

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



**Dissertação**

**Influência da compatibilidade sexual e vegetativa na variabilidade morfológica,  
fisiológica e agressividade de populações de *Bipolaris oryzae***

**Victoria Moreira-Nuñez**

**Pelotas, 2017**

**Victoria Moreira-Nuñez**  
Engenheira Agrônoma

**Influência da compatibilidade sexual e vegetativa na variabilidade morfológica,  
fisiológica e agressividade de populações de *Bipolaris oryzae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (Área de conhecimento: Fitopatologia).

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

Co-orientadora: Danielle Ribeiro de Barros

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M835i Moreira-Nuñez, Victoria

Influência da compatibilidade sexual e vegetativa na variabilidade morfológica, fisiológica e agressividade de populações de *Bipolaris oryzae* / Victoria Moreira-Nuñez ; Candida Renata Jacobsen de Farias, orientadora ; Danielle Ribeiro de Barros, coorientadora. — Pelotas, 2017.

106 f. : il.

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

1. *Oryza sativa*. 2. Mancha parda. 3. Reprodução sexual. 4. Anastomose de hifas. 5. Populações segregantes. I. Farias, Candida Renata Jacobsen de, orient. II. Barros, Danielle Ribeiro de, coorient. III. Título.

CDD : 633.18

Victoria Moreira-Nuñez

**Influência da compatibilidade sexual e vegetativa na variabilidade morfológica, fisiológica e agressividade de populações de *Bipolaris oryzae***

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28 de Julho de 2017

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cândida Renata Jacobsen de Farias (Orientadora)  
Professora, Fitopatologia, Universidade Federal de Pelotas, RS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Ribeiro de Barros  
Professora, Fitopatologia, Universidade Federal de Pelotas, RS

---

Dr. Ismail Teodoro Souza Junior  
Ph.D. Fitopatologia, Universidade Federal de Pelotas, RS

---

Dr. Cley Donizeti Martins Nunes  
Pesquisador, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Dedico este trabalho a meus pais Estela Nuñez e Antonio Moreira, irmã Carolina Moreira, e minha sobrinha Isabella Martinez, pelo amor incondicional, por sempre estar e ser minha estimulação para poder chegar a esta etapa da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a vida por me brindar com esta grande oportunidade, e por colocar pessoas muito valiosas no meu caminho, fazendo com que seja mais fácil alcançar meus objetivos neste desafio aqui no Brasil.

À minha família, por seu amor, carinho e apoio incondicional. Aos meus pais Estela Nuñez e Antonio Moreira, a minha irmã Carolina Moreira, e minha sobrinha Isabella, por sempre estar em os momentos que precisei, e me darem forças para seguir adiante e poder cumprir minhas metas nesta vida. Muito obrigada!

A Dra. Cândida Jacobsen de Farias quem desde o primeiro dia me proporcionou esta grande oportunidade, por ter me guiado, por ser sempre tão compressiva, por sua paciência e pelos ensinamento e contribuição na minha formação pessoal e profissional.

A Dra. Danielle Barros pelo apoio, o ensino e sua contribuição na minha formação pessoal e profissional.

A Rosaria Azambuja Machado, por todo seu ensino, por seu auxílio sempre, por sua paciência e por ser esta grande pessoa que admiro muito. Muito obrigada!

Os meus grandes amigos do Laboratório Patologia de Sementes que se tornaram minha família, fazendo que meus dias fossem mais felizes, e que por me acompanharam em todos momentos, Priscila Rossatto Meneses, Viviana Gaviria, Vanessa Goncalves, Wellington Rodrigues, Caliandra Bernardi e Gisele Zobot. Adorei trabalhar e compartilhar todo este tempo com vocês, obrigada pela paciência, amizade, pelo carinho e por tornar meus dias de trabalho e estudo mais alegres! Sem dúvida eu cheguei a esta instância em grande parte graças a vocês!!

Aos estagiários pela ajuda nos trabalhos Jessica Ullrich Tavares e Ligiani Simões.

A meus amigos e colegas da Fitopatologia por sua amizade, apoio, carinho e auxílio prestado, Renata Moccellin, Monique Nascimento, Carol Neves, Silvia Maich, Johan Murcia, Julia Pelegrineli, Bruna Rohirg, Mauricio Sangiogo, Ismail Souza, Keilor Dorneles, Paulo Pazdiora, Juan Felipe Rivera, Alfonso.

A Maximiliano Dini, por me incentivar a fazer o mestrado no Brasil, e por me apoiar sempre que precisei, Muito obrigada!

Ao programa de Pós graduação em Fitossanidade, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) que me permitiu realizar o metrado e À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Muito obrigada a todos e a todas estas pessoas maravilhosa que conheci, que de alguma forma contribuíram na minha formação profissional e principalmente pessoal. Sou muito agradecida por conhecer pessoas como vocês que sem dúvida fizeram que minha experiência no Brasil fosse inesquecível, com muito aprendizado e grandes experiências vividas.

MUCHAS GRACIAS!

*“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu  
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”*

Ana Vilela



## Resumo

MOREIRA-NUÑEZ, Victoria. **Influência da compatibilidade sexual e vegetativa na variabilidade morfológica, fisiologia e agressividade de populações de *Bipolaris oryzae***. 2017. 106f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Entre as principais doenças que afetam a cultura do arroz, a mancha parda, causada por *Bipolaris oryzae* destaca-se em importância, sendo mencionada nos últimos anos entre as doenças mais frequentes nas regiões produtoras do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Este patógeno se caracteriza por apresentar alta variabilidade, tanto na morfologia como na agressividade. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo estudar o comportamento de populações segregantes de *B. oryzae* após reprodução sexuada e anastomose de hifas, quanto as características morfológicas, fisiológicas e de agressividade, comparando-as com os seus respectivos genitores. Os genitores utilizados foram provenientes de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Foram avaliados 11 genitores e 48 isolados descendentes da reprodução sexual para as características morfológicas, e 5 genitores e 30 descendentes para a agressividade em sementes e plântulas e atividades enzimáticas. Para anastomose de hifas foram utilizados 10 genitores e 13 descendentes em avaliações da compatibilidade vegetativa, características morfológicas e agressividade em sementes. Foi observado nas populações segregantes tanto da fase sexuada como da anastomose de hifas, uma elevada variabilidade quanto as características morfológicas das colônias, principalmente na coloração, além de variação nas dimensões dos conídios e crescimento micelial. Para a compatibilidade vegetativa, observou-se que a partir de 55 cruzamentos apenas 13% foram compatíveis vegetativamente, 9% mostraram-se incompatíveis e os demais foram parcialmente compatíveis. Os resultados do ensaio de agressividade mostraram variação no índice da doença e na taxa de transmissão, tanto nas sementes como nas plântulas para ambos descendentes. A atividade enzimática para as progênies descendentes da reprodução sexuada apresentaram variações na produção das enzimas amilase, celulase e pectinase, porém não tiveram atividade para esterase e protease. Para todas as variáveis analisadas verificou-se que as progênies apresentaram valores inferiores, intermediário ou superiores aos seus respectivos genitores, para ambos tipos de reprodução. Desta maneira, pode-se inferir que a reprodução sexuada e a anastomose de hifas podem gerar novos indivíduos com características diferentes, com possibilidades de resistentes as condições desfavoráveis.

**Palavras-chave:** *Oryzae sativa*, mancha parda, reprodução sexual, anastomose de hifas, populações segregantes.

## Abstract

MOREIRA-NUÑEZ, Victoria. **Influence of sexual and vegetative compatibility on the morphological variability, physiology and aggressiveness of populations of *Bipolaris oryzae*** 2017. 106p. Dissertation (Master Degree in Phytosanitary) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Among the major diseases that affect rice cultivation, the brown spot caused by *Bipolaris oryzae* has been noteworthy, being mentioned in recent years among the most frequent diseases present in the producing regions of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. This pathogen is characterized by its high variability in both morphology and aggressiveness. Thus, this study aimed to study the behavior of segregating populations of *B. oryzae* after sexual reproduction and anastomosis of hyphae, as well as morphological, physiological and aggressive characteristics, comparing them with their respective parents. The parents used were from different regions of Rio Grande do Sul. Eleven parents and forty-eight descendants of the sexual reproduction were evaluated for the morphological characteristics, five genitors, and thirty descendants for the characteristics of aggressiveness in seeds and seedlings and enzymatic activities. In addition, for anastomosis of hyphae, ten parents and thirteen descendants were used for evaluations of vegetative compatibility, morphological characteristics and aggressiveness in seeds. It was observed that the segregating populations of both sexual phase and anastomosis of hyphae, a high variability as the morphological characteristics of the colonies, mainly in the coloration, as in the dimensions of conidia and mycelial growth. For vegetative compatibility, it was observed that from fifty-five crosses between the different isolates, 13% were compatible vegetatively, 9% were incompatible, and the others were partially compatible. The results of aggressiveness tests showed variation in disease index and in the rate of transmission in both seeds and seedlings for both offspring. The enzymatic activity for the progenies descended from the sexual reproduction showed variations in the production of the enzymes amylase, cellulase and pectinase, but they did not present activity for esterase and protease. For all the analyzed variables, it was verified that the progenies had inferior values, intermediate or superior comparing to their respective parents, for both types of reproduction. Therefore, it can be inferred that the sexual reproduction and anastomosis of hyphae can generate new individuals with different characteristics, with possibilities them resistant to unfavorable conditions.

**Key-words:** *Oryzae sativa*, brown spot, sexual reproduction, hyphae anastomosis, segregating populations.

## Lista de Figuras

### Capítulo 1. Características morfológicas em populações segregantes de *Bipolaris oryzae*

<b>Figura 1</b>	Substrato utilizado (papel mata-borrão, folhas de <i>Typha</i> sp. e papel filtro esterilizados) para a obtenção da fase sexuada de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	23
<b>Figura 2</b>	<i>Cochliobolus miyabeanus</i> (anamórfico <i>Bipolaris oryzae</i> ).....	24
<b>Figura 3</b>	Histogramas de distribuição de frequência relativa para o índice de crescimento micelial (ICM) nas populações dos cruzamentos de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	27
<b>Figura 4</b>	Coloniais com 10 dias de crescimento dos genitores e de suas progênies em cada população.....	31
<b>Figura 5</b>	Dendrogramas representando a dissimilaridade morfológica entre os genótipos das progênies e genitores <i>Bipolaris oryzae</i> avaliados obtidos pelo método agrupamento UPGMA, utilizando a distância Euclidiana média com base as características macroscópicas das colônias (cor, forma, elevação, margem e presença de setores) .....	33
<b>Figura 6</b>	Histogramas de distribuição de frequência relativa para a esporulação (esporos x10 <sup>4</sup> / ml) nas progênies dos cruzamentos de <i>Bipolaris oryzae</i> . Setas indicam o valor médio dos genitores...	37

### Capítulo 2. Variabilidade na agressividade e na fisiológica de populações segregantes de *Bipolaris oryzae*

<b>Figura 7</b>	Sintomas de populações genitoras e segregantes de <i>Bipolaris oryzae</i> observados na transmissão semente-plântula de arroz na cultivar BRS Sinuelo CL, segundo a escala de severidade proposta por Cardoso (2012).....	51
<b>Figura 8</b>	Lesões de <i>Bipolaris oryzae</i> em folhas de arroz do cultivar BRS Sinuelo CL.....	51
<b>Figura 9</b>	Halos produzidos por hidrólise dos substratos pelas enzimas.....	55
<b>Figura 10</b>	Relação Halo/Colônia dos genitores e população segregantes para atividade de amilase. ....	56
<b>Figura 11</b>	Relação Halo/Colônia dos genitores e população segregantes para atividade de celulose.....	58
<b>Figura 12</b>	Relação Halo/Colônia dos genitores e população segregantes para atividade de pectinase.....	59

<b>Figura 13</b>	Médias de relação H/C por progênie (genitores e progênies segregantes) para cada enzima.....	60
------------------	--	----

**Capítulo 3. Variabilidade morfológica e agressividade em indivíduos descendentes de *Bipolaris oryzae* a partir da anastomose de hifas.**

<b>Figura 14</b>	Compatibilidade vegetativa entre os isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	70
<b>Figura 15</b>	Anastomose de hifas do tipo H entre os isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	71
<b>Figura 16</b>	Conídios de genitores e descendentes de <i>Bipolaris oryzae</i> após anastomose de hifas.....	76
<b>Figura 17</b>	Crescimento micelial médio ao longo dos dias por genitores e indivíduo produzido a partir dos cruzamentos compatíveis de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	77
<b>Figura 18</b>	Classificação das colônias quanto ao crescimento micelial.....	79
<b>Figura 19</b>	Sintomas observados segundo a escala de severidade de Cardoso (2012).....	81

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1. Características morfológicas em populações segregantes de *Bipolaris oryzae*

<b>Tabela 1</b>	Isolados massais utilizados no experimento, segundo a cultivar hospedeira, região e município.....	22
<b>Tabela 2</b>	Relação dos isolados e similaridades, com os códigos de acesso ao GenBank, resultantes da comparação com sequências parciais da região ITS e com o gene GPD.....	22
<b>Tabela 3</b>	Número de população, isolado compatíveis e número de indivíduo obtidos a partir dos cruzamentos de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	24
<b>Tabela 4</b>	Características morfológicas das colônias dos genitores e suas progênes de populações segregadas por cruzamentos dos genitores de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	29
<b>Tabela 5</b>	Comprimento, largura e número de septos médio, mínimos e máximos dos genitores e suas progênes de populações segregadas por cruzamentos dos genitores de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	34

### Capítulo 2. Variabilidade na agressividade e na fisiológica de populações segregantes de *Bipolaris oryzae*

<b>Tabela 6</b>	Isolados massais utilizados no experimento, segundo a cultivar hospedeiro, região, município de coleta.....	43
<b>Tabela 7</b>	Isolado compatíveis e número de indivíduo obtidos a partir dos cruzamentos de <i>Bipolaris oryzae</i> utilizados.....	44
<b>Tabela 8</b>	Índice de doença (ID) e taxa de transmissão (TT) para os genitores e população segregantes de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	49
<b>Tabela 9</b>	Porcentagem de incidência aos 2 e 6 dias após inoculação (d.a.i.) e severidade (%) aos 6 d.a.i. segundo escala para os genitores e população segregantes.....	53

### Capítulo 3. Variabilidade morfológica e agressividade em indivíduos descendentes de *Bipolaris oryzae* a partir da anastomose de hifas.

