próximas a *Bipolaris*, também foram  
12 recombinadas, como *D. biseptata* (= *B. spicifera*), *Drechslera portulacae* (= *B.*  
13 *portulacae*) e *D. heveae* (= *B. heveae*) (Zhang & Berbee, 2001).

14 Diante de todas as evidências apresentadas, não resta outra opção, que  
15 propor a nova combinação, esclarecendo a correta taxonomia do agente causal da  
16 mancha ocular do arroz, patógeno que a cada dia ganha maior visibilidade haja vista  
17 a importância da cultura para o Brasil.

18

19

## 20 REFERÊNCIAS

21 Alcorn JL (1998) The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. Annual Review of  
22 Phytopathology 26: 37-56.

23 Berbee ML, Carmean DA, Winka K (2000) Ribosomal DNA and resolution of  
24 branching order among the ascomycota: how many nucleotides are enough?  
25 Molecular Phylogenetics and Evolution 17: 337-344.

- 1 Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S (1999) *Cochliobolus* phylogenetics and origin of  
2 known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-  
3 phosphate dehydrogenase sequences. *Mycologia* 91: 964- 977.
- 4 CIPRES. Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (2017). Disponível em:  
5 <http://www.phylo.org/index.php>. Acessado em 02 de maio de 2017.
- 6 CONAB. Arroz, safra 2015 - 2016. Disponível em:  
7 [http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9graos\\_08.09.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9graos_08.09.pdf). Acessado em  
8 02 de maio de 2017.
- 9 Dela Paz M, Goodwin PH, Raymundo AK, Ardales EY, Cruz CM (2006) Phylogenetic  
10 analysis based on ITS sequences and conditions affecting the type of conidial  
11 germination of *Bipolaris oryzae*. *Plant pathology* 55: 756-765.
- 12 Doyle JJ, Doyle JFA (1990) Rapid DNA isolation procedure for small quantities of  
13 fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- 14 Drechsler C (1934) Phytopathological and taxonomic aspects of *Ophiobolus*,  
15 *Pyrenophora*, *Helminthosporium*, and a new genus, *Cochliobolus*. *Phytopathology*  
16 9: 953-983.
- 17 EMBRAPA (2005). Manejo de doenças. Disponível em:  
18 <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/Abertura.html>. Acessado em 02  
19 de maio de 2017.
- 20 FAO. All about rice. Disponível em: [http:// www.fao.org/rice](http://www.fao.org/rice). Acessado em 02 de  
21 maio de 2017.
- 22 Farias CRJ, Afonso APS, Pierobom CR, Del Ponte EM (2011) Regional survey and  
23 identification of *Bipolaris* spp. associated with rice seeds in Rio Grande do Sul State,  
24 Brazil. *Ciência Rural* 41: 369-372.

- 1 Drechsler Isakeit T, Commer B, Shaw BD, Brown M, Neely C (2017) First Report of  
2 Leaf Spot of Barley Caused by *Drechslera gigantea* in the United States. Plant  
3 Disease, p. PDIS-03-17-0406-PDN, 2017.
- 4 Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version  
5 7: Improvements in Performance and Usability. Molecular Biology and Evolution 30:  
6 772–780.
- 7 Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S,  
8 Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A  
9 (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for  
10 the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28: 1647-1649.
- 11 Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EH, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas  
12 RG, Tan YP, Hyde KD (2012) A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the  
13 *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. Fungal Diversity 56: 131-144.
- 14 Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E,  
15 Hyde KD (2014) The genus *Bipolaris*. Studies in mycology 79: 221-288.
- 16 Munsell AH (2009) Munsell soil-color charts. Whith Genuine Munsell Color Chips.
- 17 Nunes CDM (2008) Ocorrência das doenças: mal-do-pe (*Gaeumannomyces*  
18 *graminis*) e mancha-parda (*Drechslera* sp.) na cultura do arroz. Embrapa CPATB,  
19 Circular técnica 205.
- 20 Nylander JAA (2004) MrModeltest. Program distributed by the author. Evolutionary  
21 Biology Centre, Uppsala University.
- 22 O'donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of  
23 the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear  
24 and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of  
25 Sciences 95: 2044-2049.

- 1 Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference  
2 under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- 3 Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*,  
4 *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158:261p.
- 5 SOSBAI (2016) Arroz Irrigado: Recomendações da pesquisa para o Sul do Brasil.  
6 Pelotas: SOSBAI, 200p.
- 7 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) Molecular  
8 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and  
9 maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- 10 Tan YP, Madrid H, Crous PW, Shivas RG (2014) *Johnalcornia* gen. et. comb. nov.,  
11 and nine new combinations in *Curvularia* based on molecular phylogenetic  
12 analysis. *Australasian Plant Pathology* 43: 589-603.
- 13 White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor, JW (1990) Amplification and direct sequencing  
14 of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods*  
15 *and applications* 18: 315-322.
- 16 Zhang G, Berbee ML (2001) *Pyrenophora* phylogenetics inferred from ITS and  
17 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 93: 1048-  
18 1063.

1 **Tabela 1** - Lista de pares de primers, utilizados para amplificação das regiões  
 2 genômicas estudadas, suas respectivas sequências, tamanho de fragmento  
 3 esperado e referências bibliográficas. UFPel, Pelotas, RS, 2017.

Par de primers		Fragmento esperado		
	Sequência (5' → 3')	(pb)	Referência	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	540	White et al. (1990)	
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
GPD1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	530	Berbee et al. (1999)	
GPD2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC			
EF1-983F	GCYCCYGGHCA CGT GAYTTYAT	±800	O'Donnell et al. (1998)	
EF1-2218R	ATGACACCRACRGCACRGTGTG			

4 ITS1 e ITS4: referente à região do espaço interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer*); GPD1 e  
 5 GPD2: gene que codifica para gliceraldeido-3--fosfato desidrogenase; EF1-983F e EF-2218R: gene  
 6 que codifica para o fator de alongação 1- $\alpha$  (*tef1*).

- 1 **Tabela 2** - Condições de amplificação para regiões analisadas. UFPel, Pelotas, RS,  
 2 2017.

Locus	Desnaturação		Pareamento	Extensão		Nº de ciclos	Referência
	Inicial	Desnaturação		Extensão	Final		
ITS	94°C/2min	94°C/1min	64°C/1 min	72°C/2min	72°C/10min	30	Nascimento & Van Der Sand (2008)
GPDH	95°C/2 min	95°C/1min	52°C/1min	72°C/45seg +(4seg/ciclo)	72°C/10min	35	Zhang & Berbee (2001)
<i>tef1</i>	94°C/5 min	94°C/45seg	52°C/30seg	72°C/90seg	72°C/6min	40	O'Donnell et al. (1998)

- 3 ITS: referente à região internal transcribed spacer; GPDH: referente à região glycerol-3-phosphate  
 4 dehydrogenase; *tef1*: referente à região elongation factor 1.



- 1 **Tabela 3** – Descrição das espécies utilizada neste estudo, conforme isolado e  
 2 referência. UFPel, Pelotas, RS, 2017.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado<sup>1</sup></b>	<b>Referências</b>
<i>B. cookei</i>	MAFF 511191	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. austrostipae</i>	BRIP 12490	Tan et al. (2017)
<i>B. coffeana</i>	BRIP 14845	Tan et al. (2014)
<i>B. cynodontis</i>	C-1204	Kandler et al. (2015)
	CBS 109894	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. bamagaensis</i>	BRIP 10711	Tan et al. (2017)
	BRIP 13577	Tan et al. (2017)
	BRIP 14847	Tan et al. (2017)
	BRIP 15934	Tan et al. (2017)
<i>B. chloridis</i>	BRIP 10965	Manamgoda et al. (2012)
<i>B. clavata</i>	BRIP 12530	Tan et al. (2014)
<i>B. axonopicola</i>	BRIP 11740	Tan et al. (2017)
<i>B. heveae</i>	CBS 241.92	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. microlaenae</i>	CBS 280.91	Madrid et al. (2014)
<i>B. simmondsii</i>	BRIP 12030	Tan et al. (2017)
<i>Bipolaris sp.</i>	CBS 164.91	Zhang et al. (2001)
<i>B. oryzae</i>	AR 3797	Gibbs et al. (2005)
	AR 5204	Hoskins et al. (2007)
	MAFF 235449	Manamgoda et al. (2014)
	MFLUCC 10-0715	Manamgoda et al. (2012)
<i>B. sivanesaniana</i>	BRIP 15822	Tan et al. (2017)
	BRIP 15847	Tan et al. (2017)

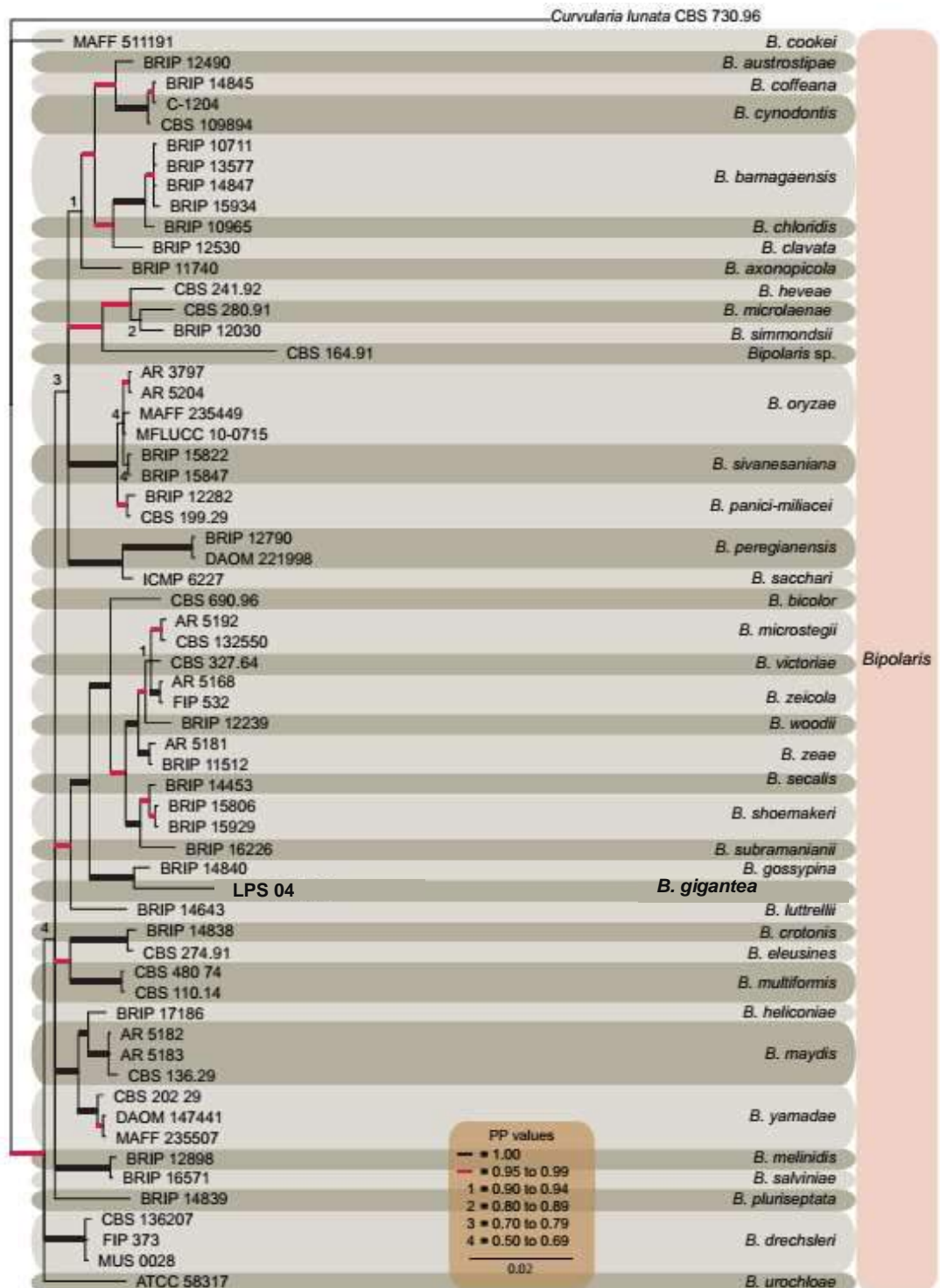
<i>B. panici-miliacei</i>	BRIP 12282	Tan et al. (2014)
	CBS 199.29	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. peregrinensis</i>	BRIP 12790	Manamgoda et al. (2014)
	DAOM 221998	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. sacchari</i>	ICMP 6227	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. bicolor</i>	CBS 690.96	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. microstegii</i>	AR 5192	Manamgoda et al. (2014)
	CBS 132550	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. victoriae</i>	CBS 327.64	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. zeicola</i>	AR 5168	Manamgoda et al. (2014)
	FIP 532	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. woodii</i>	BRIP 12239	Tan et al. (2017)
<i>B. zea</i>	AR 5181	Manamgoda et al. (2014)
	BRIP 11512	Tan et al. (2014)
<i>B. secalis</i>	BRIP 14453	Tan et al. (2014)
<i>B. shoemakeri</i>	BRIP 15806	Tan et al. (2014)
	BRIP 15929	Tan et al. (2014)
<i>B. subramanianii</i>	BRIP 16226	Tan et al. (2014)
<i>B. gossypina</i>	BRIP 14840	Tan et al. (2014)
<b><i>B. gigantea</i></b>	<b>LPS 04</b>	<b>Este estudo</b>
<i>B. luttrellii</i>	BRIP 14643	Tan et al. (2014)
<i>B. crotonis</i>	BRIP 14838	Tan et al. (2014)
<i>B. eleusines</i>	CBS 274.91	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. multiformis</i>	CBS 480 74 28S	Manamgoda et al. (2014)
	CBS 110.14	Manamgoda et al. (2014)