<b>Tabela 10</b>	Isolados utilizados no experimento, segundo a cultivar, região e município.....	65
<b>Tabela 11</b>	Compatibilidade vegetativa dos isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	70
<b>Tabela 12</b>	Grupos de compatibilidade vegetativa entre diferentes isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	72

<b>Tabela 13</b>	Características morfológicas das colônias dos genitores e suas progênes a partir de anastomose de hifas de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	73
<b>Tabela 14</b>	Comprimento, largura e número de septos médio, máximo e mínimos, e índice de crescimento micelial (ICM) dos genitores e descendentes de cruzamentos compatíveis vegetativamente de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	75
<b>Tabela 15</b>	Crescimento micelial e classificação dos isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	79
<b>Tabela 16</b>	Índice de crescimento micelial (ICM), Crescimento micelial (CM) aos cinco dias, Esporulação (Esp), Índice de doença (ID) e Taxa de transmissão (TT) segundo os genitores e indivíduos descendentes.....	80

## Sumario

<b>1. Introdução Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Capítulo 1. Características morfológicas em populações segregantes de <i>Bipolaris oryzae</i>.....</b>	<b>20</b>
2.1. Introdução.....	20
2.2. Materiais e métodos.....	22
2.3. Resultados e discussão.....	25
2.4. Conclusões.....	40
<b>3. Capítulo 2. Variabilidade na agressividade e na fisiológica de populações segregantes de <i>Bipolaris oryzae</i>.....</b>	<b>41</b>
3.1. Introdução.....	41
3.2. Materiais e métodos.....	43
3.2.1. Obtenção da população segregantes de <i>Cochliobolus miyabeanus</i> ...	44
3.2.2. Avaliação da agressividade de isolados genitores e segregantes de <i>B. oryzae</i> .....	45
3.2.3. Produção de enzimas extracelulares de isolados genitores e segregantes de <i>B. oryzae</i> .....	47
3.3. Resultados e discussão.....	48
3.3.1. Avaliação da agressividade de isolados genitores e segregantes de <i>B. oryzae</i> .....	48
3.3.2. Produção de enzimas extracelulares de isolados genitores e segregantes de <i>B. oryzae</i> .....	54
3.4. Conclusões.....	62
<b>4. Capítulo 3. Variabilidade morfológica e agressividade em indivíduos descendentes de <i>Bipolaris oryzae</i> a partir da anastomose de hifas.....</b>	<b>63</b>
4.1. Introdução.....	63
4.2. Materiais e métodos.....	65

4.2.1. Avaliação da compatibilidade vegetativa entre isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	65
4.2.2. Obtenção dos indivíduos descendentes de <i>B. oryzae</i> obtida a partir de compatibilidade vegetativa.....	66
4.2.3. Avaliação morfológica das colônias, crescimento micelial e esporulação.....	67
4.2.4. Avaliação da agressividade dos genitores e indivíduos descendentes.....	68
4.3. Resultados e discussão.....	69
4.3.1. Avaliação da compatibilidade vegetativa entre isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	69
4.3.2. Avaliação morfológica das colônias e crescimento micelial dos genitores e descendentes.....	72
4.3.3. Avaliação da agressividade dos genitores e descendentes de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	79
4.4. Conclusões.....	84
<b>5. Considerações finais.....</b>	<b>85</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>86</b>
<b>Apêndices.....</b>	<b>98</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>101</b>



## Introdução geral

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo responsável por suprir as calorias e proteínas necessárias na dieta básica (AZAMBUJA; VERNETTI; MAGALHAES, 2004). É cultivado e consumido em todos os continentes, destacando-se por sua produção e área de cultivo, desempenhando um papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto no social. (PEREIRA; BANDEIRA; FREIRE, 2005; EPAGRI, 2013).

No mundo, o arroz é o terceiro grão mais cultivado, sendo superado apenas pela soja e milho. Anualmente são cultivados aproximadamente 165 milhões de hectares, produzindo 740 milhões de toneladas, sendo cerca de 75% desta produção oriunda do sistema de cultivo irrigado (FAOSTAT, 2014). A China é o maior produtor com 208 milhões de toneladas, seguida pela Índia (157 milhões de toneladas) e Indonésia (71 milhões de toneladas) (FAOSTAT, 2014).

O Brasil ocupa o nono lugar na produção mundial de arroz, com 10,8 milhões de toneladas, em uma área de 1.448 mil hectares de área plantada em sistema irrigado, ocupando o terceiro lugar em área cultivada com culturas anuais, depois da soja e trigo (FAOSTAT, 2014; CONAB, 2017). A região sul é responsável por mais do 81% da produção nacional, onde 71% concentra-se no Rio Grande do Sul com 8,7 milhões de toneladas, seguido do estado Santa Catarina com 1,5 milhão de tonelada e Paraná com 160 mil toneladas (CONAB, 2017).

O arroz durante todo o seu ciclo de cultivo é afetado por diversas doenças que reduzem a qualidade dos grãos, tornando-se um fator limitante na produtividade da cultura (SANTOS; RABELO, 2008). Entre as doenças ocasionadas por fungos, a mancha parda, causada por *Bipolaris oryzae* (Shum.) Subr. & Jain, destaca-se numa posição economicamente importante devido a susceptibilidade da maioria das cultivares em uso, sendo mencionado nos últimos anos como a doença mais frequente nas regiões produtoras do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (FUNCK; KEMPF, 2008). Os sintomas nas folhas são manchas ovaladas com centro escuro, circundadas com um halo castanho-amarelado, o qual pode ocasionar manchas dos grãos (FARIAS, 2011). O número de grãos por inflorescência e seu peso podem ser reduzidos até um 30%, podendo ocorrer redução da produtividade de até 74% (MOLETTI; GIUDICI; VILLA, 1997; MALAVOLTA et al., 2002; MOURA et al. 2014).

Nas sementes, destaca-se como o principal patógeno (AMARAL et al., 1985; CELMER et al., 2007; RODRIGUES et al. 2011), sendo sua principal fonte de inoculo, ocorrendo nos estágios iniciais da cultura, atuando como meio de sobrevivência e disseminação (BARLARDIN, 2003; NUNES; RIBEIRO; TERRES, 2004; FUNCK; KEMPF, 2008; LOBO et al., 2014). Em condições favoráveis à doença causa redução na germinação das sementes, queima ou morte das plântulas e redução na produtividade quando incide na folha bandeira e nas panículas (MALAVOLTA et al., 2002).

Uma característica típica deste gênero é a elevada variabilidade existente entre isolados, evidenciadas tanto por aspectos morfológicos e fisiológicos assim como também pela agressividade (SOUSA; RIBEIRO; GALLI, 1984; BEDENDO; PRABHU, 2005, SAFARI; ANVARI, 2010). A variabilidade é explicada devida ao grande número de núcleos presente nas células das hifas e conídios o qual proporciona heterocariose. Também pela ocorrência de processos como mutações, possibilidade de diploides e haploides recombinantes através do ciclo parasexual, muitas vezes evidenciada pela presença de setores nas colônias, assim como também pela reprodução sexual (AZEVEDO, 1976; VIEGAS, 1989; CAMARGO, 1995; GLASS et al., 2000; MCDONALD; LINDE, 2002).

Os fungos que se reproduzem de forma sexual, na maioria dos casos, encontram-se entre os que apresentam maior variabilidade genética, além de dar origem a novos genótipos e a seus genitores em diferentes características, embora várias similaridades permaneçam mantidas. (MICHEREFF, 2013). Segundo Galbieri e Urashima (2008), a existência da fase sexual é importante, devido a maior capacidade de gerar diversidade genética, e conseqüentemente apresentar importância direta nas medidas de controle da doença. Porém este tipo de reprodução ainda não foi descrito, nem para 20% das espécies de fungos identificadas (CARLILE et al., 2001; NI et al., 2011).

Para *B. oryzae* o principal mecanismo de propagação é a reprodução assexuada, uma vez que a reprodução sexuada no Brasil ainda não foi relatada em condições naturais, somente em *in vitro*, no qual foi observado a formação da fase meiospórica de diferentes espécies de *Bipolaris* spp. provenientes de lavouras rizícolas do estado Rio Grande do Sul (FARIAS et al., 2007).

A fase telomórfica segundo Farias (2011) de espécies de *Bipolaris*, apresentam características heterotáticas e homotáticas secundárias. No primeiro caso, a reprodução sexuada só ocorre entre indivíduos pertencentes a grupos diferentes, já no sistema homotático pode ocorrer por autofecundação, dando origem à formação de pseudotécios com ascas e ascósporos. Isto indica que em condições favoráveis e em presença de espécies compatíveis *in vitro* a fase sexuada poderá ocorrer, assim não descartando-se a possibilidade da ocorrência dessa fase em condições naturais.

Além do ciclo sexual, a anastomose de hifas, ou seja fusão entre hifas de talos opostos (compatíveis), possibilita a troca do conteúdo celular entre indivíduos diferentes, podendo ocorrer recombinação entre cromossomos homólogos nas divisões mitóticas de núcleos diploides na qual podem gerar novas variantes genéticas, aumentando a variabilidade em fungos (KRNJAJA et al., 2013). Quando a fusão dá-se entre hifas de organismo diferentes, há a formação de um heterocário, ou seja, um único talo contendo dois ou mais núcleos de organismos geneticamente distintos (GLASS et al, 2000, ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Nos fungos filamentosos, a formação de heterocário está relacionada aos processos de recombinações parassexuais e sexuais, sendo uma característica bastante comum. Porém, este mecanismo pode não ocorrer, devido a incompatibilidade vegetativa ou somática, formando uma barreira entre cruzamentos de organismos semelhantes geneticamente (GLASS et al., 2000).

Análise de compatibilidade somática é um método simples de reconhecer genótipos em fungos, onde por meio de confrontamentos de isolados em placas observa-se a compatibilidade, mediante um contínuo crescimento micelial, indicando que ambos isolados pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (GCV), (RODRIGUEZ-GUERRA et al., 2003; POLONI et al., 2009).

Existem várias pesquisas sobre a existência de GCV em diferentes espécies de fungos como por exemplo em *Verticillium dahliae* (STRAUSBAUGH et al., 2016); *Monilinia frutícola* (DE CAL et al., 2014), *Bipolaris sorokiniana* (ARABI; JAWHAR, 2007; POLONI et al., 2008), *Colletotrichum* spp. (RODRIGUEZ-GUERRA et al., 2003), *Fusarium oxysporum* (RODRIGUEZ-MOLINA et al., 2013).

Os eventos, ciclo sexual e anastomose, podem gerar indivíduos morfológica e fisiologicamente diferentes de seus descendentes. Apesar inexistam estudos de como estes mecanismos influenciam na variabilidade para *B.*

*oryzae*, relatos em outros patossistema demonstram que em populações segregantes após uma reprodução sexual podem ter suas características alteradas, como foi observado em *Bremia lactucae* (MICHELMORE; INGRAM, 1981), *Phytophthora infestans* (GAVINO et al., 2000), *P. capsici* (BI et al.; 2014) ficando evidenciado a importância da fase telomórfica na epidemiologia e na geração de novos fenótipos. Estudos Também afirmam a capacidade de gerar novas variantes genéticas a partir da anastomose de hifas e segregação do ciclo parasexual, como em *Colletotrichum lindemutthianum* (RODRIGUEZ-GUERRA et al., 2003) e *C. acutatum* (FRANCO et al.; 2011).

Além disso, estes mecanismos podem levar alterações na fisiologia, podendo ser evidenciada a partir da produção de enzimas. Assim métodos que avaliem a produção de diferentes enzimas também podem fornecer informação da variabilidade fisiologia em relação a capacidade dos isolados em degradar ou não determinadas enzimas, como amilase, celulase, pectinase, protease e esterase. Juntos com estes métodos à avaliação de agressividade, tanto em sementes inoculadas como em plântulas, pode ajudar a inferir sobre a variabilidade patogênica em fungos.

Entender a variação e a diversidade da população de *B. oryzae*, assim como os mecanismos que influenciam as alterações morfológicas, fisiológicas e da agressividade na geração de novos indivíduos a partir dos mecanismos como reprodução sexuada e de anastomose de hifas, que são de grande importância na sua compreensão de como ocorrem , pois podem auxiliar nas estratégias de controle da doença.

Assim esses estudos são necessários, pois espécies deste gênero são reportadas na literatura como um dos principais agentes causais de inúmeras doenças de varias culturas de expressão econômica para o Brasil.

Desta forma o objetivo deste estudo é estudar o comportamento de populações segregantes de *B. oryzae* após passar pela fase sexuada e por anastomose de hifas quanto as características fisiológicas, genéticas e de virulência, comparando-as com os seus respectivos genitores.

## 2. Capítulo I

### Características morfológicas em populações segregantes de *Bipolaris oryzae*

#### 2.1. Introdução

A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) está sujeita ao ataque de várias doenças, as quais podem prejudicar a produtividade e a qualidade dos grãos colhidos. No Rio Grande do Sul a mancha parda, causada por *Bipolaris oryzae* e de ocorrência comum e frequente na cultura (SOSBAI, 2014).

Os sintomas típicos desta doença são lesões marrons circulares a ovais, rodeadas por uma margem marrom avermelhada que podem manifestar-se no coleóptilo, nas bainhas das folhas e principalmente nas laminas das folhas, glumelas e grãos (BOREM; RANGEL, 2015).