<i>B. heliconiae</i>	BRIP 17186	Tan et al. (2014)
<i>B. maydis</i>	AR 5182	Manamgoda et al. (2014)
	AR 5183	Manamgoda et al. (2014)
	CBS 136.29	Amaradasa et al. (2014)
<i>B. yamadae</i>	CBS 202 29	Manamgoda et al. (2014)
	DAOM 147441	Manamgoda et al. (2014)
	MAFF 235507	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. melinidis</i>	BRIP 12898	Manamgoda et al. (2012)
<i>B. salviniae</i>	BRIP 16571	Tan et al. (2014)
	BRIP 12898	Manamgoda et al. (2012)
<i>B. pluriseptata</i>	BRIP 14839	Tan et al. (2014)
<i>B. drechsleri</i>	CBS 136207	Crous et al. (2013)
	FIP 373	Crous et al. (2013)
	MUS 0028	Crous et al. (2013)
		Manamgoda et al. (2014)
<i>B. urochloae</i>	ATCC 58317	Manamgoda et al. (2014)

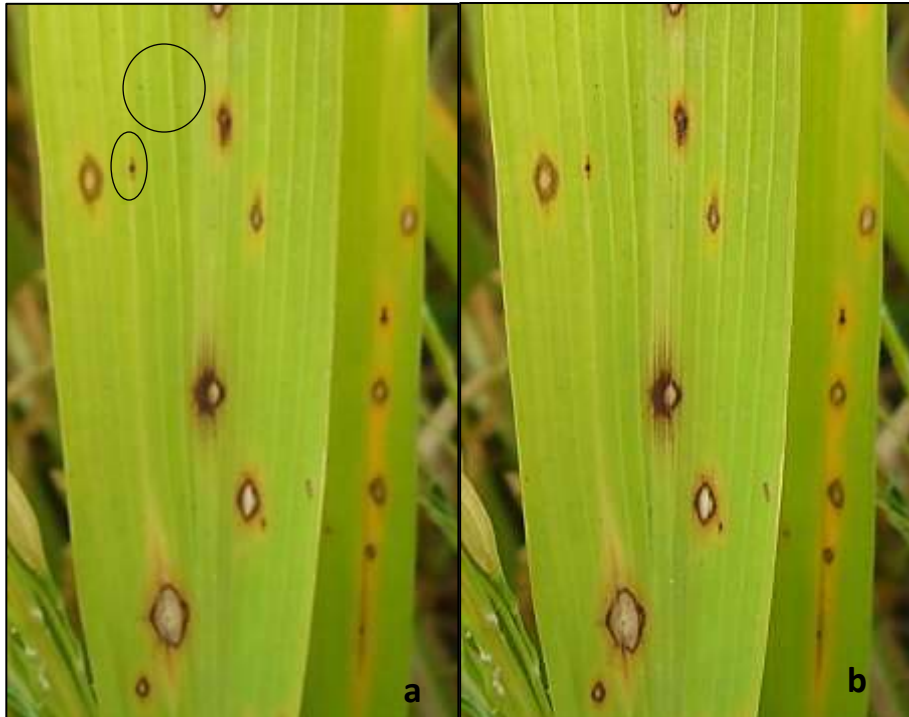
1 Locais onde estão depositados<sup>1</sup>: AR, FIP, MFU, MUS: Systematic Mycology and Microbiology  
2 Laboratory, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville,  
3 Maryland. ATCC: American Type Culture Collection, Virginia, USA; BR Plant Pathology Herbarium,  
4 Department of Primary Industries, Queensland, Australia; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity  
5 Centre, Utrecht, The Netherlands; DAOM: Plant Research Institute, Department of Agriculture  
6 (Mycology), Ottawa, Canada. E.G.S.: Collection of E.G. Simmons; ICMP = PDDCC: International  
7 Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, Private Bag 92170, Auckland, New  
8 Zealand; IMI: International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egha Bakeham Lane, United  
9 Kingdom; MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, Ibaraki, Japan; MFLUCC:  
10 Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand.



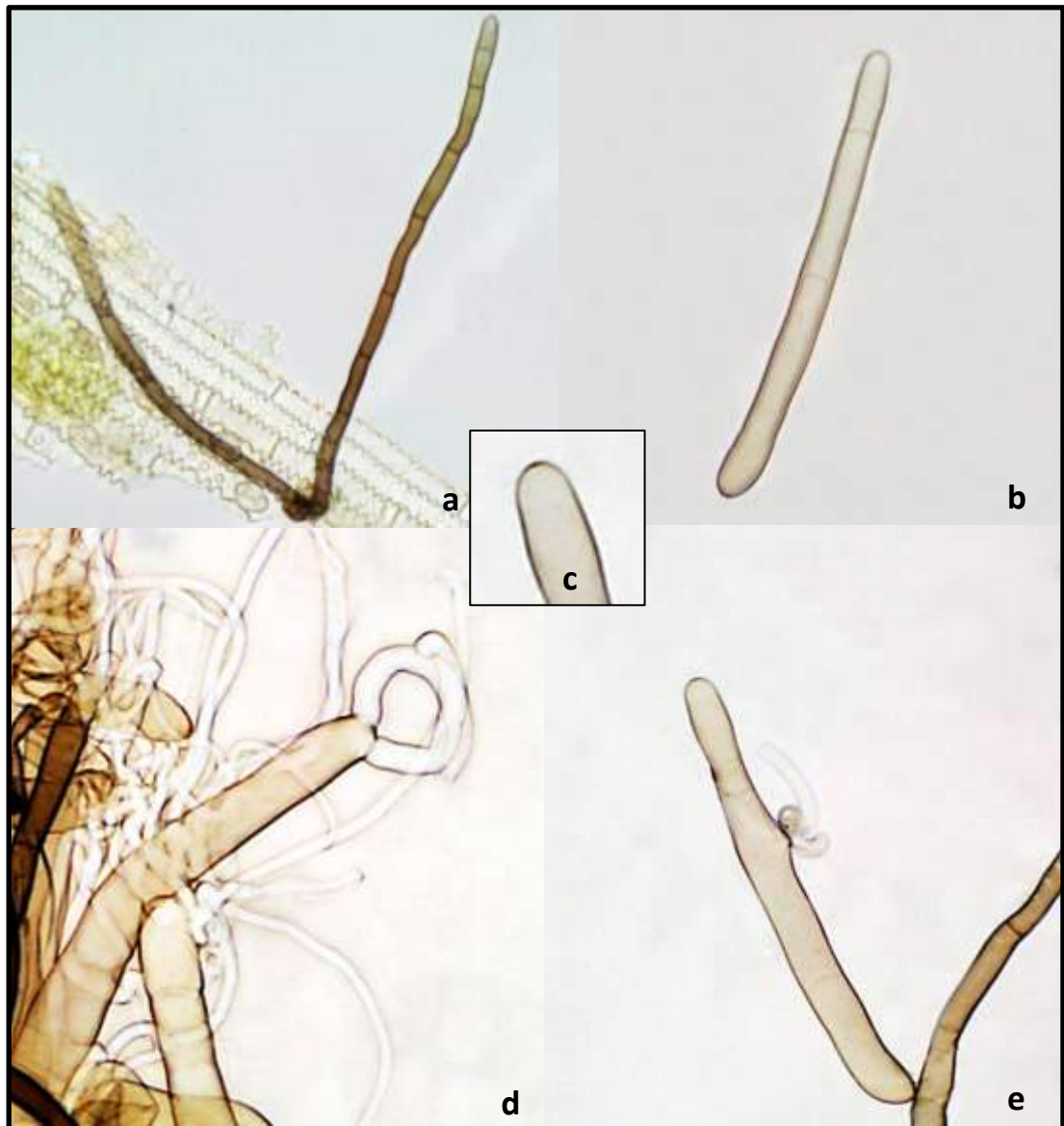
- 1 **Figura 1** – Sintomas de mancha ocular em lavoura de arroz na cultivar BRS
- 2 Querência, ocasionados por *Bipolaris gigantea*. Capão do Leão, RS, safra 2013-14.
- 3 UFPel, Pelotas, RS, 2017.



- 1 **Figura 2** – Inferência filogenética bayesiana, das regiões ITS, GPDH e *tef1*
- 2 concatenadas, pelo modelo de substituição de bases GTR+I+G e HKY+I e
- 3 probabilidades a *posteriori* (pp) determinadas por MCMC. *Curvularia lunata* (CBS
- 4 730.96) foi aplicada como *outgroup*. UFPel, Pelotas, RS, 2017.

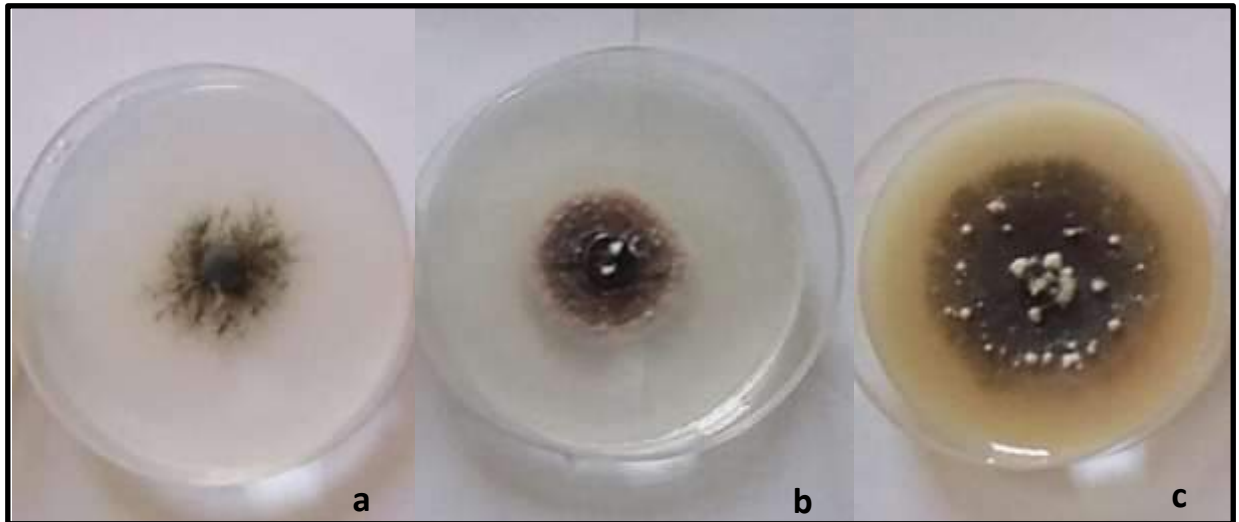


1 **Figura 3** – Sintomas de mancha ocular em folhas de arroz. a) Pequenos pontos de  
2 coloração marrom com halo amarelado, em destaque. b) Lesões ovais em forma de  
3 olho, cor marrom claro com halo clorótico, centro acinzentado e margens irregulares  
4 marrom avermelho. Capão do Leão, RS, safra 2013-14. UFPel, Pelotas, RS, 2017.



1

2 **Figura 4** - Características morfológicas da fase assexuada de *Bipolaris gigantea*. a)  
 3 Conidióforo solitário; b) Conídio; c) Detalhe da cicatriz conidial; d) Tubo germinativo  
 4 terminais; e) Tubo germinativo intercalares. UFPel, Pelotas, RS, 2017.