O principal meio de sobrevivência e disseminação de *B. oryzae* são as sementes, nas quais quando associado podem apresentar menor poder germinativo e causar a morte de plântulas. Nas lavouras, sementes infectadas, podem reduzir o estande inicial de plântulas, além de provocar danos na ordem de 12 a 30% no peso de grãos (GOPALAKRISHNAN et al., 2010; BOREM; RANGEL, 2015).

O patógeno, *B. oryzae*, tem como principal mecanismo de propagação a reprodução assexuada, visto que a existência da reprodução sexuada em condições naturais no Brasil ainda não foi relatada, porém não descarta-se a possibilidade da ocorrência da fase meiospórica já que, em condições *in vitro*, a mesma foi observada em diferentes espécies de *Bipolaris* provenientes do mesmo campo de produção do estado Rio Grande do Sul (FARIAS et al., 2007; FARIAS et al., 2011).

A fase anamórfica é caracterizada pela formação de conídios levemente curvos, mais largos no centro e gradativamente mais finos em direção às extremidades, com 6 a 14 septos transversos, medindo em largura e comprimento 11 a 17µm e 35 a 170µm, respectivamente. Quando maduros, possuem coloração marrom e frequentemente germinam através das células apical e basal. O número de núcleos presentes em cada célula do conídio pode variar de 1-14, sendo mais

comumente encontradas células binucleadas (SIVANESAN, 1987; WEBSTER; GUNNEL, 1992; OLIVEIRA et al., 2004).

A fase teleomórfica (*Cochliobolus miyabeanus*) apresenta pseudotécios de cor marrom escuro, globosos a elípticos, 360-780µm de diâmetro com a parede exterior marrom escuro. As ascas são bitunicadas, de forma clavadas, cilíndricas, levemente curvadas, medem de 140-235 x 21-26µm, contendo em média 1-8 ascósporos por asca. Os ascósporos são hialinos ou verdes azeitona pálida, filiformes, com 8-12 septos, medem 235-648 x 4-9µm e são rodeados por uma bainha mucilaginosa de forma heleicoidal, enrolados nos ascos (OU, 1985; HANLIN, 1990; WEBSTER; GUNNEL, 1992).

Segundo Farias (2007) a compatibilidade sexual de espécies de *Bipolaris* spp. no Sul do Brasil apresenta características heterotáticas e heterotáticas secundárias, quando isolados monospóricos crescem de forma pareada. Por tanto nesta condição a possibilidade da ocorrência da fase teleomórfica só ocorrerá devido à eventual presença de isolados sexualmente compatíveis em uma mesma lavoura. Indivíduos produzidos por um processo sexual são diferentes um do outro e de seus genitores em diferentes características, embora várias similaridades sejam mantidas. Esta reprodução, geralmente apresentam maior variabilidade fitopatogênica, dando origem a novos indivíduos que com melhor adaptação às condições adversas (KAUFMANN; WELDEMANN, 1996; CARLILE et al., 2001).

Existem evidências de que *B. oryzae* apresenta alta variabilidade morfológica, em relação à cor da colônia, padrão de crescimento micelial, produção de esporos, e comprimento e largura dos conídios (CASA-COILA, 2008; KUMAR et al., 2011; KUMAR et al., 2016), porém na literatura nacional inexistem trabalhos sobre a caracterização da variabilidade quanto à morfologia de populações segregantes deste patógeno (CASA-COILA, 2008).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e estudar o comportamento de populações segregantes de *B. oryzae*, após passar pela fase sexuada, em relação a aspectos morfológicos comparando com os seus respectivos genitores.

## 2.2. Materiais e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (FAEM-UFPe), no Município de Capão do Leão- RS.

Os isolados (genitores) utilizados para os cruzamentos foram provenientes da coleção do Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos, FAEM-UFPe. Tendo como origem as diferentes regiões produtoras de arroz do Rio Grande do Sul (Tabela 1). Sendo os isolados identificados a partir do sequenciamento da região ITS e GPD, para isso a extração do DNA total dos isolados foi realizada conforme descrito por Doyle e Doyle (1991, Anexo 1) e comparadas com sequências disponíveis no GenBank (Tabela 2).

**Tabela 1.** Isolados massais utilizados no experimento, segundo a cultivar hospedeira, região e município.

Isolado	Cultivar	Região*	Município
LPS05	Irga 424	Campanha	Dom Pedrito
LPS06	Irga 424	Zona Sul	Pelotas
LPS07	Irga 424	Costa interna	Camaquã
LPS08	Irga 424	Depressão central	Santo Antônio da Patrulha
LPS09	BRS Querência	Costa externa	Cachoeira do Sul
LPS10	Puita Inta CL	Planície Costeira Interna	Tapes

\*segundo regiões estabelecidas pelo Instituto Rio Grande de Arroz (IRGA).

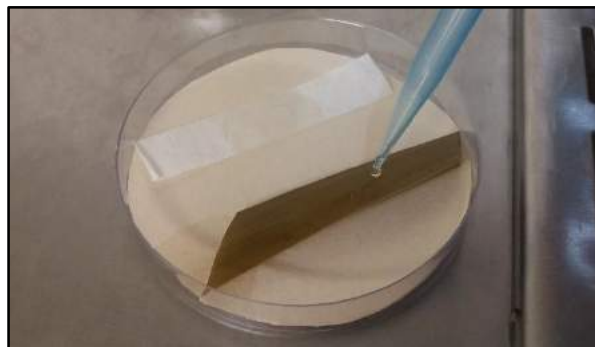
**Tabela 2.** Relação dos isolados e similaridades, com os códigos de acesso ao GenBank, resultantes da comparação com sequências parciais da região ITS e com o gene GPD FAEM, UFPe, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Similaridade com <i>B. oryzae</i> (%)		Acesso	
	ITS	GPD	ITS	GPD
LPS05	94,0	94,0	HF934932	KF688971
LPS06	97,0	94,0	KU499544	KX344513
LPS07	92,0	94,0	KU715189	JF521648
LPS08	83,0	100,0	HF934932	XM007701
LPS09	99,0	94,0	HQ116408	KX344513
LPS10	96,0	94,0	JN943398	KF688971
LPS11	97,0	90,0	HF934932	KF688971
LPS12	98,0	94,0	DQ300199	KX594830
LPS13	99,0	87,0	KU499546	AY277280
LPS14	95,0	96,0	KU499546	KX344512
LPS15	96,0	95,0	KX452455	AF081381
LPS16	99,0	92,0	KU499546	KC333442
LPS17	98,0	98,0	KT900951	KM042894
LPS18	99,0	96,0	KU499545	KX835137
LPS19	96,0	93,0	KF725804	KX835137

Foram realizados cinco monospóricos a partir da seleção massal dos isolados. Para a obtenção dos monospóricos foi feita uma suspensão de conídios com água destilada estéril, na qual 100µL de cada isolado foi transferido e espalhado sobre a superfície, utilizando meio de cultura ágar-água em placas de Petri. Após, com auxílio de um microscópio estereoscópico e de um estilete, um único esporo foi retirado e colocado em placas com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em sala de crescimento a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Em seguida, foi realizado o pareamento entre os isolados para a obtenção da fase sexuada, onde discos de micélio das bordas das colônias de dois isolados monospóricos foram mergulhados em tubos com água destilada esterilizada formando suspensões de esporos. Logo, a suspensão foi vertida em placas de Petri contendo como substratos papel mata-borrão e sobre esse, folhas de *Typha* sp. e papel filtro, esterilizados (Figura 1).

Foram testadas todas as combinações possíveis, 5 x 5 (5 locais x 5 monospórico) incluindo os cruzamentos entre o mesmo isolado, sendo um total de 75 cruzamentos possíveis. Três placas por cruzamento foram utilizadas, sendo incubadas em sala crescimento a  $23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas luz por um período de aproximadamente 30 dias, ou até o aparecimento dos pseudotécios (FARIAS et al., 2011).



**Figura 1.** Substrato utilizado (papel mata-borrão, folhas de *Typha* sp. e papel filtro esterilizados) para a obtenção da fase sexuada de *Bipolaris oryzae*.

Passado o período de incubação as placas foram cuidadosamente examinadas em microscópio estereoscópico, verificando-se a presença dos pseudotécios. Os mesmos, quando presentes, foram retirados do papel com auxílio de estilete e transferido para lâminas, contendo 10µL de água destilada autoclavada e macerados para liberação das ascas e ascósporos (Figura 2). Estes foram transferidos, com



auxílio de um microscópio estereoscópico e estilete, para placas contendo meio de cultura BDA e incubados em sala crescimento a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas luz por um período de 14 dias, para obtenção novamente da fase assexuada.



**Figura 2.** *Cochliobolus miyabeanus* (anamórfico *Bipolaris oryzae*). A- Pseudotecio, B- ascas com ascósporas, C- ascóspora.

A partir dos diferentes cruzamentos entre os isolados foi obtido seis casais compatíveis, com um total de 48 indivíduos descendentes (Tabela 3) os quais foram usados para as avaliações do presente estudo.

**Tabela 3.** Número de população, isolado compatíveis e número de indivíduo obtidos a partir dos cruzamentos de *Bipolaris oryzae*

Número	Isolado compatíveis	Número de indivíduos
População 1	LPS010.1 x LPS07.3*	4
População 2	LPS07.1 x LPS05.3	6
População 3	LPS07.2x LPS05.1	8
População 4	LPS010.4x LPS07.4	8
População 5	LPS08.1 x LPS09.2	10
População 6	LPS06.1 x LPS07.4	12

\*Número depois do ponto indica o número de monospóricos utilizado

Para avaliar a variabilidade gerada a partir da reprodução sexuada os genitores e as populações segregantes foram caracterizados quanto o crescimento micelial, morfologia (macroscópicas das colônias e microscópicas dos conídios) e esporulação.

Para análise da morfologia macroscópica e do crescimento micelial, colocou-se um disco (5mm) de micélio no centro de cada placa contendo meio BDA, em seguida as placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 12 horas.

Para o crescimento micelial, as avaliações foram efetuadas diariamente até o sétimo dia, levando-se em consideração a média de dois diâmetros ortogonais das

colônias em desenvolvimento. Foi avaliado o índice de crescimento micelial (ICM) a partir da fórmula:

$$\text{ICM} = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_7}{N_1 + N_2 + \dots + N_7}$$

Onde: ICM= índice de crescimento micelial; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>7</sub> = crescimento das colônias na primeira, segunda e última avaliação; N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> e N<sub>7</sub> número de dias (Rey et al., 2009).

As características macroscópicas avaliadas nas colônias foram, a forma, a margem e a elevação de acordo com a chave descrita por Microbiology Society, (2016) (Anexo 2), cor predominante da colônia com auxílio da escala de Mussel e presença de setores.

Para a avaliação das características microscópicas dos conídios, primeiramente foram realizadas lâminas microscópicas, contendo fragmentos do fungo e, com ajuda de um microscópio óptico foram capturadas fotos. Estas, posteriormente foram analisadas com auxílio do software Motic Images Plus 2.0 (2010), onde foram realizadas as medições de comprimento e largura dos conídios, contagem do número de septos, de 20 esporos para cada isolado.

Para avaliação da esporulação, cinco discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados maneira igual para todas as colônias e colocados em tubos de ensaio com 5mL de água estéril autoclavada e agitados por 5 segundos em agitador. Posteriormente, as suspensões foram retiradas para a contagem de esporos com auxílio da câmara de Neubauer.

A partir dos dados de ICM e esporulação foram construídas histogramas de distribuições de frequência para conhecer o comportamento das populações do patógeno. As características macroscópicas foram avaliadas por meio de análises multivariadas, através do método de agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetical Average*), foi utilizado como medida de dissimilaridade à distância euclidiana média, e o ajuste entre a matriz de distâncias e a matriz de agrupamento foram estimados pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC).

### 2.3. Resultados e discussão

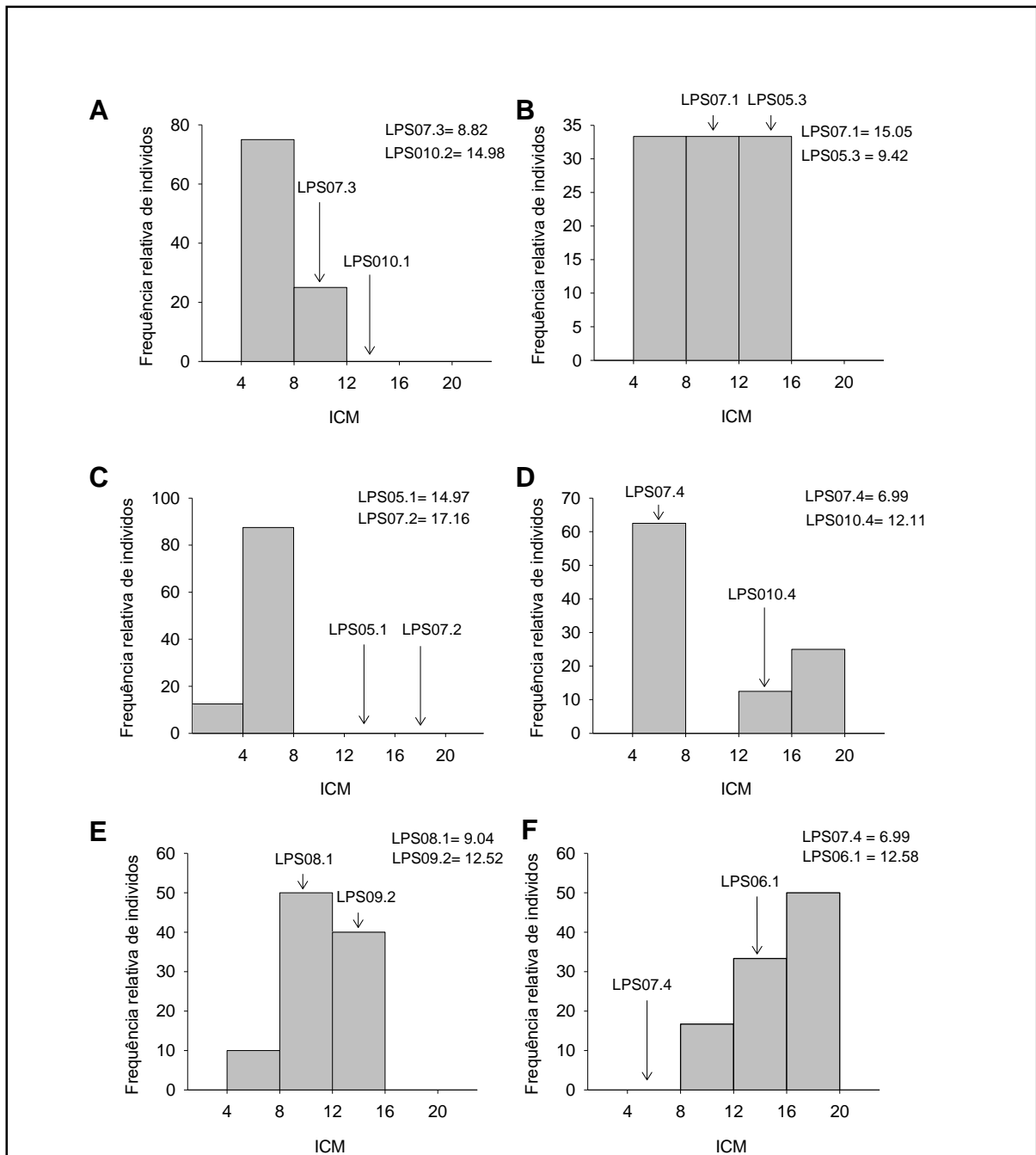
Em relação ao ICM pode-se observar nos gráficos de distribuição de frequência a variabilidade das populações comparado com seus genitores (Figura 3). Nota-se

uma segregação transgressiva, isto é, indivíduos com valores mais extremos que qualquer um dos genitores (Figura 3).