1

2 **Figura 5** – Características das culturas de *Bipolaris gigantea*. a) Meio Agar-Água. b)

3 Meio BDA. c) Meio V8. UFPel, Pelotas, RS, 2017.



**Artigo 2**

**Componentes bioquímicos e citológicos de cultivares de arroz a mancha  
ocular**

**(Revista Tropical Plant Pathology)**

1 **Componentes bioquímicos e citológicos de cultivares de arroz a mancha**  
2 **ocular**

3  
4 Priscila R. Meneses<sup>1</sup>, Keilor R. Dorneles<sup>1</sup>; Victoria Moreira<sup>1</sup>; Leandro J. Dallagnol<sup>1</sup>;  
5 Cândia Renata Jacobsen de Farias<sup>1</sup>

6  
7 <sup>1</sup>Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade  
8 Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

9  
10 Autor para correspondência: Priscila Rossatto Meneses, email: prisrossatto@hotmail.com

11  
12  
13 **RESUMO**

14 Duas cultivares de arroz irrigado, em estágio reprodutivo (floração e grão leitoso),  
15 foram avaliadas quanto ao grau de resistência à mancha ocular ocasionada por  
16 *Bipolaris gigantea*, através de componentes de resistência, variáveis bioquímicas de  
17 defesa de plantas, peroxidação lipídica e respostas citológicas. A cv. BRS Querência  
18 mostrou maior suscetibilidade que a cv. Puitá Inta CL, independente do estágio  
19 fenológico, quando considerados os componentes de resistência (comprimento final  
20 da lesão, taxa de expansão da doença, área abaixo da curva de progresso da  
21 doença e severidade final) e número de células danificadas. Apresentando uma  
22 baixa atividade de enzimas antioxidantes e a alta concentração de aldeído malônico  
23 (MDA). A cv. Puitá Inta CL ativou respostas de defesa contra ao patógeno através  
24 de enzimas como superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, com  
25 aumento de MDA após 72 horas de inoculação em ambos os estádios. Os  
26 resultados deste estudo demonstram as primeiras evidências de respostas de defesa

1 de cultivares de arroz, em estádios fenológicos, ao patógeno relatado no Sul do Rio  
2 Grande do Sul.

3

4 **Palavras- chaves:** atividade enzimática, *Bipolaris gigantea*, *Drechslera gigantea*,  
5 estádios fenológicos, *Oryza sativa*, ROS.

6

7

#### 8 **ABSTRAT**

9 Two irrigated rice cultivar, in reproductive stage (flowering e grain milk), were evaluate  
10 for the resistance degree to the eyespot caused by *Bipolaris gigantea*, through the  
11 resistance components, biochemical defense mechanisms, lipid peroxidation and  
12 cytological responses. The cv. BRS Querência showed to be more susceptible than  
13 the cv. Putiá Inta CL, independently of phenologic stage, considering the resistance  
14 compounds (total lesion length, disease expansion rate, area under the disease  
15 progress curve and final severity) and the number of damaged cells. Presenting low  
16 activity of antioxidants enzymes and high concentration of malondialdehyde (MDA).  
17 The Putiá Inta CL cv. activated defense responses to the pathogen through enzymes  
18 such as, superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase, with an  
19 increase of MDA after 72 hours of inoculation at both stages. The results of this study  
20 demonstrated the first evidences of rice cultivar defense responses, on phenological  
21 stage, to the pathogen reported on the south region of Rio Grande do Sul state.

22

23 **Keyword:** activity enzymatic, *Bipolaris gigantea*, *Drechslera gigantea*, *Oryzae sativa*,  
24 phenological stage, ROS.

25

## 1 INTRODUÇÃO

2 Na cultura do arroz as principais doenças são ocasionadas pelos fungos  
3 *Pyricularia oryzae* (brusone) e *Bipolaris oryzae* (mancha parda). Além destas, no sul  
4 do RS, um novo patógeno tem sido detectado. Descrito como *Bipolaris gigantea*, o  
5 fungo causa a doença denominada mancha ocular, cuja ocorrência e intensidade  
6 vêm aumentando nas últimas safras, predominantemente nas cultivares BRS  
7 Querência e Atalanta. O fungo provoca lesões ovaladas, de coloração marrom claro  
8 com halo clorótico, centro acinzentado e margem marrom avermelhada. Tal aumento  
9 tem alertado para um potencial problema fitossanitário à cultura do arroz no estado  
10 (Nunes, 2008).

11 A inexistência de um sistema imunológico nas células de tecido vegetal,  
12 capaz de enfrentar situações adversas, é por vez compensada por defesas pré-  
13 formadas e/ou pós-formadas estruturais ou bioquímicas da planta, as quais  
14 permitem a capacidade de defesa e de reações a situações de estresse como a  
15 exposição a fatores bióticos (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Os mecanismos  
16 estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do  
17 patógeno, enquanto que os bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o  
18 desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência  
19 nos tecidos do hospedeiro (Schwan-Estrada et al., 2008).

20 Tais defesas não só protegem as plantas quanto à ação do patógeno, mas  
21 por vezes podem acarretar reações deletérias ao seu próprio desenvolvimento,  
22 ocasionando danos celulares, que afetam a fisiologia foliar, especialmente ao nível  
23 da membrana (Dallagnol et al., 2011).

24 Os patógenos, através da ação de fatores de virulência, enzimas de  
25 degradação da parede celular e ação de fitotoxinas, ativados de forma a suprir a

1 defesa das plantas ou agir em pontos específicos, principalmente no processo  
2 fotossintético, levam a planta ao estresse oxidativo e a ocorrência da peroxidação  
3 lipídica, degradação de membranas, danos a proteínas e ácidos nucléicos e  
4 consequentemente colapso celular (Gomez et al., 1999).

5 A ação de fitotoxinas sobre o tecido foliar faz com que ocorra um rápido  
6 escurecimento e morte celular do parênquima (Tullis, 1935). Sendo detectada em  
7 fluidos de conídios germinados, assim como em folhas infectadas com sintoma de  
8 clorose (Xiao et al., 1991). A clorose é uma consequência da redução das defesas  
9 antioxidantes nos cloroplastos, com subsequente peroxidação lipídica e aumento  
10 da concentração de aldeído malônico (MDA), o que leva a uma redução dos  
11 teores de clorofila e da atividade fotossintética (Munne-Bosch & Alegre, 2002). O  
12 MDA é o principal produto formado durante a peroxidação lipídica e consequente  
13 indicador de dano celular oriundo do estresse oxidativo.

14 O estresse oxidativo, ocasionado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS)  
15 como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^-$ ),  
16 leva a planta a produzir respostas ativando mecanismos de defesa, buscando  
17 através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos manter a homeostase  
18 fisiológica (Foyer & Nector, 2000; Soares & Machado, 2007) além de outros  
19 aparatos enzimáticos. O  $H_2O_2$  é a espécie reativa de oxigênio mais estável e  
20 facilmente transportada através da membrana, no qual regula a expressão de  
21 genes de resistência, formando também ácido jasmônico, como mensageiro  
22 secundário, a partir da atividade da enzima lipídio hidroperoxidase presente na  
23 membrana plasmática (Fagerstedt et al., 2010; Stangarlin et al., 2011).

24 Ação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD),  
25 peroxidase (POX), glutiona S-transferase (GST), ascorbato peroxidase (APX) e

1 catalase (CAT) (Foyer & Nector, 2000), bem como antioxidantes não enzimáticos de  
2 baixo peso molecular como o ascorbato e a glutathiona reduzida protege a  
3 integridade das membranas contra o efeito das ROS, as quais são produzidas a  
4 taxas elevadas quando as plantas estão expostas a condições de estresse,  
5 possibilitando uma maior seletividade de certas espécies a condições ambientais  
6 adversas (Noctor & Foyer, 1998).

7 A enzima SOD é encarregada de catalisar a transformação de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  e  
8  $O_2$ . No entanto, o  $H_2O_2$  também é tóxico para as células, devendo ser eliminado  
9 através da enzima CAT e/ou POX, formando água e oxigênio (Sudhakar et al.,  
10 2001). A ascorbato e glutathiona reduzida contribuem adicionalmente na  
11 detoxificação por ROS como superóxidos e radicais hidroxila. A APX é uma das  
12 principais enzimas envolvidas na eliminação rápida de  $H_2O_2$ , por possuir alta  
13 afinidade com esta molécula, removendo-a mesmo em baixas concentrações  
14 (Mittler, 2002).

15 Baseado no exposto, a fim de melhor compreender os processos envolvidos  
16 na resistência de cultivares comerciais, contrastantes quanto ao nível de resistência,  
17 como BRS Querência, relatada como suscetíveis para mancha ocular, e Puita INTA  
18 CL, relatada como resistente para gênero *Bipolaris*, na cultura de arroz, foram  
19 avaliados os componentes de resistência, variáveis bioquímicas de mecanismos de  
20 defesa e as respostas citológicas de plantas de arroz quando inoculadas com *B.*  
21 *gigantea*.

22

23

24 **MATERIAIS E MÉTODOS**

1 O estudo foi realizado na Universidade Federal de Pelotas, nos laboratórios  
2 de patologia de sementes, de Interação Planta Patógeno e em casa de vegetação  
3 do departamento de fitossanidade FAEM/UFPel.

4

#### 5 **Delineamento experimental**

6 O estudo foi separado em dois experimentos (Figura 1). O primeiro foi  
7 utilizado para análises bioquímicas e determinação dos componentes de resistência  
8 e o segundo para análises citológicas.

9

#### 10 **Experimento 1: Análise bioquímica e componentes de resistência**

11 O delineamento experimental para a análise bioquímica foi inteiramente  
12 casualizado em esquema fatorial (2 x 2 x 2 x 3), onde os fatores avaliados foram  
13 cultivares (Puitá INTA CL (BASF S/A) e BRS Querência (EMBRAPA)), estádios  
14 fenológicos (floração (R4), e grão leitoso (R6)), inoculação das plantas (inoculadas  
15 com *B. gigantea* ou pulverizadas com água (não inoculadas)) e horas após  
16 inoculação (hai) (24, 48 e 72 horas), utilizando-se quatro repetições, sendo cada  
17 repetição representada por uma planta. Para os componentes de resistência o  
18 delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2)  
19 sendo os fatores cultivares (Puitá Inta CL e BRS Querência) e estádios fenológicos  
20 (R4 e R6) com quatro repetições.

21

#### 22 **Experimento 2: Análise citológica**

23 O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema trifatorial (2x2x7),  
24 onde os fatores avaliados foram cultivares (Puitá Inta CL e BRS Querência),  
25 estádios fenológicos (R4 e R6) e horas após inoculação (8, 12, 18, 24, 30, 36, 48 e

1 72 horas), utilizando-se quatro repetições. Para cada hora após inoculação foram  
2 avaliados, 30 sítios de infecção, de forma aleatória.

3

#### 4 **Material vegetal e cultivo**

5 As cultivares de arroz Puitá Inta CL e BRS Querência foram semeadas em  
6 datas escalonadas, com 15 dias de diferença, em baldes com capacidade de 6 litros  
7 (0,60 m comprimento x 0,38 m largura x 0,15 m profundidade), contendo  
8 aproximadamente 4,5kg de solo peneirado. Em cada balde foram depositadas seis  
9 sementes, desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1% v/v),  
10 realizando-se o desbaste após emergência, deixando-se três plantas por balde.

11 As plantas foram conduzidas em casa de vegetação até o início do ciclo  
12 reprodutivo. Posteriormente foram transferidas para salas de incubação com  
13 temperatura controlada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , permanecendo até o final da coleta dos dados.

14

#### 15 **Inoculação de plantas de arroz**

16 O Isolado LPS04 de *B. gigantea*, pertencente à coleção do laboratório de  
17 patologia de sementes/fungos fitopatogênicos, foi obtido da cultivar de arroz BRS  
18 Querência, oriunda de lavouras do município do Capão do Leão/RS.

19 O fungo foi repicado para placas com o meio de cultura V8 (carbonato de  
20 cálcio (3 g/L), suco de oito vegetais (Campbell's®, 150 mL/L), ágar (15 g/L) e água  
21 destilada) e incubado em BOD por sete dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  no escuro, metodologia  
22 realizada por Dorneles et al. (2017). Ao final dos setes dias, os esporos foram  
23 coletados em água esterilizada contendo 0,01% de Tween 20%, e a concentração  
24 ajustada para  $6 \times 10^3$  conídios/mL, determinada após testes para ajuste de  
25 concentração.



1           As plantas nos estádios de R4 e R6 foram inoculadas por meio da  
2 pulverização foliar com a suspensão de conídios de *B. gigantea* e com água  
3 destilada (controle), utilizando-se um borrifador manual (TECBLAS® 45 mL). Toda a  
4 superfície foliar das plantas foi pulverizada, sem escorrimento superficial. Após a  
5 inoculação, as plantas foram transferidas para uma câmara de nevoeiro com  
6 temperatura de  $25 \pm 3$  °C, onde permaneceram por 72h.

7

### 8 **Avaliação dos componentes de resistência à doença**

9           Para a avaliação dos componentes de resistência as plantas inoculadas com  
10 *B. gigantea*, foram marcadas em dois perfilhos por repetição, totalizando oito  
11 plantas, e avaliadas quanto ao período de incubação (PI), eficiência relativa de  
12 infecção (ERI), taxa de expansão de lesão (*r*), comprimento final de lesão (CFL),  
13 número final de lesão (NFL), área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD)  
14 e severidade final (SF) da mancha ocular, conforme a metodologia executada por  
15 Dallagnol et al. (2009).

16           O PI (horas) foi determinado pelas avaliações de plantas a cada 3 horas após  
17 a inoculação com uma lupa de bolso. Sendo o PI definido como o tempo médio para  
18 que pelo menos uma planta por repetição do tratamento tenha manifestado sintomas  
19 visíveis da doença.

20           Para avaliar a ERI (proporção, em porcentagem, de conídios inoculados que  
21 conseguem infectar e colonizar a planta) duas lamínulas (20×20 mm) por repetição  
22 de cada tratamento foram fixadas na superfície adaxial das folhas antes da  
23 inoculação, e, posteriormente, analisadas quanto ao número de conídios por  
24 lamínulas, com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Decorrido 24 horas do  
25 período de incubação, com uma lupa de bolso, verificou-se o número de lesões

1 por  $\text{cm}^2$  de área foliar, utilizando-se três amostras por folha em oito plantas por  
2 tratamento, assim sendo o ERI determinado pela relação entre o número de lesões  
3 por  $\text{cm}^2$  de área foliar e o número de conídios depositados por  $\text{cm}^2$ .

4 A  $r$  (mm) foi mensurada com base em medições de cinco lesões por  
5 folha/planta/repetição, a cada 48 horas após o PI, com o auxílio de um paquímetro  
6 eletrônico digital. Para isso, as lesões selecionadas foram identificadas  
7 numericamente permitindo a realização das mensurações nas lesões  
8 correspondentes.

9 Para determinar o CFL (mm) mensurou-se aos 23 dias após a inoculação  
10 cinco lesões, selecionadas aleatoriamente, na região central de duas  
11 folhas/planta/repetição. O NFL por  $\text{cm}^2$  foi quantificado ao final das avaliações.

12 A AACPD foi calculada usando os valores de severidade ao longo do tempo,  
13 seguindo a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977).

14 A SF (%) foi avaliada a cada 48 horas após o PI e definida como a  
15 porcentagem da área foliar afetada pela clorose e necrose resultante da infecção e  
16 colonização do patógeno, sendo utilizada a escala adaptada de *B. oryzae* proposta  
17 por Schwanck & Del Ponte (2014).

18

## 19 **Determinação de atividade enzimática e concentração de** 20 **aldeído malônico (MDA)**

21 Para as análises bioquímicas foram coletadas de uma planta por repetição,  
22 por tratamento, a folha bandeira ( $V_F$  ou R2), folha abaixo da folha bandeira ( $V_{F-1}$ ) e  
23 duas folha abaixo da folha bandeira ( $V_{F-2}$ ), (escada fenológica proposta por Counce  
24 et al. (2000)), as quais foram imediatamente congeladas em  $N_2$ , após a coleta e  
25 armazenadas em ultra freezer ( $-80^\circ\text{C}$ ) até a realização das análises.

1 Os extratos vegetais, para a quantificação das atividades enzimáticas foram  
2 obtidos conforme metodologia realizada em Dallagnol et al. (2015) com algumas  
3 modificações. Para isso, amostras de 0,5 g de tecido foliar foram maceradas em N<sub>2</sub>  
4 e posteriormente adicionou-se a solução de extração, constituída de tampão fosfato  
5 de potássio (100 mM, pH 6,8), contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (1 mM) (Sigma-  
6 Aldrich, São Paulo, Brasil) e polivinilpolipirrolidona (40 mg). O material obtido foi  
7 centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4°C, resgatando-se o sobrenadante para  
8 determinação das atividades enzimáticas.

9 A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e  
10 ascorbato peroxidase (APX) foram determinadas conforme metodologia executada  
11 por Dallagnol et al. (2015).

12 A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi  
13 determinada por meio da capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de  
14 nitrotetrazólio (NBT) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), em um meio de reação  
15 contendo 1,000 µL fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 400 µL metionina 70 mM,  
16 EDTA 10 µM, NBT 1 mM, riboflavina 0,2 µM, 390 µL água destilada e 20 µL de  
17 extrato vegetal. As leituras foram realizadas a 560 nm no espectrofotômetro. A  
18 unidade da SOD, correspondeu à quantidade da enzima capaz de inibir em 50% a  
19 fotorredução do NBT, nas condições do ensaio, sendo os resultados expressos em  
20 unidades de SOD/mg de proteína. A concentração de proteínas utilizada para o  
21 cálculo da atividade das enzimas foi obtida pelo método de Bradford, usando  
22 albumina sérica bovina como padrão.

23 A atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi definida através  
24 quantificação da degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, São Paulo,  
25 Brasil). O meio de reação foi composto por 1,500 µL do tampão fosfato de potássio

1 100 mM (pH 7,5) contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (2,5 µL/mL do tampão de reação) e 25 µL do  
2 extrato vegetal. As leituras foram realizadas a 240 nm e os resultados expressos em  
3 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradado min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

4 A atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada  
5 pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (coeficiente de extinção 2,9 mM/cm). A mistura de reação  
6 continha 1mL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 750 µL de água  
7 ultrapura, 100 µL de ácido ascórbico 10 mM, 100 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM  
8 e 50 µL do extrato. Realizando a leitura da absorbância no comprimento de onda de  
9 290 nm, durante 90 segundos, com leituras em intervalos de 7 segundos.

10 Para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),  
11 via acúmulo de aldeído malônico (MDA) conforme descrito por Heath & Packer  
12 (1968), amostras de 0,2 g de folhas foram maceradas com nitrogênio líquido,  
13 homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugadas  
14 a 12,000 rpm por 20 minutos. Para a quantificação do TBARS, alíquotas de 0,5 mL  
15 do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%  
16 (m/v) e ácido tricloroacético 10% (m/v) e incubadas a 90°C por 20 minutos. A reação  
17 foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos e a absorbância lida a 532 nm,  
18 descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. Calculou-se a concentração  
19 de MDA utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM/cm, sendo os  
20 resultados em nM/MDA/g de matéria fresca.

21

## 22 **Quantificação das células epidérmicas afetadas pelo patógeno**

23 Amostras de tecido foliar com 0,5 cm<sup>2</sup> foram coletadas das V<sub>F</sub>, V<sub>F-1</sub> e V<sub>F-2</sub> de  
24 plantas inoculadas e armazenadas em frascos de vidro contendo etanol 70%. A  
25 descoloração do tecido foi realizada em etanol fervente 90% e em seguida imersos

1 em solução de hidrato de cloral saturado (30 g/mL) (Sigma-Aldrich), por duas  
2 semanas. Cerca de 40 pedaços por tratamento, foram colocados e fixados, com o  
3 lado adaxial voltado para cima, em lâminas contendo gotas do meio de Hoyer e 10 µl  
4 do corante Trypan blue (10 g fenol, 10 mL glicerol, 10 mL ácido láctico, 0,02 g azul de  
5 tripano e 10 mL água destilada).

6 Os sítios de infecção do patógeno nas células epidérmicas foram observados  
7 através do microscópio de luz óptico Motic A200, registrados com a câmara de vídeo  
8 Sony, Modelo SSC DC 54 A acoplada ao equipamento. As imagens registradas  
9 foram utilizadas para avaliar o número total de células epidérmicas mortas e o  
10 número de células segundo a intensidade de escurecimento através do programa  
11 Motic Images Plus 2,0 ML, previamente calibrado. A intensidade do escurecimento  
12 das células epidérmicas foi dividida em três categorias: categoria 1 (C1) = células  
13 epidérmicas levemente amareladas; categoria 2 (C2) = células epidérmicas  
14 palidamente amareladas ou levemente marrom e categoria 3 (C3) = toda célula  
15 profundamente bronzeada.

16 O total de células de cada categoria foi obtido através da área total afetada  
17 dividida pela área média de uma célula (calculada a partir da área de 100 células  
18 epidérmicas), para cada cultivar e estágio. Para a veracidade dos resultados o  
19 número de células, de 30 sítios de infecção, foi comparado pelo programa (utilizando  
20 a média da área da célula) e pela contagem visual em microscópio estereoscópico.

21 O número total de células mortas por sitio de infecção foi obtido pelo  
22 somatório das categorias.

23

## 1 **Análises dos dados**

2 Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos  
3 tratamentos comparadas pelo teste de Student (teste-t) ou teste Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

4

5

## 6 **RESULTADOS**

7

### 8 **Efeito da mancha ocular nos componentes de resistência**

9 Para os componentes de resistência avaliados, não houve diferença  
10 significativa entre os fatores para o PI, que ficou entre 20hai ( $\pm 1$ ), e ERI ( $p > 0.05$ ),  
11 exceto para o CFL,  $r$ , AACPD, SF e a interação para o NFL.

12 O fator cultivar foi significativo para os componentes de resistência CFL,  $r$ ,  
13 AACPD e SF ( $p < 0.05$ ) (Tabela 1). A comparação entre as cultivares indicou que  
14 BRS Querência apresenta maior suscetibilidade à doença do que Puitá Inta CL, com  
15 um incremento de 84, 93, 93 e 96 %, para os componentes CFL,  $r$ , AACPD e SF,  
16 respectivamente.

17 Quanto ao fator estágio fenológico não houve diferença significativa para os  
18 componentes avaliados ( $p > 0.05$ ).

19 Para o NFL, a interação apresentou diferença significativa entre os fatores  
20 avaliados ( $p < 0.05$ ). Para a cv. Puitá Inta CL não houve diferença entre os estádios  
21 fenológicos. Já para a cv. BRS Querência teve um aumento de 30% no estágio R4,  
22 quando comparado com R6. Ao comparar entre as cultivares isoladamente dentro de  
23 cada estágio, foi observado um aumento de 22% para R4 e 51% para R6 para a cv.  
24 Puitá Inta CL (Tabela 2).

## 1 **Efeito da mancha ocular na ativação de enzimas**

2 A atividade das enzimas estudadas apresentou diferença significativa entre as  
3 cultivares e entre os demais fatores analisados, assim como interação entre eles  
4 (Tabela 3 e 4).

5 Plantas da cv. Puitá Inta CL, inoculadas com o fungo *B. gigantea*, no estágio  
6 de R4, tiveram um acréscimo na atividade da SOD (Figura 2C) e CAT (Figura 2G)  
7 em 40 e 27%, respectivamente, nas 24hai, quando comparadas com não  
8 inoculadas. Enquanto que, para o estágio R6, não houve nenhuma atividade  
9 enzimática, não existindo diferença entre plantas inoculadas e não inoculadas  
10 (Figura 2D, 2H e 2M).

11 Ao comparar entre os estádios fenológicos (R4 e R6), quanto a presença do  
12 patógeno, a atividade da enzima SOD teve um aumento de 49, 48 e 51% ao longo  
13 das horas após inoculação para R6 (Figura 2C e 2D) e de 23% para APX às 48hai  
14 (Figura 2L e 2M). Já a CAT teve maior atividade para o estágio R4 às 24hai (53%),  
15 48hai (45%) e 72hai (33%) (Figura 2G e 2H). Para plantas na ausência do patógeno,  
16 o comportamento enzimático foi similar, com um ganho na SOD de 55, 47 e 62% às  
17 24, 48 e 72hai, respectivamente, para o estágio R6 (Figura 2C e 2D) e 43% (24hai)  
18 e 23% (48hai), para APX (Figura 2L e 2M). Assim como, para a CAT, que teve maior  
19 atividade no estágio R4 às 24 (42%) e 48hai (39%) (Figura 2G e 2H).

20 Para plantas da cv. BRS Querência, no estágio R4, não foi observado  
21 nenhum aumento significativo na atividade das enzimas SOD, CAT e APX em  
22 plantas com e sem a inoculação do patógeno (Figura 2A, 2E e 2I). Já para plantas  
23 no estágio R6, inoculadas com o fungo, ocorreu um incremento em 32% para  
24 atividade de APX às 48hai em comparação com as não inoculadas (Figura 2J).

1            Para plantas inoculadas, comparadas entre os estádios R4 e R6, observou-se  
2 um aumento na atividade de 50, 53 e 45% de SOD (Figura 2A e 2B) e 54, 62 e 57%  
3 de APX (Figura 2I e 2J) às 24, 48 e 72hai, respectivamente, para o estádio R6.  
4 Plantas não inoculadas tiveram um incremento de 35, 57, 46 % para SOD (Figura 2A  
5 e 2B) e 44, 41 e 64% para APX (Figura 2I e 2J) ao longo das horas após inoculação.