Na população 1, quase 80% das progênes encontra-se dentro da categoria de 4-8, apresentando um menor ICM em relação aos genitores (Figura 3A). Na população 3, observa-se que 100% das progênes foi totalmente diferente a seus genitores, onde tiveram valores do ICM menores a 8, enquanto que seus genitores encontrassem com valores acima de 12 (Figura 3C). Em relação a população 6, somente 30% foi similar a um dos genitores LPS06.1, encontrando-se dentro da categoria de 12-16, enquanto que os restantes estavam nas categorias 8-12 (20% das progênes) e de 16-20 (50% das progênes, Figura 3F). Somente as populações 4 e 6, após um ciclo sexual, apresentaram indivíduos com ICM superior a seus genitores.

Considerando-se como critério de variabilidade de cada população, pode-se observar maior percentagem nas populações 2, 4, 5 e 6, onde as progenies encontram-se distribuídos em três categorias (Figura 3).

Isto leva crer que as populações com maiores variabilidades entre as progênes foram obtidas pelo cruzamento entre os genitores que são geneticamente mais distantes e mais divergentes (DE CAL et al., 2014).



**Figura 3.** Histogramas de distribuição de frequência relativa para o índice de crescimento micelial (ICM) nas populações dos cruzamentos de *Bipolaris oryzae*. Setas indicam o valor médio dos genitores. A- população 1; B- população 2; C- população 3; D- população 4; E- população 5; F- população 6.

Dentro das características macroscópicas, quanto à forma das colônias, foi registrada as formas filamentosa, circular e irregular (Tabela 4). Sendo observada nas populações 1 e 2 que 100% das progênies apresentaram forma irregular, igual ao genitor LPS07.3 e a LPS07.1, respectivamente. Já para as outras progênies nota-se uma maior variabilidade na forma, sendo registrados três tipos. Para a população 3,

100% dos isolados foram diferentes aos dois genitores para esta característica, registrando-se forma circular e irregular das colônias. Na população 4, 62.5% da progênie tiveram forma irregular igual ao genitor LPS07.4 e 25% forma filamentosa igual ao genitor LPS10.4. Na população 5, 40% teve forma filamentosa igual ao genitor LPS08.1, 40% apresentou forma irregular igual o genitor LPS09.1, e 20% forma circular mostrando-se diferente aos dois genitores. Já na população 6, 58% teve forma irregular igual aos dois genitores, porém foi registrado que o restante teve forma filamentosa comportando-se de forma diferente aos seus genitores.

Dados semelhante foram obtidos por Farias (2007) avaliando as características morfológicas em diferentes espécies de *Bipolaris* spp., onde foi observou as formas irregular e circular. Da mesma maneira, Christensen (1922), também descreveu as formas das colônias de *Helminthosporium sativum* sendo a forma irregular a mais comum.

Quanto à margem das colônias, está apresentou variabilidade nas populações 1, 2, 3, e 4, observando-se alguns indivíduos diferentes aos genitores, na qual foram registradas colônias com margem filiforme, ondulada e inteira, sendo a primeira mais frequente. Já as populações 5 e 6 não apresentaram variabilidade em relação a esta variável, onde 100% das progênies foram iguais a seus genitores com margem filiforme (Tabela 4). Isto concorda com estudos realizados por Farias (2007), na qual observou em *B. oryzae* que as colônias apresentavam margens inteiras e onduladas. Para espécies *B. sorokiniana*, autores observaram a margem ondulada e lisa como a mais frequente (VIEGAS, 1989; SILVA, 1995; FRAZZON et al., 2002), no entanto, neste estudo a margem predominante foi a filiforme.

Para elevação das colônias foi observada a predominância do tipo elevada, mas também, registrou-se a forma Umbonada em menor frequência nas populações 1, 3 e 4. Resultados semelhantes foram obtidos por Farias (2007), onde a forma elevada foi a mais frequente para *B. oryzae*.

A coloração das colônias foi a características que apresentou maior variabilidade. Na população 1, 75% da população apresentaram coloração diferente aos seus genitores. Na população 2, 66% foi de coloração cinza igual ao genitor LPS05.3, e 33% apresentou-se diferente para os dois genitores. Para a população 3, 25% foi igual ao genitor LPS07.2 com coloração cinza esverdeado, 12.5% foi de cor cinza apresentando-se igual ao genitor LPS05. Para a população 4, 37% foi igual ao

genitor LPS010.4, sendo os demais diferente aos dois genitores. Já as populações 5 e 6 destacam-se com a maior diversidade, observando-se cinco cores diferentes, que variaram de cinza claro a cinza muito escuro. Estas populações foram as que apresentaram maior quantidade de indivíduos com colorações de cinza a cinza claro, em quanto que as populações 3 e 4 apresentaram colorações mais escuras na maioria dos indivíduos, variando de cinza a cinza esverdeado muito escuro (Tabela 4, Figura 4).

**Tabela 4.** Características morfológicas das colônias dos genitores e suas progênes de populações segregadas por cruzamentos dos genitores de *Bipolaris oryzae*

	Isolado	Forma*	Margem*	Elevação*	Coloração**	Sector P/A***
<b>População 1- LPS010.1 x LPS07.3</b>						
Genitores	LPS010.1	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	LPS07.3	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza esverdeado (6/10Y Gley 1)	A
População	1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado muito escuro (3/N Gley 1)	A
	2	Irregular	Ondulado	Elevada	Cinza esverdeado escuro (4/10Y Gley 1)	A
	3	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza muito escuro (3/N Gley 1)	P
	4	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
<b>População 2- LPS07.1 x LPS05.3</b>						
Genitores	LPS07.1	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza esverdeado muito escuro (3/10Y Gley 1)	A
	LPS05.3	Filamentosa	Filiforme	Umbonada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado escuro (4/10Y Gley 1)	A
População	2	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	3	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	4	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
	5	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	A
	6	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
<b>População 3- LPS07.2 x LPS05.1</b>						
Genitores	LPS07.2	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
	LPS05.1	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	1	Irregular	Ondulado	Elevada	Cinza muito escuro (3/N Gley 1)	A
População	2	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
	3	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza muito escuro (4/10Y Gley 1)	P
	4	Circular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
	5	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	P
	6	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	A
	7	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	P
	8	Circular	Inteiro	Elevada	Cinza esverdeado muito escuro (3/10Y Gley 1)	A

\* Forma, margem e elevação com base à chave descrita por Microbiology Society (2016).

\*\* Coloração das colônias com base à escala de solos de Mussel (1954).

\*\*\* P= presença de setores/ A= Ausência de setores

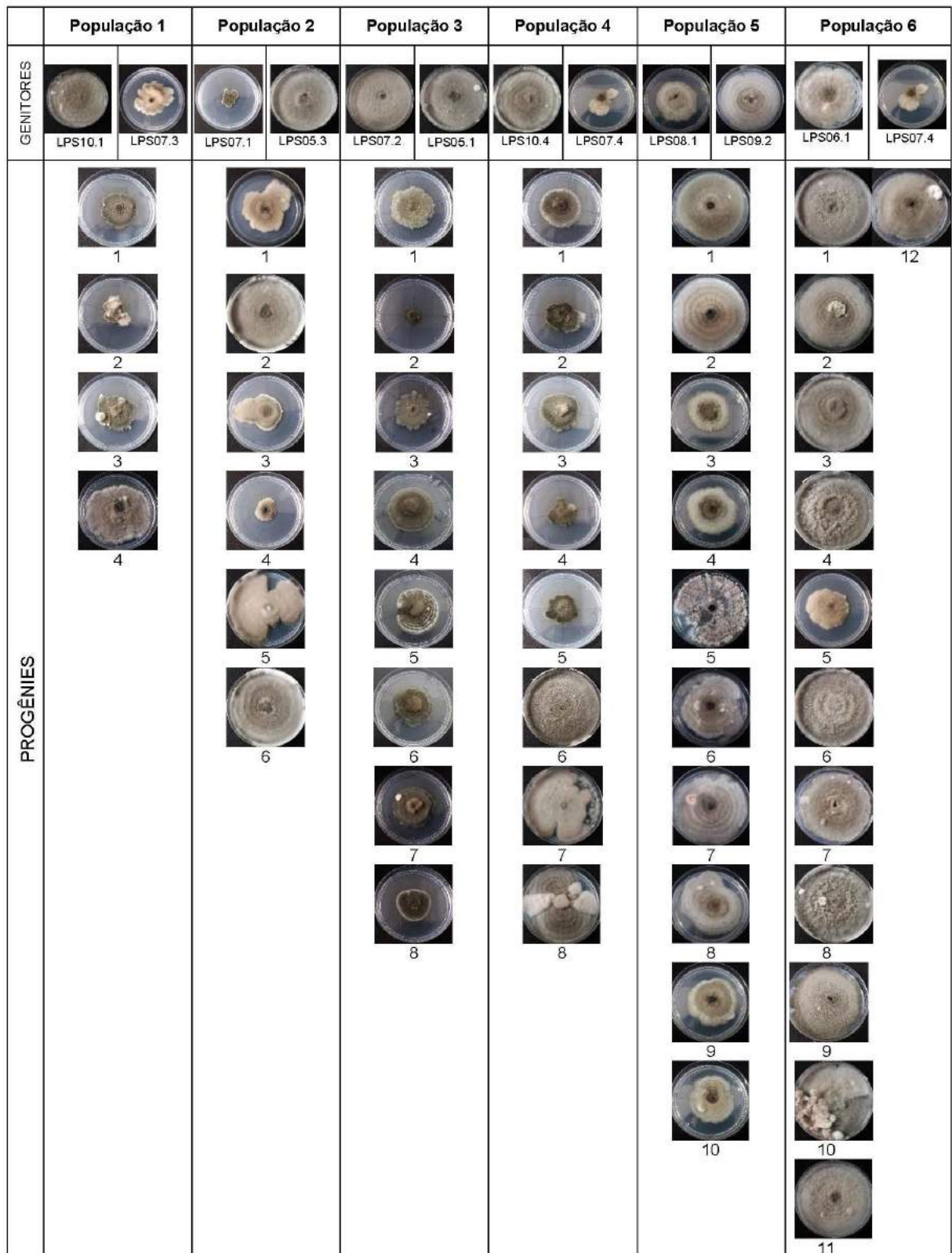
**Tabela 4 (Cont.).** Características morfológicas das colônias dos genitores e suas progênes de populações segregadas por cruzamentos dos genitores de *Bipolaris oryzae*

Isolado	Forma*	Margem*	Elevação*	Coloração**	Sector P/A***	
<b>População 4- LPS010.4 x LPS07.4</b>						
Genitores	LPS010.4	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	LPS07.4	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado escuro (4/10Y Gley 1)	A
População	1	Circular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado muito escuro (3/10Y Gley 1)	A
	2	Irregular	Ondulado	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	3	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza muito escuro (3/N Gley 1)	A
	4	Irregular	Ondulado	Elevada	Cinza muito escuro (3/N Gley 1)	A
	5	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	6	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza muito escuro (3/N Gley 1)	A
	7	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
	8	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
<b>População 5- LPS08.1 x LPS09.2</b>						
Genitores	LPS08.1	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	A
	LPS09.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	A
População	1	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	P
	2	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	A
	3	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado escuro (4/10Y Gley 1)	A
	4	Circular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	5	Circular	Filiforme	Elevada	Rosa (2.5 YR 8/4)	P
	6	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza claro (7/N Gley 1)	P
	7	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	P
	8	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza claro (7/N Gley 1)	A
	9	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	10	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	A
<b>População 6- LPS06.1 x LPS07.4</b>						
Genitores	LPS06.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	P
	LPS07.4	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado escuro (4/10Y Gley 1)	A
População	1	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado claro (7/10Y Gley 1)	A
	2	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza claro (7/N Gley 1)	P
	3	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	4	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	A
	5	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (6/10Y Gley 1)	A
	6	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	A
	7	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
	8	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	P
	9	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
	10	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	P
	11	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado claro (7/10Y Gley 1)	A
	12	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	P

\* Forma, margem e elevação com base à chave descrita por Microbiology Society (2016).

\*\* Coloração das colônias com base à escala de solos de Mussel (1954).