6            Em relação ao MDA, para plantas da cv. Puitá Inta CL, durante o estádio R4,  
7 a diferença na concentração, entre inoculadas e não inoculadas foram evidenciadas  
8 somente às 72hai com um incremento de 28% (Figura 2P) na presença do  
9 patógeno. Assim como para o estádio R6, que teve um aumento de 29% às 72hai  
10 (Figura 2Q). Ao comparar entre os estádios R4 e R6, tanto plantas inoculadas como  
11 não inoculadas, não apresentaram diferença significativa nas horas após inoculação  
12 (Figura 2P e 2Q).

13            Para a cv. BRS Querência, o estádio R4, teve um aumento de 40 e 37% às  
14 48 e 72hai, respectivamente em plantas inoculadas quando comparadas com não  
15 inoculadas (Figura 2N), assim como para R6 que aumentou em 34 e 47% nas 48 e  
16 72hai (Figura 2O). Ao comparar entre os estádios R4 e R6, o MDA teve um  
17 incremento de 28% para R4 às 72hai, em plantas inoculadas e não diferenciou nos  
18 horário após inoculação em plantas não inoculadas (Figura 2N e 2O).

19

## 20 **Efeito do patógeno *B. gigantea* no número de células epidérmicas afetadas**

21            Para o número de células afetadas pelo patógeno e a intensidade de  
22 escurecimento da célula, o fator cultivar, estádio fenológico e tempos de  
23 amostragem foram significativos, bem como, algumas das suas interações ( $p <$   
24 0.05).



1           Para a avaliação das células epidérmicas afetadas pelo patógeno nos  
2 primeiros horários avaliados (8, 12 e 18hai), tanto para a cv. Puitá Inta CL como para  
3 a cv. BRS Querência, nos dois estádios fenológicos, não foi visualizada a presença  
4 de células danificadas, observando-se sobre as mesmas, esporos dando início ao  
5 processo infeccioso (esporos germinados, não germinados e germinados formando  
6 tubo germinativo).

7           Para o número total de células danificadas, de maneira geral, houve um  
8 incremento significativo ao longo das horas após inoculação, a partir as 24hai, para  
9 as duas cultivares e as duas fases de desenvolvimento (Figura 3). Para a cv. BRS  
10 Querência, as 48 e 72hai diferenciaram significativamente dos demais horários e  
11 entre elas (Figura 3A). Apresentando um acréscimo de 88% (48hai) e 95% (72hai)  
12 para o estágio R4 e 91% (48hai) e 96% (72hai), para o estágio R6, quando  
13 comparados com às 24hai e 58% e 54% às 72hai para R4 e R6, respectivamente  
14 quando comparada com às 48hai. Assim como observado para a cv. Puitá Inta CL  
15 (Figura 3B), no qual teve um acréscimo de 66% (48hai) e 87% (72hai) para R4 e  
16 66% (48hai) e 85% (72hai) para R6, em contraste com às 24hai e de 63% para R4 e  
17 57% para R6 às 72hai quando do com às 48hai. confronta

18           Ao comparar entre as cultivares (Figura 3A e 3B), a cv. BRS Querência teve  
19 60 e 71% mais células afetadas tanto no estágio R4 como R6, respectivamente, nas  
20 48 e 72hai em relação a cv. Puitá Inta CL. Já para a comparação entre os estádios  
21 (Figura 3A e 3B), tanto a cv. BRS Querência como a cv. Puitá Inta CL não  
22 apresentaram diferença em qualquer uma das horas após inoculação.

23           Quanto a intensidade de escurecimento das células das plantas, avaliados ao  
24 longo das horas após inoculação, para a cv. BRS Querência, o comportamento nos  
25 dois estádios avaliados foram similares, não diferenciando entre os números de

1 células da C1 e C3 das 24 às 48hai para o estádio R4 (Figura 4A) e das 24 às 36hai  
2 para R6 (Figura 4B), no entanto às 72hai para R4 a C3 teve uma redução de 61 e  
3 51% comparado com a C1 e C2, respectivamente (Figura 4A) e de 65% (48hai) e  
4 15% (72hai) em R6, em contraste com C1 (Figura 4B).

5 Para a cv. Puitá Inta CL a tendência entre as categorias também apresentou-  
6 se semelhantes para cada estádio (Figura 4C e 4D). Às 24hai o número de células  
7 com C3 foi maior para R4 (69%) e R6 (50%) quando contrastadas com a C1. Já para  
8 30 e 36hai não houve diferença significativa entre as categorias. Às 48hai para R4, a  
9 quantidade de células com C3 foi maior que as demais categorias (25% para C2 e  
10 40% para C1) (Figura 4C), no entanto para R6 só diferenciou da C2 (40%) (Figura  
11 4D). Às 72hai, para os dois estádios a C3 reduziu em 53 e 43% para C1 e C2,  
12 respectivamente para o estádio R4, assim como 33 e 57% em R6 (Figura 4C e 4D).

13

14

## 15 **DISCUSSÃO**

16 Os resultados apresentados neste estudo demonstram as primeiras evidências  
17 de respostas de defesa de cultivares de arroz, em dois estádios reprodutivos ao  
18 fungo *B. gigantea*, patógeno relatado nas últimas décadas causando a doença  
19 conhecida como mancha ocular na cultura do arroz no Sul do Rio Grande do Sul.

20 Como primeira resposta de defesa da planta ao patógeno, foi constatado que  
21 não houve diferença entre as cultivares em retardar o processo inicial de infecção e  
22 o surgimento dos primeiros sintomas, devido os componentes de resistência PI e  
23 ERI não apresentarem diferenças entre as cultivares utilizadas, mesmo que, em  
24 diversos estudos, estas variáveis tenham sido consideradas como fortes atributos  
25 para separar as cultivares quanto aos níveis de resistências às doenças (Seebold et

1 al., 2001; Dorneles et al., 2017). Para ambas as cultivares, o PI foi em média das  
2 20hai ( $\pm 1$ ), fato confirmado através das análises citológicas, onde observou-se o  
3 surgimento das primeiras células necrosadas às 24hai, sucedendo-se das 8 as 18  
4 hai esporos dando início ao processo de germinação, com formação do tubo  
5 germinativo e apressório.

6 No caso deste estudo, a diferença nos níveis de resistência entre as  
7 cultivares, está relacionada na capacidade das mesmas em desacelerar ou  
8 desencadear o processo de colonização do patógeno, resultando na redução ou  
9 aumento do CFL,  $r$ , NFL, AACPD e SF. Os valores contabilizados para a cv. BRS  
10 Querência, nos componentes de resistência citados, exceto para NFL, mostraram  
11 um alto nível de suscetibilidade da cultivar ao fungo *B. gigantea* quando comparada  
12 a cv. Puitá Inta CL. Fato evidenciado pela diferença obtida no valor da  $r$ , no qual  
13 refere-se ao progresso de colonização do patógeno no hospedeiro, influenciado  
14 diretamente no CFL. Trabalho desenvolvido por Dallagnol et al. (2011) observou que  
15 o maior ou menor valor de  $r$  influencia no CFL em folhas de arroz inoculadas com  
16 outra espécie do gênero *Bipolaris* patogênica a cultura.

17 Quanto ao NFL observou-se que a cv. Puitá Inta CL apresentou um maior  
18 número de lesões por  $\text{cm}^2$ , formando pequenos pontos de coloração marrom com  
19 um diminuto halo amarelado induzindo uma reação de tolerância ao patógeno. Por  
20 outro lado a cv. BRS Querência apresentou um menor número de lesões por  $\text{cm}^2$ ,  
21 justificada pelo maior tamanho da lesão (amplo halo clorótico ao redor das margens  
22 avermelhadas e centro acinzentado). Este fato nos leva a crer que mesmo com  
23 menor NFL, a cv. BRS Querência apresenta maiores danos na área fotossintética  
24 das folhas, confirmando-se pelos valores apresentados pelos demais componentes

1 de resistência (CFL,  $r$ , AACPD e SF), assim como pelo maior número de células  
2 epidérmicas danificadas.

3 Deste modo, as sumarizações dos componentes de resistências resultam na  
4 diferença da severidade final. Sendo que estes resultados podem estar relacionados  
5 com a ação das respostas de defesa física, bioquímica ou somatória de ambas da  
6 planta (Rodrigues et al., 2005; Sunder et al., 2014). As respostas bioquímicas, como:  
7 compostos secundários, fitoalexinas e ativações enzimáticas desencadeadas pela  
8 planta, são produzidos de forma a atenuar os efeitos deletérios causados pelo  
9 patógeno (Zhang et al., 2013). Enzimas oxi-redutase, como a SOD, CAT e APX são  
10 ativadas para reduzir o estresse biótico ou restringindo os processos oxidativos.

11 Neste contexto, como resposta inata das plantas de arroz para reduzir os  
12 dados de *B. gigantea*, a cv. Puitá Inta CL, nas primeiras 24hai, no estágio R4,  
13 desencadearam a ativação de enzimas como SOD e CAT. A SOD tem o papel de  
14 atuar no acúmulo de  $H_2O_2$  na célula, como um mecanismo inicial de defesa da  
15 planta ao patógeno, o qual age na rota da síntese de compostos fenólicos,  
16 aumentando o teor de lignina, reforçando a parede celular, resultando numa ação  
17 tóxica ao patógeno (Shetty et al., 2008). No entanto, quando o  $H_2O_2$  é acumulado  
18 em altas concentrações pode ocasionar danos oxidativos nas células, para isso a  
19 CAT é desencadeada como forma complementar de detoxificação, transformando o  
20  $H_2O_2$  acumulado em  $H_2O$  e  $O_2$ , ativado pela planta, para buscar o equilíbrio  
21 fisiológico celular (Igamberdiev & Lea, 2002; Mittler, 2002; Chelikani, et al., 2005; Gill  
22 & Tuteja, 2010). O  $H_2O_2$  produzido age retardando o progresso de colonização, fato  
23 evidenciado pela redução nos valores dos componentes de resistência apresentados  
24 pela cv Puita INTA CL em contraste a cv. BRS Querência.

1           No estágio R6, cv. Puitá Inta CL, não apresentou diferenças significativas  
2 entre plantas inoculadas e não inoculadas, quanto a atividade das enzimas  
3 estudadas, fato que nos leva a crer, que a resistência da cultivar a *B. gigante* possa  
4 ser resultante de outros mecanismos de defesa ou rotas enzimáticas não estudadas  
5 neste trabalho. Assim como, quanto à ineficiência do patógeno em causar doença  
6 neste genótipo.

7           Ao comparar entre os estádios infectados com *B. gigantea*, para a cv. Puitá  
8 Inta CL, podemos inferir que as plantas exibiram maior atividade de SOD das 24 às  
9 72hai e APX às 48hai, em R6, assim como para CAT em R4 ao longo das hai, nos  
10 leva a acreditar que estas enzimas atuam como antioxidantes enzimáticos para  
11 mantendo a homeostase fisiológica da célula. No entanto, plantas não inoculadas,  
12 também tiveram o mesmo comportamento enzimático relatado na presença do  
13 patógeno, levando-se a considerar que as plantas avaliadas, por estarem em  
14 diferentes fases reprodutivas, podem sofrer diferenças no seu comportamento  
15 enzimático devido a uma questão fisiológica da planta (Moro et al., 2015).

16           Para a cv. BRS Querência, no estágio R4, não foram evidenciadas diferenças  
17 na atividade das enzimas avaliadas, entre plantas inoculadas e não inoculadas, nos  
18 levando a supor, que a planta não a ativou seu mecanismo de defesa, resultando  
19 numa alta suscetibilidade da cultivar ao patógeno, evidenciados pelos componentes  
20 de resistência avaliados (CFL, *r*, NFL, SF e ABCD) e também, pela maior  
21 predisposição da planta a fungos durante este estágio, como relatado para *Bipolaris*  
22 *oryzae* (Ba & Sangchote, 2006), acreditando-se, que durante estas fase de  
23 desenvolvimento, a planta esteja com sua maquinaria voltada para o processo de  
24 fecundação para enchimento de grãos. Este resultado ainda nos leva a presumir,  
25 que isto possa ser resultado da ação de fitotoxinas secretadas pelo patógeno, o qual

1 possui a capacidade de desencadear o acúmulo de ROS levando ao colapso celular  
2 (Ciuffetti et al., 2010; Pandelova et al., 2012) resultando assim na maior severidade  
3 da cultivar.