\*\*\* P= presença de setores/ A= Ausência de setores



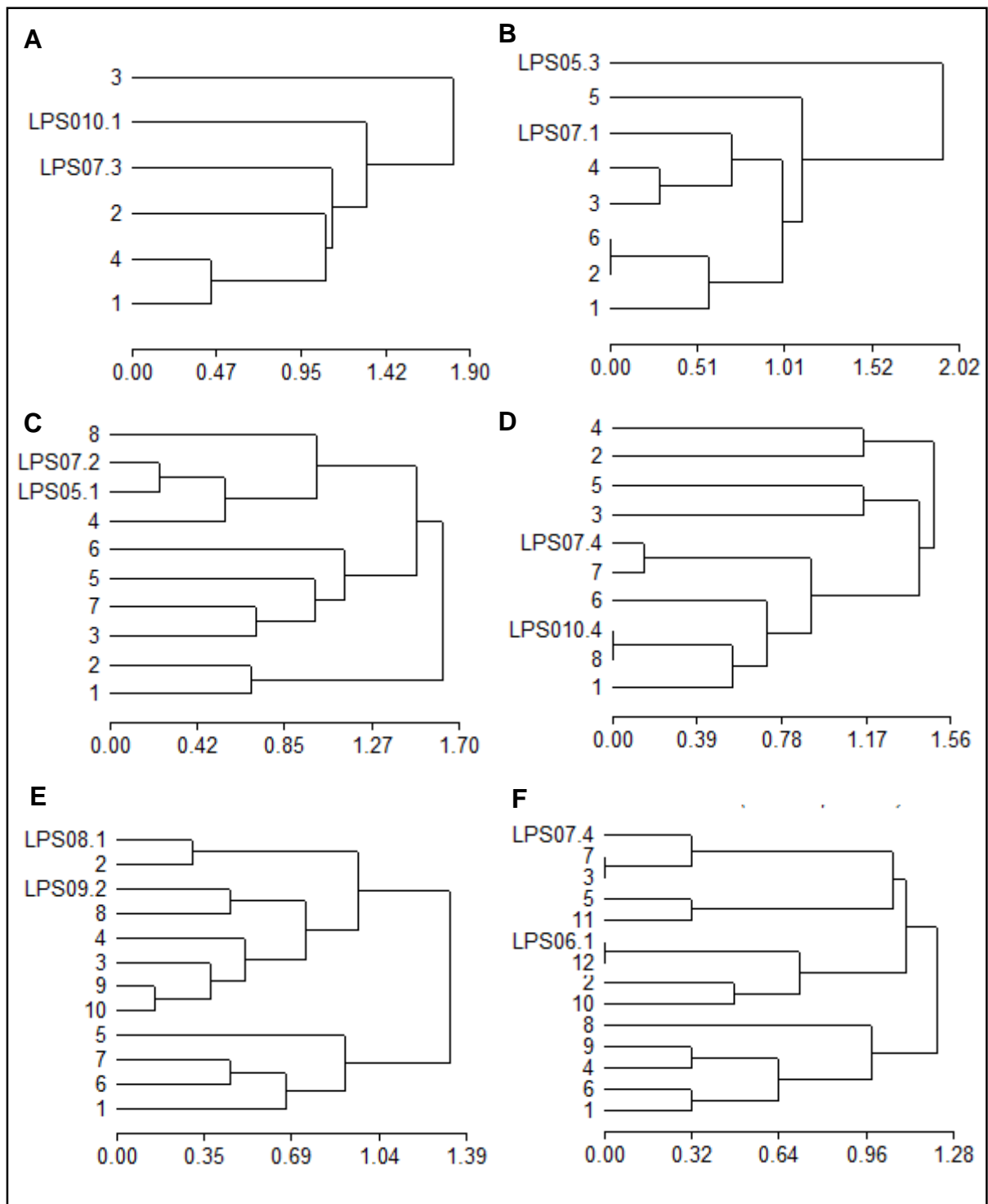
**Figura 4.** Coloniais com 10 dias de crescimento dos genitores e de suas progênies em cada população. População 1: LPS010.1 x LPS07.3; População 2: LPS07.1 x LPS05.3; População 3: LPS07.2 x LPS05.1; População 4: LPS010.4 x LPS07.4; População 5: LPS08.1 x LPS09.2; População 6: LPS06.1 x LPS07.4.



Quanto a presença de setores nas colônias, evidenciada por áreas de crescimento micelial de coloração mais claras que a colônia normal, ou ausência, percebe-se que as populações 2 e 4 não apresentaram setores, o mesmo ocorreu com seus genitores. Para as demais populações foram observado nas progênes tanto ausência quanto a presença de setores. A formação dos setores na colônia pode ser uma fonte de variabilidade já que revela mutações somáticas (CAMARGO, 1995), podendo ser uma possível causa de geração de novas variantes genéticas do patógeno.

As características macroscópicas avaliadas tanto nos genitores quanto nas progênes (Tabela 4), permitiram realizar a análise multivariada e a geração de dendrogramas (Figura 5). Observando-se a formação de vários agrupamentos dentro de cada população, variando de 3 a 7 grupos.

A população 2 com base nas características macroscópicas da colônia formou menor número de grupos comparado com os demais, indicando que 83% das progênes da população é semelhante ao genitor LPS07.1, (Figura 5B). Porém as populações 3, 4, 5 e 6 foram as que formaram maior números de grupos, sendo a população 6 a que apresentou maior quantidade de agrupamentos (sete grupos), (Figura 5). Na população 3, somente o genótipo 4 agrupou-se junto com os dois genitores, e o restante (87% da população) formaram grupos diferentes (Figura 5C). Na população 4, o genótipo 7 foi similar ao genitor LPS07.4, enquanto que os genótipos 1, z 6 e 8 foram similares ao LPS10.4, sendo que, os demais indivíduos, mais de 60% formaram grupos diferentes (Figura 5D). Já para a população 6 os genótipos 7 e 3 foram semelhantes ao genitor LPS07.4, ficando dentro do mesmo grupo, e somente o genótipo 12 foi similar ao genitor LPS06.1, com 75% da população restante formando parte de grupos diferentes aos seus genitores (Figura 5F).



**Figura 5.** Dendrogramas representando a dissimilaridade morfológica entre os genótipos das progênes e genitores *Bipolaris oryzae* avaliados obtidos pelo método agrupamento UPGMA, utilizando a distância Euclidiana média com base as características macroscópicas das colônias (cor, forma, elevação, margem e presença de setores). A- população 1 (CCC= 0.92); B- população 2 (CCC= 0.93); C- população 3 (CCC= 0.84); D- população 4 (CCC= 0.89); E- população 5 (CCC= 0.84); F- população 6 (CCC=0.82). Ponto de corte considerado= média da distância Euclidiana média.

Em relação às características microscópicas dos conídios observa-se uma elevada variabilidade nas populações segregantes (Tabela 5), apresentando valores

médios semelhantes aos citados por Sivanesan (1987), mas para largura e número de septos foram observados valores extremos que os citados, variando de 8 a 19  $\mu\text{m}$  e 3 a 10, respectivamente. Em relação ao comprimento e largura, 100% das progênes da população 1 apresentaram valores maiores que seus genitores ( $>70,3\mu\text{m}$  de comprimento e  $>14,3\mu\text{m}$  de largura), porém 100% da população 2 apresentou valores intermediário dos seus genitores para comprimento e 50% apresentaram valores de largura abaixo dos genitores. Para a população 3, obtiveram valores médios entre 62% e 37%, de comprimento e largura respectivamente, acima de seus genitores. Mais de 70% da progênie 4 e 5 obtiveram valores também acima de seus genitores para o comprimento.

**Tabela 5.** Comprimento, largura e número de septos médio, mínimos e máximos dos genitores e suas progênes de populações segregadas por cruzamentos dos genitores de *Bipolaris oryzae*

Isolado	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )		Largura ( $\mu\text{m}$ )		Nº de septos		
	Média	Min - Max	Média	Min - Max	Média	Min - Max	
<i>B. oryzae</i> (SIVANESAN, 1987)	-	35 - 170	-	11 - 17	-	6 - 14	
<b>População 1: LPS10.1 x LPS07.3</b>							
Genitores	LPS10.1	68,8	52,2 - 81,5	14,3	11,8 - 16,6	6	5 - 8
	LPS07.3	70,3	50,6 - 90,7	13,9	11,9 - 16,2	5	4 - 6
População	1	70,6	48,3 - 89,2	14,6	12,5 - 16,1	6	4 - 8
	2	83,0	50,8 - 112,8	15,0	10,8 - 17,0	6	3 - 7
	3	92,4	61,3 - 108,8	14,9	12,8 - 17,3	7	4 - 10
	4	71,2	54,2 - 89,4	14,3	11,2 - 16,7	5	4 - 7
<b>População 2: LPS07.1 x LPS05.3</b>							
Genitores	LPS07.1	88,5	61,3 - 123,4	14,7	11,7 - 17,6	6	5 - 8
	LPS05.3	68,6	56,7 - 82,8	13,6	9,2 - 16,4	6	5 - 8
População	1	72,8	50,2 - 99,3	12,6	11,0 - 14,2	5	3 - 8
	2	68,3	56,7 - 95,2	13,0	10,2 - 15,3	5	4 - 8
	3	86,0	50,5 - 103,5	15,5	10,0 - 16,7	5	4 - 7
	4	77,8	50,6 - 102,2	13,7	9,6 - 18,1	5	4 - 7
	5	77,3	58,6 - 98,1	12,0	8,0 - 14,6	5	4 - 6
	6	71,8	56,4 - 116,1	13,8	11,8 - 17,4	6	4 - 9
<b>População 3: LPS07.2 x LPS05.1</b>							
Genitores	LPS07.2	63,6	44,7 - 83,1	12,2	9,7 - 15,0	4	3 - 6
	LPS05.1	75,1	59,4 - 94,6	15,0	12,5 - 16,9	6	5 - 7
População	1	75,5	54,4 - 90,1	14,3	11,8 - 17,6	6	5 - 8
	2	78,8	46,9 - 110,4	13,1	9,2 - 15,4	5	3 - 7
	3	82,38	52,7 - 110,3	15,8	13,7 - 17,8	6	4 - 8
	4	63,7	44,3 - 90,7	12,9	11,2 - 14,3	5	3 - 8
	5	85,5	62,6 - 117,7	15,7	11,8 - 19,8	6	4 - 8
	6	76,7	32,2 - 109,0	14,2	9,5 - 17,2	6	4 - 8
	7	87,5	59,3 - 110,7	15,8	13,4 - 18,7	6	4 - 9
	8	76,0	50,9 - 110,6	14,9	11,7 - 18,1	5	3 - 9

**Tabela 5 (Cont.).** Comprimento, largura e número de septos médio, mínimos e máximos dos genitores e suas progênes de populações segregadas por cruzamentos dos genitores de *Bipolaris oryzae*

Isolado	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )		Largura ( $\mu\text{m}$ )		Nº de septos		
	Média	Min - Max	Média	Min - Max	Média	Min - Max	
<b>População 4: LPS010.4 x LPS07.4</b>							
Genitores	LPS010.4	72,4	51,6 - 93,5	13,3	10,0 - 16,3	6	5 - 8
	LPS07.4	70,6	57,4 - 89,3	11,8	10,0 - 14,0	5	3 - 7
População	1	78,1	55,7 - 101,0	14,7	12,1 - 18,0	6	4 - 7
	2	75,4	56,3 - 89,8	13,7	10,0 - 17,5	6	5 - 8
	3	83,0	48,1 - 107,2	15,3	13,1 - 18,2	7	5 - 9
	4	91,2	58,0 - 117,6	14,4	8,8 - 16,7	6	3 - 9
	5	85,2	55,9 - 107,4	15,7	12,3 - 18,7	7	4 - 10
	6	81,4	58,5 - 102,7	14,3	11,3 - 18,6	6	5 - 8
	7	68,8	53,1 - 86,6	11,2	9,4 - 14,7	4	3 - 6
	8	70,9	54,7 - 90,5	14,6	12,6 - 19,3	6	4 - 8
<b>População 5: LPS08.1 x LPS09.1</b>							
Genitores	LPS08.1	75,2	49,4 - 97,7	14,5	12,1 - 18,1	6	4 - 8
	LPS09.1	81,8	65,0 - 103,3	12,7	10,0 - 15,8	7	4 - 10
População	1	70,8	53,1 - 96,5	14,1	12,6 - 15,9	6	4 - 9
	2	73,2	61,4 - 88,3	12,7	11,1 - 14,7	7	6 - 8
	3	80,0	58,9 - 98,0	13,9	11,7 - 15,0	7	6 - 9
	4	71,6	55,4 - 97,8	14,1	10,1 - 17,5	6	5 - 8
	5	70,0	56,9 - 88,1	14,5	11,8 - 17,0	6	4 - 8
	6	72,1	52,0 - 104,1	13,0	10,0 - 16,4	5	3 - 8
	7	62,6	50,6 - 81,1	13,3	11,7 - 15,6	5	4 - 7
	8	85,5	65,0 - 109,2	13,9	12,0 - 17,3	7	6 - 9
	9	69,4	44,3 - 86,9	14,1	11,5 - 16,0	7	5 - 8
	10	84,0	70,0 - 100,8	13,9	11,7 - 17,9	7	5 - 8
<b>População 6: LPS06.1 x LPS07.4</b>							
Genitores	LPS06.1	78,8	54,9 - 118,3	15,0	12,6 - 17,8	6	5 - 9
	LPS07.4	70,6	57,4 - 89,3	11,8	10,0 - 14,0	5	3 - 7
População	1	65,4	49,2 - 78,3	13,3	11,4 - 14,9	6	4 - 8
	2	71,3	50,1 - 109,5	13,1	10,0 - 15,9	6	3 - 7
	3	74,5	54,3 - 92,1	14,9	12,4 - 17,2	6	5 - 9
	4	82,8	50,9 - 110,5	14,6	11,2 - 18,3	7	6 - 9
	5	76,2	58,1 - 91,4	13,2	11,2 - 16,5	5	4 - 7
	6	92,2	65,3 - 116,1	14,0	10,5 - 16,5	7	6 - 9
	7	73,8	57,1 - 89,1	14,2	11,7 - 17,6	6	5 - 6
	8	78,6	60,5 - 104,6	14,4	11,0 - 16,1	7	5 - 9
	9	74,9	56,6 - 94,2	11,2	9,1 - 15,4	5	3 - 6
	10	77,5	59,2 - 98,0	13,8	11,3 - 16,5	6	4 - 8
	11	78,3	51,8 - 96,5	14,5	11,7 - 16,6	6	4 - 8
	12	73,5	60,6 - 96,1	15,2	11,7 - 19,9	6	4 - 8

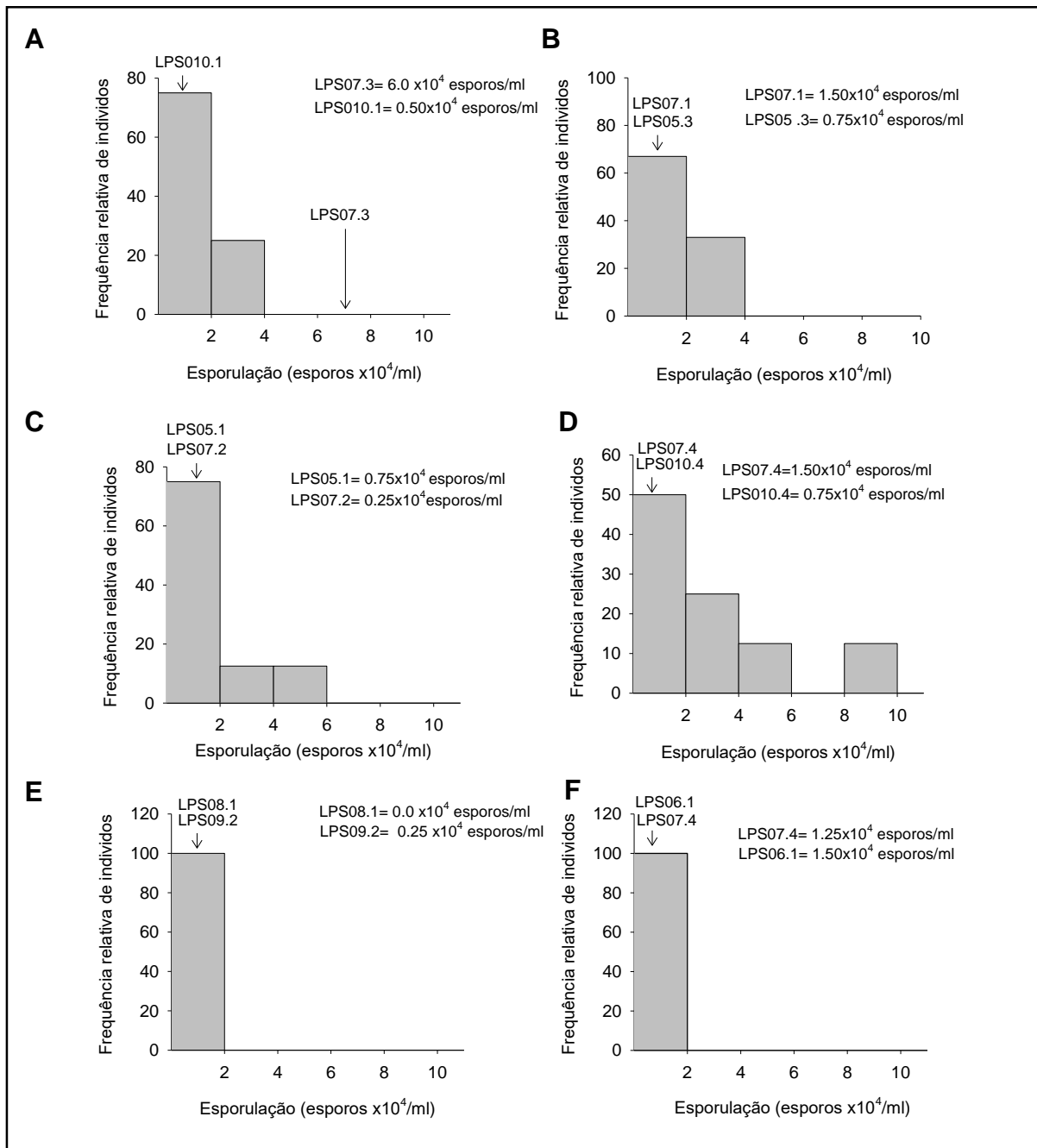
A população 6 foi a única que obteve comportamento diferente, onde mais de 75% das progênies segregantes foi similar a seus genitores tanto para o comprimento como para largura dos conídios.

Em relação ao número médio de septos dos conídios, na população 1, 75% das progênies apresentaram valores intermediários aos genitores, sendo que o isolado 3 apresentou média de 7 septos por conídio, maior que os obtidos pelos genitores. Na população 2, 83,3% foram inferiores aos seus genitores, observando-se uma média de 5 septos por conídio. Na população 3, 100% obtiveram uma média intermediária entre os dois genitores. A população 4, apresentou 12,5% da progênie abaixo (4 septos) dos genitores e 25% acima (7 septos). Na população 5, 80% da progênie encontram-se com valores intermediários entre os genitores (6-7 septos) e 20% inferiores (5 septos). Já para a população 6, 75% tiveram valores intermédios (5-6 septos) e 25% foram superiores aos genitores (7 septos, Tabela 5).

Resultados similares foram obtidos por trabalhos conduzidos por Casa-Coila (2008), em Pelotas (RS-Brasil), avaliando as características microscópicas dos esporos de *B. oryzae* após passar por fase sexuada. Teve como resultado alta variabilidade das progênies no cruzamento dos isolado de Camaquã e de Rosário do Sul, na qual 58% e 33%, para comprimento e largura respectivamente, foram superiores aos seus respectivos genitores, enquanto que para os cruzamentos dos isolados de Uruguaiana e Rosário do Sul, somente o 13% foi superior tanto para comprimento como para largura.

A variável esporulação apresentou segregação transgressiva para as populações 2, 3 e 4, com indivíduos exibindo valores superiores a seus genitores (Figura 6).

Menor variabilidade foi observada nas populações 5 e 6 agrupando todos seus indivíduos em apenas uma categoria (0 a  $2 \times 10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , Figura 6E e 6F).



**Figura 6** Histogramas de distribuição de frequência relativa para a esporulação (esporos  $\times 10^4$ / ml) nas progênies dos cruzamentos de *Bipolaris oryzae*. Setas indicam o valor médio dos genitores. A- população 1; B- população 2; C- população 3; D- população 4; E- população 5; F- população 6.

Trabalhos referente a fase sexuada em *B. oryzae* inexistem, porém conforme observado neste estudo ocorreu uma elevada variabilidade nas populações segregantes quando comparadas com seus genitores em todas as variáveis analisadas, confirmando a influência do ciclo sexual.

Indivíduos com maior e menor ICM que seus genitores foram observados, após a fase sexuada. Trabalhos realizados por Kumari et al. (2015), não encontraram uma correlação entre o crescimento micelial e a agressividade, mas observaram que algumas colônias de crescimento lento apresentavam-se mais agressivos, e outras com rápido crescimento menos agressivos. Inferindo-se que isolados após passar pela fase sexuada podem aumentar sua agressividade.

Quanto as características macroscópicas, para a coloração das colônias, pode-se observar uma grande variabilidade na forma, margem e elevação, sendo as populações 3 e 4 as que apresentaram colorações mais escura variando de cinza a cinza muito escuro. Observando-se nestas populações indivíduos com maiores quantidades de esporos, variando entre 0 a  $6 \times 10^4$  esporos/mL e 0 a  $10 \times 10^4$  esporos/mL, para as populações 3 e 4, respectivamente. Entretanto, colônias com colorações mais claras, como foi observado na maioria das populações 5 e 6, apresentaram menores quantidades de esporos, agrupando as duas populações na categoria de 0 a  $2 \times 10^4$  esporos/mL. Estes resultados concordam com Kumari et al. (2015), no qual observaram que as colônias escuras apresentaram maior esporulação quando comparadas com as mais claras, que obtiveram menor quantidade de esporos. Sendo isto de suma importância para constatar-se sobre a agressividade do patógeno, já que trabalhos realizados por CHAND et al. (2003) e KUMAR et al. (2011) afirmam que as colônias mais escuras são as mais agressivas.

Quanto a presença dos setores poucos indivíduos foram capazes de forma-los, visto que estes são mutações somáticas, por isso sua ocorrência é considerada como um mecanismo importante podendo influir na variabilidade do patógeno.

Em relação às características microscópicas dos conídios observa-se uma elevada variabilidade nas populações segregantes, onde as dimensões dos esporos após fase sexuada foram afetadas. Isto concorda com estudos de Casa-Coila (2008) que observou modificações nos conídios de *B. oryzae* após a formação desta fase. Não foi possível correlacionar as variáveis analisadas com o local de origem dos isolados, concordando com outros pesquisadores, que estudando a variabilidade genética de *B. oryzae* observaram pouca relação entre a estrutura genética do patógeno e região de origem geográfica do mesmo (WEIKERT-OLIVEIRA et al., 2002; ARCHANA et al., 2014).

A variabilidade observada é esperada já que a reprodução sexuada permite a troca de material genético o que gera novos descendentes, sendo um mecanismo de ampliação desta variabilidade, embora muitas características sejam mantidas (NI et al., 2011).

Além do ciclo sexual, outros fatores intrínsecos ao patógeno e ao ambiente como temperatura, luz, umidade, pH e a disponibilidade de nutrientes também contribuem para esta variabilidade (CHAMBERLAIN; INGRAM, 1997).

Neste trabalho, fica evidenciado a geração de uma nova população, diferente aos seus genitores após fase sexuada. Coincidindo com estudos em outros patossistemas, como em *Botrytis cinerea* onde os pesquisadores Burdon e Roelfs (1985), estudando o efeito da fase sexuada, observaram que este é um meio potencialmente eficaz em gerar novas variantes genéticas em populações naturais. Também os autores Czembor e Arseniuk (2000) em estudos avaliando a segregação e recombinação por meio de marcadores nas progênies de origem de cruzamento da espécie de *Phaeosphaeria*, destacam, mediante as evidências moleculares, a geração de novos recombinantes do patógeno. Souza et al. (2010), observou que em populações de *Colletotrichum lindemuthianum* a recombinação sexual desempenha um papel de importância na determinação de variabilidade. De mesmo modo, outras pesquisas confirmam os resultados encontrados para *Peronospora parasítica* (MOSS et al., 1994); em *Aspergillus fumigatus* (GORMAN et al., 2009), em *Monilinia fruticola* (SANOMUANG, et al., 1995);

Trabalhos são conduzidos, em geral, entre isolados e não considerando a população segregantes em relação ao crescimento micelial, características macroscópicas e microscópicas e esporulação. O conhecimento da existência da fase sexuada e da variabilidade que pode causar em sua descendência é de suma importância, pois auxiliam trabalhos taxonômicos fornecendo subsídios para identificação do real agente causal da doença, sabendo-se que a taxonomia clássica, baseada em características fenotípicas, muitas vezes levam a identificação errônea visto a ampla variabilidade que estes agentes podem apresentar. Sendo que esta variabilidade pode ser em decorrência de fatores ambientais, intrínsecos à espécie, distância genética dos genitores e também por mecanismos que geram variabilidade, entre eles o ciclo sexual.



### 3.4. Conclusões

A fase sexuada pode ter uma grande importância e influência na geração de uma nova população, principalmente quando seus genitores são geneticamente diferentes quanto aos aspectos morfológicos.

Populações de *B. oryzae* da fase sexuada apresentaram coloração, forma, margem e elevação das colônias alteradas, assim como, o comprimento, largura e número de septos dos conídios podem ser modificados, apresentando valores diferentes a seus genitores.

### 3. Capítulo 2

#### **Variabilidade na agressividade e na fisiologia de populações segregantes de *Bipolaris oryzae***

##### **3.1. Introdução**

No Brasil, o arroz (*Oryza sativa* L.) ocupa o terceiro lugar entre as culturas anuais, com uma produção de 10,8 mil toneladas em áreas irrigadas distribuídas em 1.448 mil hectares, sendo a região sul responsável por mais de 81% da produção nacional (CONAB, 2017).

Nos últimos anos a mancha parda, causada por *Bipolaris oryzae*, tem sido mencionada entre as doenças fúngicas mais frequentes nas regiões produtoras do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Podendo causar danos significativos na produtividade, além de ser o principal patógeno associado às sementes de arroz (CELMER et al., 2007; RODRIGUES et al. 2011).

O patógeno quanto associado às sementes pode causar debilitação e morte de plântulas, servindo como fonte de inóculo primário, podendo ocasionar danos nos diferentes estádios fenológicos. (BA; SANGCHOTE, 2006; GOPALAKRISHNAN, 2010). Nas folhas, o sintoma típico são manchas ovaladas, circundadas por um halo castanho-amarelado e centro escuro, o que leva a perdas na produção pela redução da área foliar fotossintética (FUNCK e KEMPF, 2008; FILHO e FARIAS, 2012). Podendo também causar manchas dos grãos levando a perdas no rendimento de engenho onde estes ficam manchados, estéreis ou gessados (PINTO, 1989; MALAVOLTA et al., 2002).

Uma característica típica do gênero *Bipolaris* é a elevada variabilidade, evidenciadas tanto por aspectos morfológicos, fisiológicos como na agressividade (SOUSA; RIBEIRO; GALLI, 1984; BEDENDO; PRABHU, 2005, SAFARI; ANVARI, 2010). As informações sobre esta variabilidade nas populações de mancha parda são limitadas (BURGOS, et al., 2013).

Estudos comprovam que *B. oryzae* além de reproduzir-se assexuadamente, que é sua forma mais frequente, não descarta-se a possibilidade da fase telomórfica acontecer em condições naturais, já que foi observada sua existência *in vitro* (FARIAS et al., 2011). Estes mecanismos, juntamente com mutações, herança citoplasmática, heterocariose e recombinação parassexual podem gerar variabilidade genética em fungos (CAMARGO 1995).