4 Já para o estágio R6, para cv. BRS Querência, a principal resposta de defesa  
5 desencadeada foi à ativação da enzima APX às 48hai. No qual é responsável pela  
6 rápida eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, removendo-o mesmo em baixas concentrações (Mittler,  
7 2002). Acredita-se que esta enzima foi sintetizada na tentativa de eliminar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
8 gerado em consequência das táticas de parasitismo do patógeno, como fitotoxinas  
9 que almejam a ocorrência do colapso celular (Cocucci et al., 1983).

10 Estudos revelam que a principal fitotoxina encontrada em *B. gigantea*,  
11 identificada por métodos espectroscópicos e propriedades ópticas, é  
12 Ophiobolin A, um sesterterpeno fitotóxico produzido por vários fungos  
13 fitopatogênicos que é amplamente estudado por apresentar importantes  
14 atividades biológicas (Evidente et al., 2006a). Como metabolitos secundários,  
15 juntamente com Ophiobolin A, foram encontrados três Ophiobolins menores i.e.,  
16 6-*epi*-ophiobolin A, 3-anidro-6-*epi*-ophiobolin A e Ophiobolin I (Evidente et al.,  
17 2006a) e Ophiobolin E e 8-*epi*-ophiobolin J (Evidente et al., 2006b).

18 A Ophiobolin A provou ser, em média, mais fitotóxica em comparação com  
19 os outros compostos relacionados. Características estruturais, como o grupo  
20 hidroxil em C-3, a estereoquímica em C-6 e o grupo aldeído em C-7, são  
21 importantes para a fitotoxicidade do metabolito (Evidente et al., 2006a).

22 A principal diferença observada como resposta enzimática pelo hospedeiro na  
23 presença do patógeno, quando confrontado os estágios fenológicos em BRS  
24 Querência, foi um aumento de SOD e APX nas diferentes horas após inoculação,  
25 durante R6. Este evento pode ser explicado pela diferença no NFL apresentado

1 entre as fases de desenvolvimento da planta, no qual exibiu menor NFL quando  
2 comparado com R4. No entanto quanto a SF não houve diferente entre os estádios,  
3 isso nos leva a suspeitar, que mesmo havendo aumento na atividade destas  
4 enzimas associadas ao menor NFL em comparação com R4, não foi o suficiente  
5 para dismutar as ROS produzidas em situação de estresse (Wang et al., 2005,  
6 Moro et al., 2015). Contudo, assim como para a cv. Puita Inta Cl, as plantas não  
7 inoculadas, frente aos estádios, também tiveram o mesmo comportamento  
8 enzimático quando inoculadas patógeno.

9 Os danos celulares ocasionados pelo patógeno nas plantas são indicados  
10 pela concentração de MDA. Plantas infectadas com *B. gigantea* da cv. Puita Inta  
11 CL tiveram maior concentração de MDA às 72hai em R4 assim como para R6,  
12 quando comparadas com plantas não inoculadas. A cv. BRS Querência teve um  
13 aumento às 48 e 72hai nos dois estádio, quando comparado com plantas sem o  
14 patógeno. A expressão da peroxidação lipídica, para as duas cultivares, é  
15 confirmada pelo maior número de células danificadas ocasionadas pelo fungo nos  
16 referidos horários citados, assim como pela formação de halos cloróticos,  
17 correlacionados pelas C1 e C2, ao redor de células necrosadas (C3), o que  
18 ocasiona um maior CFL e conseqüentemente maior extravasamento de lipídios.

19 A diferença na concentração de MDA entre os estádios, para plantas  
20 inoculadas da cv. BRS Querência, às 72hai pode ser justificado pelo o maior NFL no  
21 estádio R4, quando comparado com R6.

22 Os resultados do presente estudo demonstram que o processo infeccioso de  
23 *B. gigantea* em arroz altera a fisiologia das folhas da cv. BRS Querência, causando  
24 principalmente danos celulares, ao nível da membrana quando comparado com a  
25 cv. Puitá Inta CL independentemente do estádio fenológico, possivelmente pela

1 ação do patógeno em desencadear o acúmulo de ROS. Já a cv. Puitá Inta CL  
2 apresenta respostas eficientes, através da ação de enzimas antioxidantes em  
3 busca de manter o equilíbrio fisiológico da célula como forma de defesa ao  
4 patógeno.

5

6

## 7 REFERÊNCIAS

- 8 Ba VV, Sangchote S (2006) Seed borne and transmission of *Bipolaris oryzae*, the  
9 causal pathogen of brown spot of rice. Kasetart Journal - Natural Science. Bangkok,  
10 40: 353-360.
- 11 Chelikani P, Ramana T, Radhakrishnan TM (2005) Catalase: a repertoire of unusual  
12 features. Indian Journal of Clinical Biochemistry 20: 131-135.
- 13 Ciuffetti LM, Manning VA, Pandelova I, Betts MF, Martinez, JP (2010) Host-selective  
14 toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-*  
15 *repentis*-wheat interaction. New Phytologist 187: 911-919.
- 16 Cocucci SM, Morgutti S, Cocucci M, Gianani L (1983) Effects of ophiobolin A on  
17 potassium permeability, transmembrane electrical potential and proton extrusion in  
18 maize roots. Plant Science Letters 32: 9-16.
- 19 Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MV, Pereira SC (2011) Deficiency in  
20 silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-  
21 *Bipolaris oryzae* interaction. Phytopathology 101: 92-104.
- 22 Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Mielli MV, Ma JF, Datnoff LE (2009) Defective active  
23 silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot.  
24 Phytopathology 99: 116-121.



- 1 Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Pascholati SF, Fortunato AA, Camargo LEA (2015)  
2 Comparison of root and foliar applications of potassium silicate in potentiating post-  
3 infection defences of melon against powdery mildew. *Plant Pathology* 64: 1085-1093.
- 4 Dorneles KR, Dallagnol LJ, Pazdiora PC, Rodrigues FA, Deuner S (2017) Silicon  
5 potentiates biochemical defense responses of wheat against tan spot. *Physiological  
6 and Molecular Plant Pathology* 97: 69-78.
- 7 Evidente A, Andolfi A, Cimmino A, Vurro M, Fracchiolla M, Charudattan R (2006a)  
8 Herbicidal potential of ophiobolins produced by *Drechslera gigantea*. *Journal of  
9 agricultural and food chemistry* 54: 1779-1783.
- 10 Evidente A, Andolfi A, Cimmino A, Vurro M, Fracchiolla M, Charudattan R, Motta A  
11 (2006b) Ophiobolin E and 8-epi-ophiobolin J produced by *Drechslera gigantea*, a  
12 potential mycoherbicide of weedy grasses. *Phytochemistry* 67: 2281-2287b.
- 13 Fagerstedt KV, Kukkola EM, Koistinen VV, Takahashi J, Marjamaa K (2010) Cell  
14 wall lignin is polymerised by class i secretable plant peroxidases in norway spruce.  
15 *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 186-194.
- 16 Foyer CF, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis regulation and  
17 signaling. *New Phytologist* 146: 359–388.
- 18 Fu J, Huang B (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the  
19 adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental  
20 and Experimental Botany* 45: 105-114.
- 21 Gara L, Locato V, Dipierro S, de Pinto MC (2010) Redox homeostasis in plants.  
22 The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory  
23 Physiology & Neurobiology* 173: 13-19.
- 24 Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in  
25 abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-

- 1 930.
- 2 Gomez JM, Hernandez JA, Jimenez A, Del Rio LA, Sevilla F (1999) Differential  
3 response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term  
4 NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research* 31: 11-18.
- 5 Hammond-Kosack K, Jones JD (2000) Responses to plant pathogens. *Biochemistry  
6 and molecular biology of plants* 1: 1102-1156.
- 7 Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and  
8 stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 125:  
9 189-198.
- 10 Igamberdiev AU, Lea PJ (2002) The role of peroxisomes in the integration of  
11 metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. *Phytochemistry*  
12 60:651-674.
- 13 Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant  
14 Science* 7: 405-410.
- 15 Moro AL, Broetto F, Moro E (2015) Respostas antioxidativas, fisiológicas e produtiva  
16 de arroz cultivado sob deficiência hídrica e adubação silicatada. *Semina: Ciências  
17 Agrárias, Londrina*. 36: 3013-3028.
- 18 Munne-Bosch S, Alegre L (2002) Plant aging increases oxidative stress in  
19 chloroplasts. *Planta* 214: 608–615.
- 20 Nunes CDM (2008) Ocorrência das doenças: mal-do-pe (*Gaeumannomyces  
21 graminis*) e mancha-parda (*Drechslera* sp.) na cultura do arroz. Embrapa CPATB,  
22 Circular técnica 205.
- 23 Pandelova I, Figueroa M, Wilhelm LJ, Manning VA, Mankaney AN, Mockler TC,  
24 Ciuffetti LM (2012) Host-selective toxins of *Pyrenophora tritici-repentis* induce  
25 common responses associated with host susceptibility. *Plos One* 7: 16-25.

- 1 Rodrigues FA, Jurick WM, Datnoff LE, Jones JB, Rollins JA (2005) Silicon influences  
2 cytological and molecular events in compatible and incompatible rice *Magnaporthe*  
3 *grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 144-159.
- 4 Schwanck AA, Del Ponte EM (2014) Accuracy and reliability of severity estimates  
5 using linear or logarithmic disease diagram sets in true colour or black and white: a  
6 study case for rice brown spot. *Journal of Phytopathology*, 162: 670-682.
- 7 Seebold KW, Kucharek TA, Datnoff LA, Correa-Victoria FJ, Marchetti MA (2001) The  
8 influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially  
9 resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology* 91: 63-9.
- 10 Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of  
11 slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
- 12 Shetty NP, Jorgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB, Shetty HS (2008) Roles of  
13 reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European*  
14 *Journal of Plant Pathology* 121: 267-280.
- 15 Soares MAS, Machado OLT (2007) Defesa de plantas: sinalização química e  
16 espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* 1:  
17 11-19.
- 18 SOSBAI. Arroz Irrigado: Recomendações da pesquisa para o Sul do Brasil.  
19 Pelotas: SOSBAI, 2016.
- 20 Stangarlin JR, Kuhn OJ, Toledo MV, Portz RL, Pascholati SF (2011) A defesa  
21 vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis* 10: 18-46.
- 22 Sunder S, Singh R, Agarwal RASHMI (2014) Brown spot of rice: an overview. *Indian*  
23 *Phytopathology* 67: 201-215
- 24 Tullis EC (1935) Histological studies of rice leaves infected with *Helminthosporium*  
25 *oryzae*. *Journal of Agricultural Research* 50: 82–90

- 1 Wang FZ, Wang QB, Kwon SY, Kwak SS, Su WA (2005) Enhanced drought  
2 tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide  
3 dismutase. *Journal of plant physiology* 162: 465-472.
- 4 Xiao JZ, Tsuda M, Doke N, Nishimura S (1991) Phytotoxins produced by germinating  
5 spores of *Bipolaris oryzae*. *Phytopathology* 81:58–64
- 6 Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M (2013) The genetic and molecular basis of plant  
7 resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics* 40: 23–35

1 **Tabela 1** - Taxa de expansão de lesão ( $r$ ), comprimento final de lesão (CFL), área  
 2 abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e severidade final (SF) de  
 3 plantas de arroz das cultivares BRS Querência e Puitá Inta CL quando inoculadas  
 4 com *Bipolaris gigantea*. UFPel, Pelotas, RS, 2017.

<b>Cultivar</b>	<b><math>r</math> (mm)</b>	<b>CFL (mm)</b>	<b>AACPD</b>	<b>SF (%)</b>
<b>BRS Querência</b>	1,70 A	13,68 A	101,9 A	12,0 A
<b>Puitá Inta CL</b>	0,11 B	2,20 B	7,01 B	0,48 B
<b>CV %</b>	34,05	35,56	13,43	31,90

5 Médias de cada variável seguida pela mesma letra maiúscula na linha não diferem  
 6 entre si pelo teste  $t$  ( $p < 0,05$ ).

- 1 **Tabela 2** - Número final de lesão (NFL) de plantas de arroz das cultivares BRS  
 2 Querência e Puitá Inta CL nos estádios de floração (R4) e grão leitoso (R6) quando  
 3 inoculadas com *Bipolaris gigantea*. UFPel, Pelotas, RS, 2017.

Cultivares	NFL	
	R4	R6
<b>BRS Querência</b>	2,66 Ba	1,87 Bb
<b>Puitá Inta CL</b>	3,41 Aa	3,83 Aa
<b>CV%</b>	20,19	

- 4 Médias de cada variável seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e  
 5 minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de  $t$  ( $p \leq 0,05$ ).

1 **Tabela 3** – Análise da variância na comparação da atividade da enzima superóxido  
 2 dismutases (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e concentração de  
 3 aldeído malônico (MDA) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRs  
 4 Querência e Puitá Inta CL nos estádios fenológicos de floração (R4) e grão leitoso  
 5 (R6) inoculadas ou não com *Bipolaris gigantea* nos diferentes tempos após a  
 6 inoculação (hai). UFPel, Pelotas, RS, 2017.

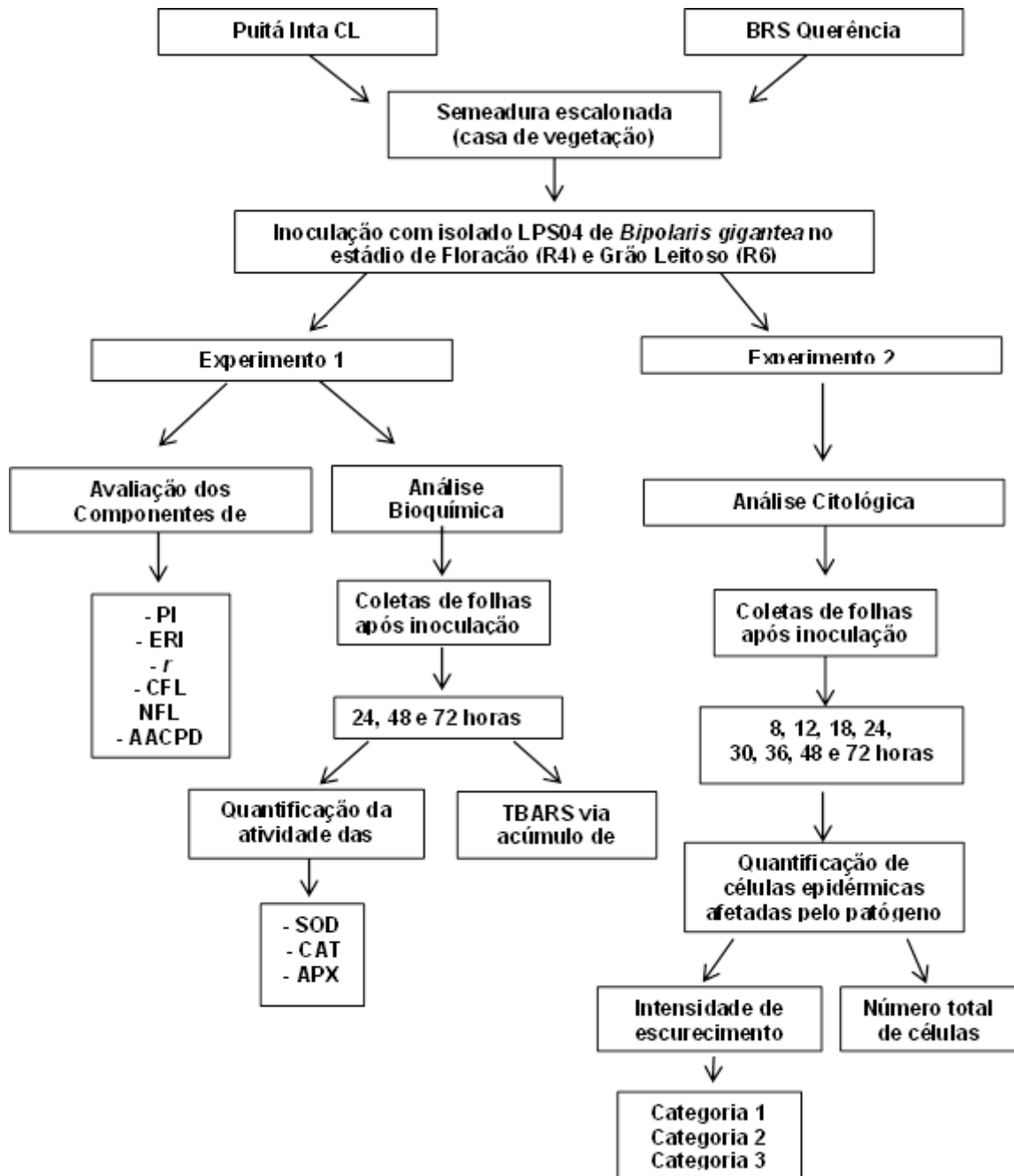
Fatores	Valores de p-valor			
	SOD	CAT	APX	MDA
<b>Cultivar (F1)</b>	<,0001*	0,0004*	<,0001*	0,1903 <sup>ns</sup>
<b>Estádio (F2)</b>	<,0001*	<,0001*	<,0001*	0,0096*
<b>Inoculação (F3)</b>	0,0176*	0,0021*	0,3117 <sup>ns</sup>	0,0364*
<b>Tempos (F4)</b>	0,0220*	0,0055*	0,0008*	0,6597 <sup>ns</sup>
<b>F1 x F2</b>	0,0183*	<,0001*	<,0001*	<,0001*
<b>F1 x F3</b>	0,0822 <sup>ns</sup>	0,5599 <sup>ns</sup>	0,5767 <sup>ns</sup>	0,0810 <sup>ns</sup>
<b>F1 x F4</b>	0,1740 <sup>ns</sup>	0,2237 <sup>ns</sup>	0,0259*	0,0162*
<b>F2 x F3</b>	0,1715 <sup>ns</sup>	0,2102 <sup>ns</sup>	0,0095*	0,9443 <sup>ns</sup>
<b>F2 x F4</b>	0,2414 <sup>ns</sup>	0,1283 <sup>ns</sup>	0,0118*	0,0007*
<b>F3 x F4</b>	0,0549*	0,7249 <sup>ns</sup>	<,0001*	0,0084*
<b>F1 x 2 x 3</b>	0,9412 <sup>ns</sup>	0,3212 <sup>ns</sup>	0,0002*	0,4946 <sup>ns</sup>
<b>F1 x 2 x 4</b>	0,0751 <sup>ns</sup>	0,5300 <sup>ns</sup>	0,0017*	0,0159*
<b>F1 x 3 x 4</b>	0,6526 <sup>ns</sup>	0,5693 <sup>ns</sup>	<,0001*	0,1932 <sup>ns</sup>
<b>F2 x 3 x 4</b>	0,2681 <sup>ns</sup>	0,3799 <sup>ns</sup>	0,0092*	0,3855 <sup>ns</sup>
<b>F1 x 2 x 3 x 4</b>	0,2081 <sup>ns</sup>	0,9976 <sup>ns</sup>	0,1141 <sup>ns</sup>	0,2810 <sup>ns</sup>
<b>CV %</b>	<b>21,63</b>	<b>22,56</b>	<b>19,01</b>	<b>23,47</b>

7

1 **Tabela 4** - P-valores do teste t da atividade da enzima superóxido dismutases  
 2 (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e concentração de aldeído  
 3 malônico (MDA) no tecido foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Querência  
 4 (Q) e Puitá Inta CL (P) nos estádios fenológicos de floração (R4) e grão leitoso (R6)  
 5 inoculadas (I) ou não inoculadas (NI) com *Bipolaris gigantea*, nos diferentes  
 6 horários após inoculação. UFPel, Pelotas, RS, 2017.

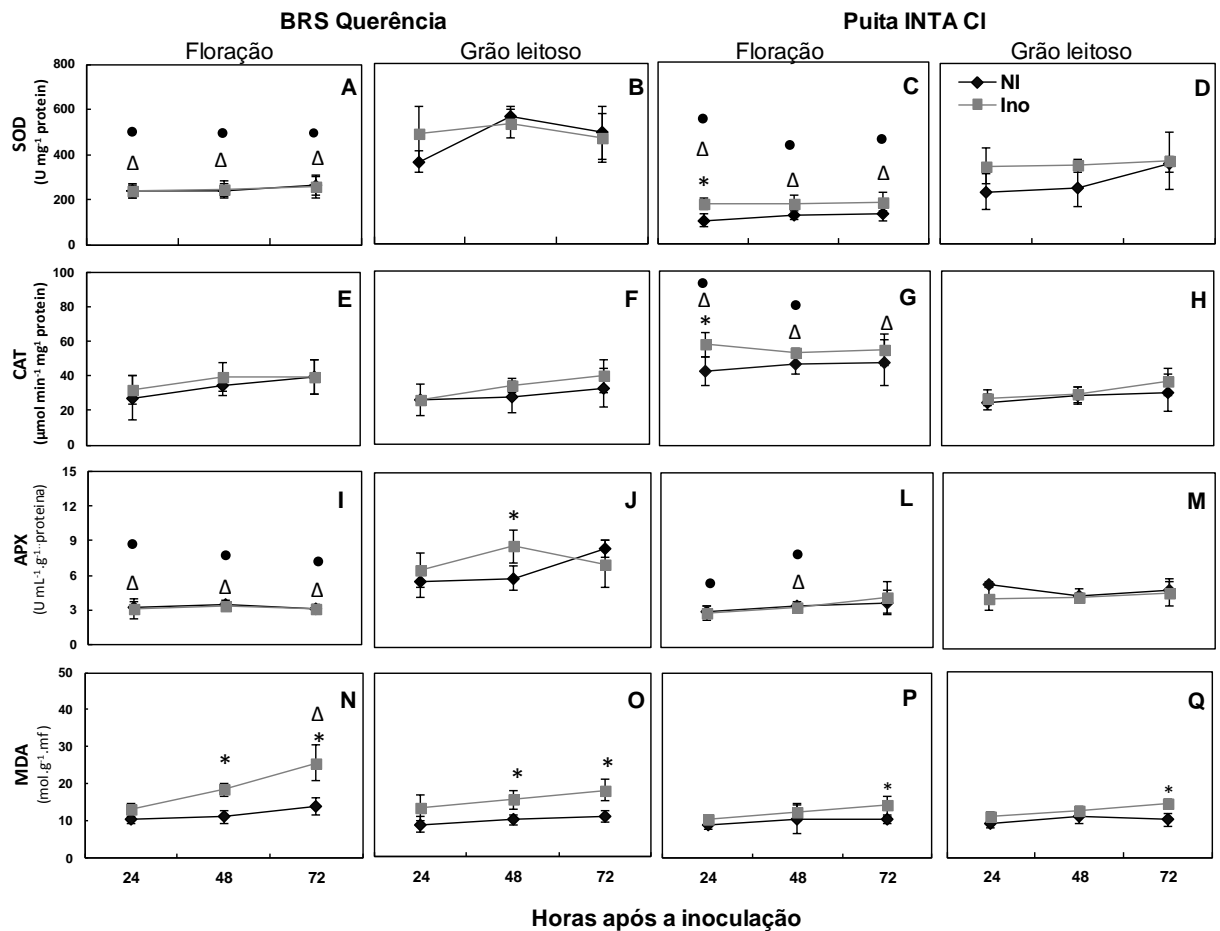
			P-valor					
Tratamento			SOD			CAT		
			24	48	72	24	48	72
Floração	QxP	I	<b>0.0178</b>	<b>0.0288</b>	0.0826	<b>0.0079</b>	<b>0.0204</b>	0.1458
Grão leitoso	QxP	I	0.0903	<b>0.0021</b>	0.3408	0.7263	0.1754	0.6840
Floração	QxP	NI	<b>0.0006</b>	<b>0.0012</b>	<b>0.0021</b>	0.0940	<b>0.0261</b>	0.3791
Grão leitoso	QxP	NI	<b>0.0481</b>	<b>0.0021</b>	0.0617	0.7970	0.7770	0.7990
			APX			MDA		
Floração	QxP	I	0.8196	0.7243	0.1247	<b>0.0028</b>	0.6561	0.1468
Grão leitoso	QxP	I	<b>0.0495</b>	<b>0.0021</b>	0.0904	0.2603	0.2191	0.0588
Floração	QxP	NI	0.7637	0.9713	0.2155	<b>0.0001</b>	0.8569	<b>0.0090</b>
Grão leitoso	QxP	NI	0.7764	<b>0.0491</b>	<b>0.0039</b>	<b>0.0363</b>	<b>0.0080</b>	<b>0.0009</b>



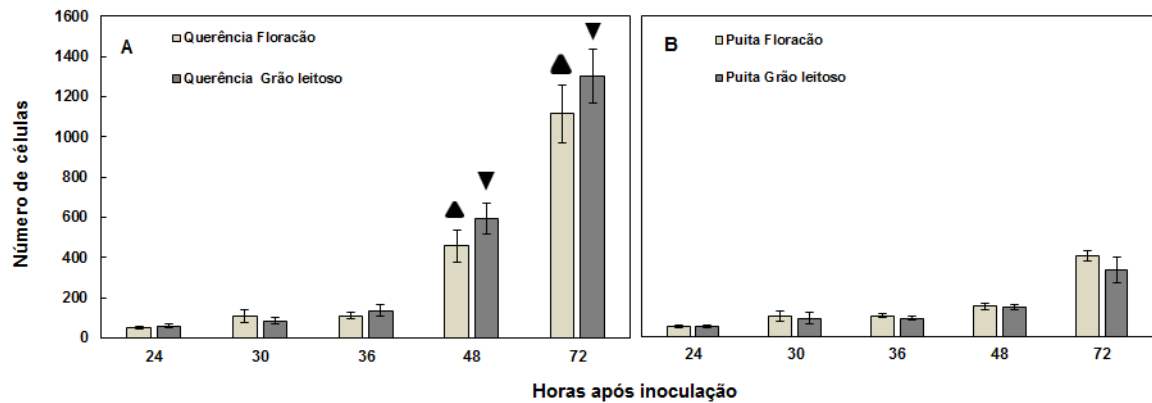


1

2 **Figura 1** - Fluxograma da metodologia utilizada nos experimentos. PI: período de  
 3 incubação, ERI: eficiência relativa de infecção,  $r$ : taxa de expansão de lesão, CFL:  
 4 comprimento final de lesão, NFL: número final de lesão, AACPD: área abaixo da  
 5 curva do progresso da doença, SF: severidade final, SOD: superóxido dismutase,  
 6 CAT: catalase, APX: ascorbato peroxidase, TBARS: substâncias reativas ao ácido  
 7 tiobarbitúrico, MDA: aldeído malônico. UFPel, Pelotas, RS, 2017.