A recombinação genética pode causar alterações na patogenicidade, gerando níveis diferentes de agressividade, como verificado em *Pyricularia grisea* por Levy et al. (1993), assim como por Dyer e Lucas (1995) em *Tapesia yallundae* que favoreceu o aparecimento de raças mais agressivas.

Para *B. oryzae*, inexistem estudos do efeito da recombinação genética na geração de novos indivíduos em relação às variabilidades patogênicas e fisiológicas. No entanto, autores afirmam que este patógeno apresenta grande variação quanto à patogenicidade, podendo-se identificar três tipos de lesões em folhas inoculadas, mancha oval com centro marrom, mancha linear com centro marrom e circular com centro café claro (WEIKERT-OLIVEIRA et al., 2002). Estudos relatam diferenças na severidade em diferentes cultivares, e a existência de variação na agressividade em sementes inoculadas causando falhas na germinação de 20 a 84%, morte de plântulas pós- emergência e redução no rendimento (RIBEIRO, 1977; PRABHU et al., 1999; KAMAL; MIA, 2009; LOBO et al., 2014).

Para que os patógenos consigam causar danos em plantas, é necessário a retirada de nutrientes para o seu metabolismo. Para atividades vegetativas e reprodutivas, sendo necessário que penetrem no tecido do hospedeiro. Para isso, devem vencer as barreiras externas formadas pela cutícula e/ou parede celular, assim como promover a colonização interna dos tecidos. A penetração pode ocorrer nas aberturas naturais, ferimentos ou por força mecânica através de estruturas específicas, este processo é acompanhado por secreções enzimáticas assim como por produção de toxinas e hormônios cuja importância varia nas diferentes interações hospedeiro-patógeno (LEITE; STANGARLIN, 2008; PASCHOLTI, 2011).

Estudos sobre a produção de enzimas extracelulares em *B. oryzae* são limitados, mas existem relatos em outros patossistemas na qual demonstram maior ou menor capacidade dos fungos em produzirem as enzimas amilase, celulase, pectinase, protease e esterase por meio da difusão em substratos sólidos específicos (FILHO et

al. 2012; SERRA et al., 2008; ELIAS et al 2015). Além disso, inexistem trabalhos envolvendo alterações fisiológicas em populações segregantes de fungos. No entanto, sabe-se que recombinações genéticas como mutações, heterocarios, dissociação de heterocarios, possibilidade de diploides e haploides, parassexualidade e reprodução sexuada favorecem o surgimento de novas variantes que podem conter diferentes genes de virulência podendo esse ser evidenciado pela produção de enzimas (AZEVEDO, 1976; VIEGAS, 1989; CAMARGO, 1995; GLASS et al., 2000; MCDONALD; LINDE, 2002).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a agressividade e a produção de enzimas extracelulares *in vitro* de indivíduos descendentes de *B. oryzae* após reprodução sexuada, comparando-os com seus genitores.

### 3.2. Materiais e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (FAEM-UFPel).

Os isolados (genitores) utilizados foram selecionados a partir de estudos anteriores, com compatibilidade conhecida para formar a fase sexuada, e com base nas características macroscópicas (coloração, forma, margem, elevação e presença de setos) e microscópicas (comprimento, largura e número de septos dos conídios), assim como, quanto ao índice de crescimento micelial. Na tabela 6 encontram-se as características dos genitores e na Tabela 7 os isolados compatíveis com o número de progênie utilizados para as avaliações neste estudo.

**Tabela 6.** Isolados massais utilizados no experimento, segundo a cultivar hospedeiro, região, município de coleta.

Isolado	Cultivar	Região*	Município
LPS06	Irga 424	Zona Sul	Pelotas
LPS07	Irga 424	Costa interna	Camaquã
LPS08	Irga 424	Depressão central	Santo Antônio da Patrulha
LPS09	BRS Querência	Costa externa	Cachoeira do Sul
LPS10	Puita Inta CL	Planície Costeira Interna	Tapes

\*Segundo regiões estabelecidas pelo Instituto Rio Grande de Arroz (IRGA).

**Tabela 7.** Isolado compatíveis e número de indivíduo obtidos a partir dos cruzamentos de *Bipolaris oryzae* utilizados

Número da progênie	Genitores	Número de indivíduos
Progênie 1	LPS010.4x LPS07.4	8
Progênie 2	LPS08.1 x LPS09.2	10
Progênie 3	LPS06.1 x LPS07.4	12

### 3.2.1. Obtenção da população segregantes de *Cochliobolus miyabeanus*

Para a obtenção da fase sexuada foram realizados cruzamentos com isolados monospóricos de *B. oryzae* com compatibilidade conhecida.

Os isolados monospóricos foram obtidos a partir de uma suspensão de conídios com água destilada estéril, na qual 100µL de cada isolado foi transferido e espalhado sobre a superfície, utilizando meio de cultura ágar-água em placas de Petri. Posteriormente, com auxílio de microscópio estereoscópio, um único esporo foi retirado e colocado em placas com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em sala de crescimento a 23±1°C.

Posteriormente, para obter a fase meiospórica, foram realizados pareamentos entre dois isolados monospóricos de *B. oryzae* com compatibilidade sexual conhecida.

Para a formação desta fase foram utilizadas placas de Petri contendo como substrato, papel mata-borrão e sobre esse, folhas de *Typha* sp umedecidas e papel filtro, esterilizados (FARIAS et al., 2011). Foi vertida uma suspensão de esporos, realizada a partir de discos de micélio das bordas das colônias de dois isolados monospóricos, e mergulhados em tubos com água destilada esterilizada. Por último, as placas foram incubadas em sala crescimento a 23°C±1°C, fotoperíodo de 12 horas luz por um período de mais de 30 dias, ou até o aparecimento dos pseudotécios (FARIAS et al., 2011).

Os pseudotécios, quando presentes, foram retirados do papel com auxílio de estilete e transferidos para lâminas, contendo 10µL de água destilada autoclavada e, macerados para liberação das ascas e ascósporos. Estes foram transferidos individualmente, com auxílio de microscópio estereoscópio e estilete, para placas contendo meio de cultura BDA e incubados em sala crescimento a 23±1°C, fotoperíodo de 12 horas luz por um período de 14 dias, para novamente a obtenção da fase assexuada.

### **3.2.2. Avaliação da agressividade de isolados genitores e segregantes de *B. oryzae***

Para a avaliação da agressividade dos isolados foram utilizadas sementes de arroz do cultivar BRS Sinuelo CL, classificada como moderadamente resistente a mancha parda. Foram realizados teste de transmissão de semente para plântula e inoculações em plântulas.

#### **Transmissão de isolados genitores e segregantes de *B. oryzae***

Para a transmissão, sementes previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, foram depositas nas colônias de cada isolado com cinco dias de crescimento. O meio utilizado para o crescimento do fungo foi Batata-Dextrose-Agar modificado osmoticamente com sacarose a -0,6 Mpa, para evitar a germinação das sementes durante o processo de inoculação (COUTINHO et al., 2001). Posteriormente foram incubados a  $23\pm 1^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas luz por 72 horas.

A testemunha consistiu em sementes desinfetadas e depositadas sobre o meio BDA modificado osmoticamente sem o fungo. Após o tempo de incubação, as sementes foram retiradas das placas, desinfetadas novamente com hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, e secadas em estufa com circulação de ar a  $30^\circ\text{C}$  por três horas.

Posteriormente, as sementes foram plaqueadas em caixas plásticas, contendo papel mata borrão umedecido, e foram incubadas  $23\pm 1^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas luz, por sete dias. Após esse tempo, 25 sementes por isolados com mesmo potencial de inóculo foram transferidas para copos plásticos (de 50ml) com vermiculita estéril. Os copos foram acondicionados dentro de caixas plásticas e em câmara de incubação a  $23\pm 1^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas luz e irrigação diária por sete dias, para avaliação da transmissão do patógeno.

Para avaliação da severidade as plântulas com sintomas foram classificados de acordo com a escala do grau das lesões estabelecidas por Cardoso (2012), (Anexo 3), atribuindo-se: E0 = plântulas sem sintoma, E1 = plântulas com lesões típicas nas folhas, E2 = plântulas com lesões típicas no coleóptilo, E3 = plântulas com lesões avaliação de sintomas típicas no coleóptilo e folhas, E4 = morte pós-emergência, E5 = morte de pré-emergência.

Os valores obtidos de cada isolado foram utilizados para calcular a incidência das escalas de severidade em plântulas, índice de doença (ID%) e taxa de transmissão (TT%).

O cálculo do índice da doença (ID) das plântulas foi realizado de acordo com a fórmula estabelecida por Mckinney (1923):

$$ID (\%) = \frac{\sum(\text{Valor da escala} \times \text{N}^\circ \text{ de plântulas com esta nota})}{\text{N}^\circ \text{ de plântulas} \times \text{valor máximo da escala de notas}} \times 100$$

A taxa de transmissão TT (%), foi calculada seguindo a fórmula utilizada anteriormente por Malavolta et al. (2002):

$$TT (\%) = \frac{\text{Incidência de plantulas com sintoma}}{\text{Incidencia do patógeno na semente}} \times 100$$

Plântulas com sintomas típicos foram acondicionadas em caixas plásticas com papel umedecido, e incubadas a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas luz por 48 horas para induzir a esporulação e confirmar a presença de *B. oryzae* e posteriormente, foram analisadas em microscópio óptico quanto a presença de estruturas características do agente causal. Os dados foram analisados de forma descritiva para TT e ID.

### **Severidade de mancha parda em plântulas de arroz inoculadas com isolados genitores e segregantes de *B. oryzae***

Vinte sementes por isolado foram semeadas em gerbox (10 sementes/ gerbox) utilizando como substrato uma mistura 1:1 de substrato comercial para plantas e vermiculita. As plantas no estágio V2 foram colocadas por 48 horas em câmara úmida, e posteriormente foram inoculadas com uma concentração de  $1 \times 10^4$  esporos/mL com auxílio de um aspersor manual. Estas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas após a inoculação.

As avaliações foram realizadas aos 2 e 6 dias após inoculação (d.a.i.). O grau de severidade foi avaliado segundo a escala diagramática desenvolvida por International Rice Research Institute (IRRI, 2013) para avaliar plantas até o início da fase de perfilhamento (Anexo 4). Os dados foram analisados de forma descritiva, para incidência aos 2 e 6 d.a.i. e severidade aos 6 d.a.i.

### **3.2.3. Produção de enzimas extracelulares por isolados genitores e segregantes de *B. oryzae***

Os isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de produção das enzimas extracelulares amilase, celulase e pectinase e em meio sólido. Para isso discos de 5mm de diâmetro das colônias foram transferidos para placas de Petri contendo meio mínimo e o substrato da enzima correspondente a ser avaliada (Anexo 5), foram realizadas três repetições para cada enzima. As placas foram incubadas em câmara de crescimento por 5 dias a temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 12 horas.

Para avaliação da produção das diferentes enzimas extracelulares foi utilizada a seguinte metodologia descrita por Poloni (2008):

A produção de amilases foi observada em meio mínimo acrescentando-se 1% de amido solúvel ao meio de cultura. Após o crescimento do fungo, foi adicionado lugol à placa de Petri. O halo formado ao redor da colônia, em contraste com o meio escurecido, indicou a atividade amilolítica.

Para avaliar a produção de celulases, foi acrescentado 1% de carboximetilcelulose (CMC) ao meio mínimo. Após o crescimento fúngico, a produção de celulase extracelular foi detectada adicionando-se na placa solução de vermelho-congo por 15 minutos. Posteriormente o corante foi removido utilizando-se uma solução de NaCl 4N. A produção de celulases foi detectada pela formação de um halo alaranjado em contraste com o meio avermelhado.

Para a análise de esterases, foi utilizado meio mínimo suplementado com 1% de Tween 20 (monooleato de polioxietileno sorbitan), o qual foi autoclavado separadamente e adicionado ao meio antes de vertê-lo nas placas de Petri. Após o crescimento fúngico, as placas foram refrigeradas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 48h. A produção de esterases foi detectada pela formação de um halo esbranquiçado, visível devido à formação de cristais de sais de cálcio, em contraste com o meio transparente.

Para detectar a atividade pectinolítica foi utilizado meio mínimo modificado para pectinases acrescido de 1% de pectina cítrica. Após o crescimento do fungo, foi adicionado solução de brometo de hexadeciltrimetilamônia a 1%. O halo transparente formado ao redor da colônia, em contraste com o meio esbranquiçado, indicou a atividade pectinolítica.

A produção de protease foi observada acrescentando 4% de gelatina ao MM. Após o período de incubação foi adicionada solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cujo



precipitado tornou o agar mais opaco, revelando as zonas claras ao redor das colônias, onde ocorreu a degradação da gelatina.

A atividade enzimática foi quantificada pela relação Halo (H)/ Colônia (C), obtida pela divisão da média do diâmetro do halo nas 3 repetições pela média do diâmetro da colônia (C). Os resultados foram analisados com base na estatística descritiva, por meio de gráficos da relação H/C para cada enzima.

### **3.3. Resultados e discussão**

#### **3.3.1. Avaliação da agressividade de isolados genitores e segregantes de *B. oryzae***

A partir dos resultados na tabela 8, foi possível observar uma variação no ID e na TT comparando as populações segregantes com seus genitores nas três progênes analisadas (Apêndice 1). Em relação ao ID, na população 1 obteve-se 37,5% dos segregantes superiores aos seus genitores (segregantes 5, 7 e 8), 62,5% segregantes com ID entre os genitores, sendo que os segregantes 2, 3 e 6 encontram-se próximos do genitor LPS07.4 e o quatro segregantes próximo ao genitor LPS10.4. Na população 2, a progênie 2 apresentou ID abaixo dos seus genitores, 50% próximos do genitor LPS09.2 (progênes 1, 3, 6, 8 e 10) e 40% próximos ao genitor LPS08.1 (progênes 4, 5, 7 e 9). Por outro lado, a população 3 apresentou 75% dos segregantes superiores a ambos genitores (progênes 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11 e 12) e 25% próximos ao genitor LPS07.4.