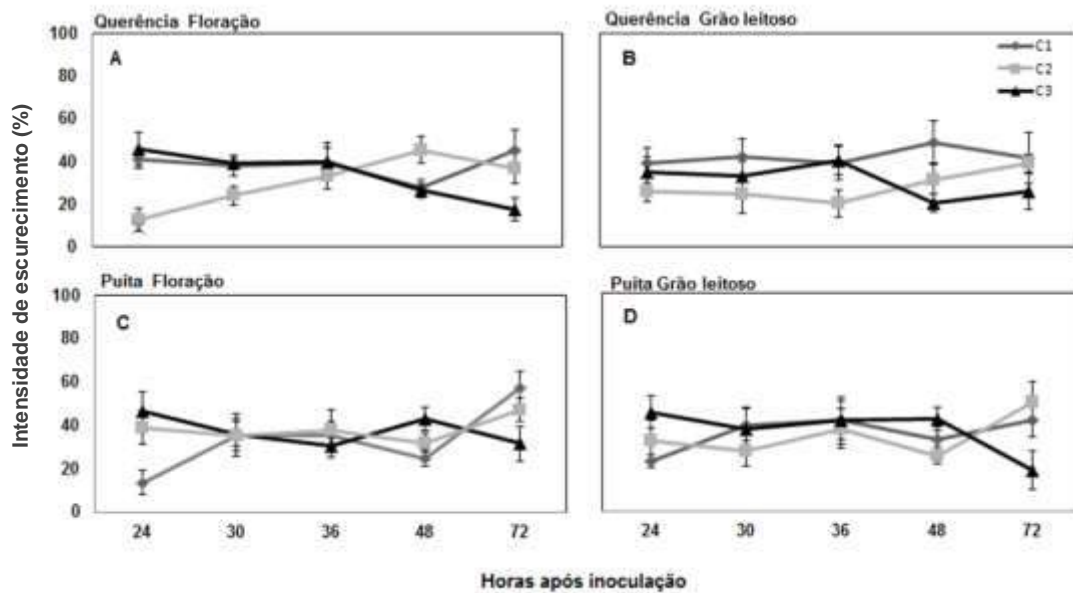
1  
 2 **Figura 2** - Atividade da enzima superóxido dismutases (SOD) (A; B; C e D), catalase  
 3 (CAT) (E; F; G e H), ascorbato peroxidase (APX) (I; J; K e L) e concentração de  
 4 aldeído malônico (MDA) (M; N; O e P) no tecido foliar de plantas de arroz das  
 5 cultivares BRS Querência e Puitá Inta CL nos estádios fenológicos de floração (R4)  
 6 e grão leitoso (R6) a qual foram (linha clara) ou não inoculadas (linha escura) com  
 7 *Bipolaris gigantea*. Barras representam o desvio padrão da média. (\*) Representa  
 8 diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) pelo teste t, quando comparado plantas não  
 9 inoculadas e inoculadas para o mesmo tratamento. (Δ) Representa diferença  
 10 significativa ( $p \leq 0.05$ ) pelo teste t quando comparado plantas inoculadas em  
 11 floração (R4) e grão leitoso (R6). (●) Representa diferença significativa ( $p \leq 0.05$ )  
 12 pelo teste t entre plantas não inoculadas em floração (R4) e grão leitoso (R6).  
 13 UFPel, Pelotas, RS, 2017.



1

2 **Figura 3** - Número de células epidérmicas afetadas nos sítios de infecção de  
3 *Bipolaris gigantea* em folhas de arroz das cultivares BRS Querência (A) e Puitá Inta  
4 CL (B) no estágio de floração (cor clara) e grão leitoso (cor escura). Barras  
5 representam o desvio padrão da média. (\*) Representa diferença significativa ( $p \leq$   
6 0.05) pelo teste t, quando comparado plantas em floração e grão leitoso para a  
7 mesma cultivar. (▲) Representa diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) pelo teste t,  
8 quando comparado as cultivares em floração. (▼) Representa diferença  
9 significativa ( $p \leq 0.05$ ) pelo teste t, quando comparado as cultivares em grão leitoso.

10 UFPel, Pelotas, RS, 2017.



1

2 **Figura 4** - Intensidade de escurecimento das células epidérmicas nos sítios de  
3 infecção de *Bipolaris gigantea* em folhas de arroz das cultivares BRS Querência (A  
4 e B) e Puitá Inta CL (C e D) nos estádios de floração (A e C) e grão leitoso (B e D).  
5 Categoria 1 (C1) = parede celular das células epidérmicas levemente amarelada;  
6 Categoria 2 (C2)= parede celular da epiderme células palidamente amareladas ou  
7 levemente marrom; e Categoria 3 (C3)= células inteiras-epidérmica bronzeado  
8 profundamente, com as células adjacentes, mostrando parede celular levemente  
9 dourado. UFPel, Pelotas, RS, 2017.

## Conclusões

Características morfológicas não são suficientes para separar gêneros em alguns grupos de patógenos, como para o complexo de fungos *helminthosporium*.

O uso de técnicas moleculares é importante para a correta taxonomia.

Esclarece a correta taxonomia do agente causal da mancha ocular do arroz causada por *Bipolaris gigantea*.

A cv. BRS Querência é suscetível a *Bipolaris gigantea*, causando danos celulares, pela ação do patógeno em desencadear o acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

A cv. Puitá Inta CL é resistente porque ativa respostas de defesa com a ação de enzimas antioxidantes para manter o equilíbrio fisiológico da célula.

## Referências

AHN, S.W. Eyespot of rice in Colombia, Panama, and Peru. **Plant Disease**, v. 64, n. 9, p. 878-880, 1980.

ALCORN, J. L. The taxonomy of " Helminthosporium" species. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, n. 1, p. 37-56, 1988.

ALCORN, J. L. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. **Mycotaxon**, v. 17, p. 1-86, 1983.

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

BERBEE, M. L.; CARMEAN, D. A.; WINKA, K. Ribosomal DNA and resolution of branching order among the ascomycota: how many nucleotides are enough?. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 17, n. 3, p. 337-344, 2000.

CHOWDHURY, A. K; GARAIN, P. K.; MUKHERJEE, S.; DUTTA, S.; BHATTACHARYA, P. M.; SINGH, D. P.; GYANENDRA, S.. Zonate eyespot of wheat—a new report. **Journal of Mycopathological Research**, v. 43, n. 1, p. 139-140, 2005.

CONAB. **Arroz, safra 2015 - 2016**. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9graos\\_08.09.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9graos_08.09.pdf). Acessado em 02 de maio de 2017.

DRECHSLER, C. Phytopathological and taxonomic aspects of *Ophiobolus*, *Pyrenophora*, *Helminthosporium*, and a new genus, *Cochliobolus*. **Phytopathology**. v.16, n.9, p. 953-983, 1934.

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

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Cultivo de Arroz irrigado: Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005 (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 57)

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.

- 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 *Drechslera teres* isolates. **Genetics and molecular biology**, v. 25, n. 2, p. 235-241, 2002.
- GAMBA, F.; TEKAUZ, A. Report of a leaf Spot of Barley caused by *Drechslera gigantea* in Uruguay. **Plant Disease**, v.87, n.1, p.99, 2003.
- 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.
- GOMEZ, J.M.; HERNANDEZ, J. A.; JIMENEZ, A.; DEL RIO, L. A.; SEVILLA, F. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. **Free Radical Research**, v. 31, n. sup1, p. 11-18, 1999.
- GRAY, S. F. **A natural arrangement of British plants**. 1821.
- GUO, Z. F.; OU, W. Z.; LU, S. Y.; 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.
- GULART, C.; MADALOSSO, M. G; DEBORTOLI, M. P; MANTELLI, J. *Drechslera gigantea* (*Pyrenophora gigantea*), agente causal da mancha zonada, em lavouras de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. **Phytus Técnica**, ed. 07. 2015. 4p.
- HEALD. F. D.; WOLF. F. A. New species of Texas fungi. **Mycologia**. v.3, p. 5-22, 1911.
- ISAKEIT, T.; COMMER, B.; SHAW, B. D.; BROWN, M.; NEELY, C. First Report of Leaf Spot of Barley Caused by *Drechslera gigantea* in the United States. **Plant Disease** , p. PDIS-03-17-0406-PDN, 2017.
- 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.
- KARDIN. M. K.; BOWDEN. R. L.; PERCICH. J. A.; NICKELSON. L. J. Zonate eyespot on wild rice caused by *Drechslera gigantea*. **Plant Disease**. v.66, p.737-739, 1982.
- 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 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, 261-267, 2001.

LEE, I. M.; HAMMOND, R. W.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN, D. E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, v. 83, n. 8, p. 834-842, 1993.

LINK, J. H. F. Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio **Ima Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin, Magazine**, v.3, p.3-42, 1809.

LINK, J. H. F. (1824). Species *Hyphomycetum et Gymnomycetum*. In: Species Plantarum (Linne C, ed). G.C. **Nauk, Germany**, p.1-33, 1824.

LUTTRELL, E. S. Taxonomic criteria in *Helminthosporium*. **Mycologia**, v. 55, n. 5, p. 643-674, 1963.

MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A. Y.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W., MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. The genus *Bipolaris*. **Studies in mycology**, v. 79, p. 221-288, 2014.

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

MEREDITH, D. S. Further observations on the zonate eyespot fungus *Drechslera gigantea* in Jamaica. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 201-207, 1963.

MESQUITA, A. G. G.; PAULA JR, T. J.; MOREIRA, M. A.; DE BARROS, E. G. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the aid of PCR-based molecular markers. **Plant Disease**, v. 82, n. 10, p. 1084-1087, 1998.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MORSY, M. R.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; HOFFMANN, L.; STEWART, J. M. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 2, p. 157-167, 2007.

MULLER, M. V. G.; GERMANI, J. C.; VAN DER SAND, S.T. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. **Genetics and molecular biology**, v.4, n.4, p. 642-652, 2005.

NASCIMENTO, E. J. M. ; VAN DER SAND, S. T. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 647-652, 2008.

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.



NUNES, C. D. M. Ocorrência das doenças: mal-do-pé (*Gaeumannomyces graminis*) e mancha-parda (*Drechslera* sp.) na cultura do arroz. **Embrapa Clima Temperado. Comunicado técnico**, 2008.

OLIVEIRA, A. M. R.; MATSUMURA, A. T.; PRESTES, A. M.; VAN DER SAND, S. T. Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random-amplified polymorphic DNA (RAPD). **Genetics Molecular Research**, v. 1, n. 4, p. 350-358, 2002.

OLIVIER, C.; LORIA, R. Detection of *Helminthosporium solani* from soil and plant tissue with species-specific PCR primers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, n. 2, p. 235-241, 1998.

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

PERSOON, C.H. *Helminthosporium*. **Mycologia Europea**, v.1, p. 1-56, 1822.

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. **Genetics and molecular biology**, v. 25, n. 2, p. 243-250, 2002.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Wallingford, UK: **CAB International Mycological Institute**, 1987. 261p.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, 2016, 200p.

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.

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.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR - PROTOCOLS. A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS.** Academic Press. San Diego – California. p. 315- 22. 1990.

ZHANG, G.; BERBEE, M. L. *Pyrenophora phylogenetics* inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, v. 93, n. 6, p. 1048-1063, 2001.

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