Para a TT a população 1 apresentou 50% dos segregantes igual ao genitor LPS10.4 (progênes 1, 4, 5 e 8), 25% igual ao genitor LPS07.4 (progênie 2) e três intermediários (isolado 3, 6 e 7). Na população 3, oito progênes foram iguais ao genitor LPS07.4 e 37,5% intermediário aos genitores (progênes 5, 7 e 9). Por outro lado, a população 2 não apresentou diferença entre genitores e segregantes, apresentando 100% de transmissão semente/plântula (Tabela 8).

**Tabela 8.** Índice de doença (ID) e taxa de transmissão (TT) para os genitores e população segregantes de *Bipolaris oryzae*

<b>Isolado</b>	<b>ID</b>	<b>TT (%)</b>
Testemunha	0	0
<b>População 1- LPS010.4x LPS07.4</b>		
LPS010.4	75,2	100
LPS07.4	47,2	68
1	74,4	100
2	50,4	68
3	47,2	80
4	63,2	100
5	84,8	100
6	54,4	88
7	80,0	96
8	88,8	100
<b>População 2- LPS08.1 x LPS09.2</b>		
LPS08.1	92,8	100
LPS09.2	71,2	100
1	78,4	100
2	68,0	100
3	76,0	100
4	88,8	100
5	91,2	100
6	73,6	100
7	95,2	100
8	72,8	100
9	92,0	100
10	80,8	100
<b>População 3- LPS06.1 x LPS07.4</b>		
LPS06.1	67,2	100
LPS07.4	47,2	68
1	89,6	100
2	92,0	100
3	42,4	100
4	77,6	100
5	44,0	68
6	80,8	100
7	80,0	88
8	74,4	100
9	52,8	88
10	92,0	100
11	76,0	84
12	79,2	100

Neste estudo, pode-se inferir que todos os isolados originários da fase sexuada, quando inoculados nas sementes, foram agressivos, sendo que nenhum das progênes apresentaram TT inferior aos genitores, no mínimo igual, sendo possível observar diferentes danos nas plântulas e morte pré e pós-emergência (Figura 7).

Em relação ao ID os isolados segregantes apresentaram uma maior variação na agressividade, no entanto, 1,2 % apresentaram um ID menor que um dos genitores, e em alguns casos, como na população 3, obteve-se 75% dos indivíduos com ID superior a ambos genitores. Também foi possível observar que alguns segregantes mesmo apresentando baixo ID apresentaram elevada TT. Isso pode ser justificado pelo fato que *B. oryzae* pode-se localizar em diferentes partes das sementes (BA; SANGCHOTE, 2006) e a plântula originária desta semente ao geminar, já tem o contato direto com o fungo propiciando uma elevada TT.

Outro fator a considerar é que quando o coleóptilo, cotilédone, raiz seminal e folha primária das sementes começam a emergir apresentam tecidos mais finos e tenros, onde possivelmente as barreiras físicas das plântulas sejam mais fáceis de serem superadas pelo patógeno do que no estágio V2, como por exemplo os mecanismos pré-formados de defesa, como menor espessura da cutícula, ausência de tricomas, levando a elevadas taxas de transmissão e severidade. Assim como, os fatores pós-formados também podem ser diferentes em órgão mais jovens, por não estarem tão desenvolvidos do que em estágio mais avançado, onde a planta reconhece o patógeno e ativa seu sistema de defesa num menor tempo. Estudos afirmam que a agressividade de *B. oryzae* é reduzida quando as plantas tornam-se mais velhas (WEIKERT-OLIVEIRA et al., 2002), existindo a possibilidade de uma resistência relacionada com a idade da planta. Também deve-se levar em conta que a cultivar BRS Sinuelo CL é considerada moderadamente resistente a mancha parda, esperando-se encontrar uma baixa severidade em folha (JUNIOR et al., 2010)



**Figura 7.** Sintomas de populações genitoras e segregantes de *Bipolaris oryzae* observados na transmissão semente-plântula de arroz na cultivar BRS Sinuelo CL, segundo a escala de severidade proposta por Cardoso (2012). E0- Plântulas sem sintomas; E2- Plântulas com lesões típicas no coleóptilo; E3- Plântulas com lesões típicas no coleóptilo e folhas; E4- Plântulas com morte de pós-emergência; E5- Plântulas com morte de pré-emergência.

Em relação à inoculação em plântulas, foram observadas lesões típicas de cor marrons circulares a ovais, rodeadas por um halo castanho amarelado característico de *B. oryzae* (Figura 8). Porém nem todos os isolados foram virulentos quando inoculados nas folhas.



**Figura 8.** Lesões de *Bipolaris oryzae* em folhas de arroz do cultivar BRS Sinuelo CL

Pode-se observar no geral que a incidência de sintomas em plântulas manteve-se igual aos dois e seis dias após inoculação (d.a.i.) nas três populações. Enquanto a severidade em folha apresentou no máximo 5% de sintomas, significando uma baixa severidade (Tabela 9).

Em relação a progênie 1, a incidência foi similar nas duas datas avaliadas, variando de 5 a 15%. Os isolados 2, 3 e 7 não apresentaram sintomas quando foram inoculados nas folhas (Tabela 9).

A maior incidência foi observada na progênie 2, destacando-se o isolado 1 com o maior número de plântulas com sintomas dentro da progênie e em relação aos genitores, na qual aos 2 d.a.i. apresentou 55% de incidência, chegando a 80% aos 6 d.a.i., mostrando 55% das plantas com severidade até 1%. Também destaca-se o genitor LPS09.2 com uma incidência de 35% nas duas datas avaliadas (Tabela 9).

Para a população 3, nota-se que os primeiros sintomas nas folhas, na maioria dos isolados, foram registrados aos 6 d.a.i, na qual apresentaram até 1% de severidade. Observa-se que esta progênie mostrou um atraso no aparecimento dos sintomas quando comparadas com as demais (Tabela 9).

Os isolados quando inoculados em folhas apresentaram uma variabilidade na incidência dentro da população segregante, e também quando comparados com seus genitores. Foram observadas lesões pequenas, com baixa área foliar afetada, apresentando de 1% a 5%. Burgos et al., (2013), trabalhando com *B. oryzae* nas Filipinas, observou uma grande variação na agressividade quando inoculados em plantas susceptíveis, e associam a menor agressividade a presença de manchas pequenas, mas sugere que o mesmo isolado pode causar mais de um tipo de lesão e que este fato depende da agressividade do patógeno, idade e susceptibilidade do hospedeiro.

**Tabela 9.** Percentagem de incidência aos 2 e 6 dias após inoculação (d.a.i.) e severidade (%) aos 6 d.a.i. em plântulas segundo escala para os genitores e população segregantes.

Isolado	Incidência (%)		Escala de severidade (%)* 6 d.a.i.	
	2 d.a.i.	6 d.a.i.	Nota 1	Nota 3
<b>População 1- LPS010.4x LPS07.4</b>				
LPS10.4	5	5	0	5
LPS07.4	5	15	15	0
1	5	5	5	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	5	15	5	10
5	15	15	5	10
6	5	5	5	0
7	0	0	0	0
8	15	15	15	0
<b>População 2- LPS08.1 x LPS09.2</b>				
LPS08.1	5	5	5	0
LPS09.2	35	35	20	15
1	55	80	55	25
2	5	10	10	0
3	0	5	5	0
4	25	25	25	0
5	0	0	0	0
6	0	10	5	5
7	5	10	10	0
8	5	15	15	0
9	0	0	0	0
10	10	10	10	0
<b>População 3- LPS06.1 x LPS07.4</b>				
LPS06.1	5	5	5	0
LPS07.4	5	15	15	0
1	0	5	5	0
2	5	5	5	0
3	0	5	5	0
4	0	10	10	0
5	0	5	5	0
6	0	5	0	5
7	10	10	10	0
8	0	15	10	5
9	0	5	5	0
10	10	10	0	10
11	0	0	0	0
12	0	5	10	0

\*Escala de severidade segundo International Rice Research Institute, (2013).

Casa-Coila (2008) relata que isolados monoascóspóricos, que são progênies do cruzamento de isolados monospóricos de *Bipolaris* sp., ao retornar para fase anamórfica apresentaram variações na agressividade quando inoculados em plântulas de arroz. Estudos sobre o efeito da fase sexuada na variabilidade dos diferentes patógenos são escassos, embora tenha-se relatos que o gênero *Cochliobolus* apresenta uma elevada variabilidade na agressividade. Arab e Jawhar (2004) ao analisar a agressividade de *C. sativus* em diferentes genótipos de cevada, encontraram alta variação entre os isolados quanto à patogenicidade, indicando um indício de variabilidade. Variação em agressividade também foi observada no Nepal com isolados do mesmo fungo, onde 54% dos isolados foram moderadamente agressivos e 38% altamente agressivos (MAHTO et al., 2012).

Trabalhos similares de variabilidade em populações segregantes foram relatados nos Estados Unidos da América (EUA), onde a linhagem clonal US-11 proveniente da reprodução sexual de *Phytophthora infestans*, mostrou-se mais agressiva que seus genitores (GAVINO et al., 2000).

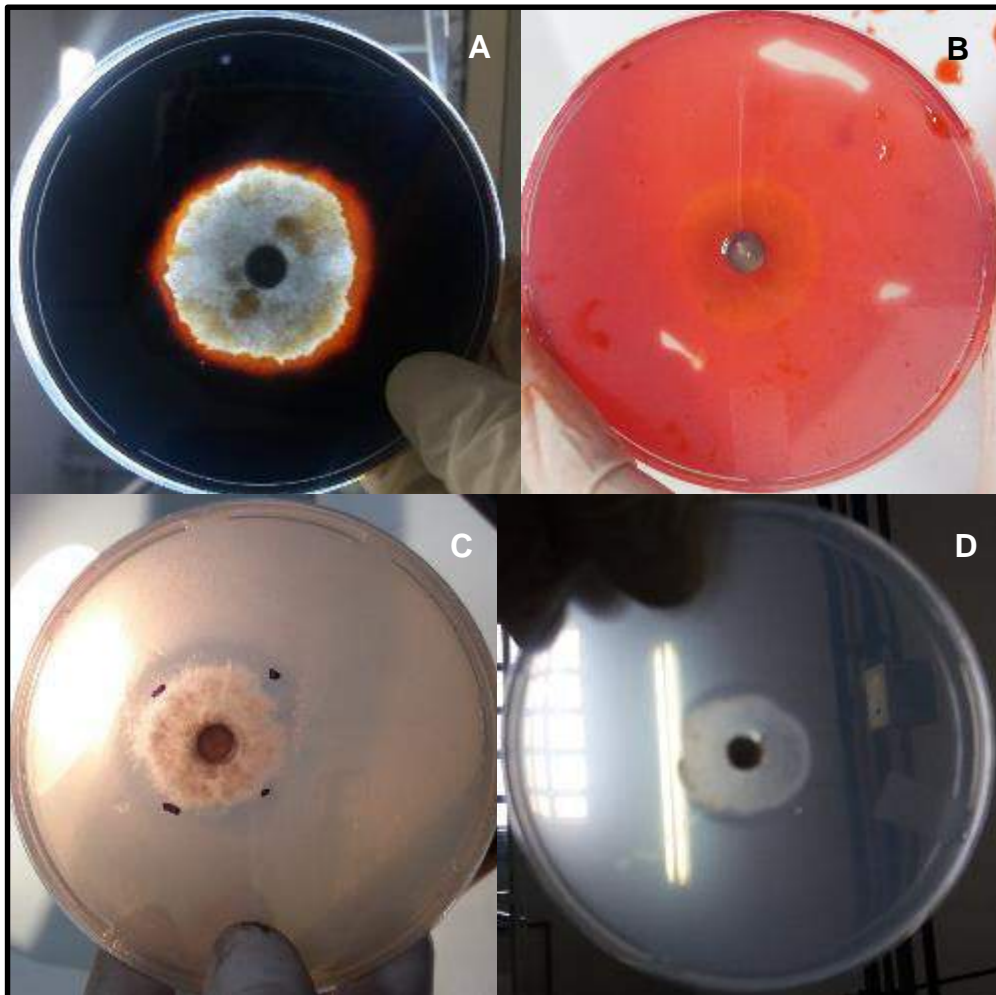
### **3.3.2. Produção de enzimas extracelulares em isolados genitores e segregantes de *B. oryzae***

Os fungos para colonizar e infestar seu hospedeiro produzem substâncias como toxinas, hormônios e enzimas, assim podem decompor ou alterar as paredes e os protoplasmas da célula vegetal, e com isso retirar os nutrientes para suas necessidades metabólicas (FERREIRA et al., 2014). Para verificar a existência de uma correlação entre a agressividade e a produção de enzimas, as progênies de *B. oryzae* foram avaliadas quanto a capacidade de produzir diferentes enzimas extracelulares (amilase, celulase, pectinase, esterase e protease), sendo estas evidenciadas pela formação de halos de degradação presentes nos meios sólidos específicos (Figura 9).

Nota-se que houveram comportamentos diferentes na produção das diferentes enzimas, sendo que a maioria dos isolados foram capazes de degradar as enzimas amilase, celulase e pectinase.

Para a enzima esterase foi observada a produção do halo somente no genitor LPS08.1, enquanto para pectina não foi observada a produção em nenhum dos isolados avaliados. Isto pode ser devido ao protocolo utilizado não ter sido

suficientemente sensível para detectar a produção destas enzimas, ou que o fungo produza-as somente em contato com hospedeiro, ou pelo fato de precisar de um maior período de contato para a expressão da produção.



**Figura 9.** Halos produzidos por hidrólise dos substratos pelas enzimas A- amilase, B- celulase, C- pectinase, D- esterase.

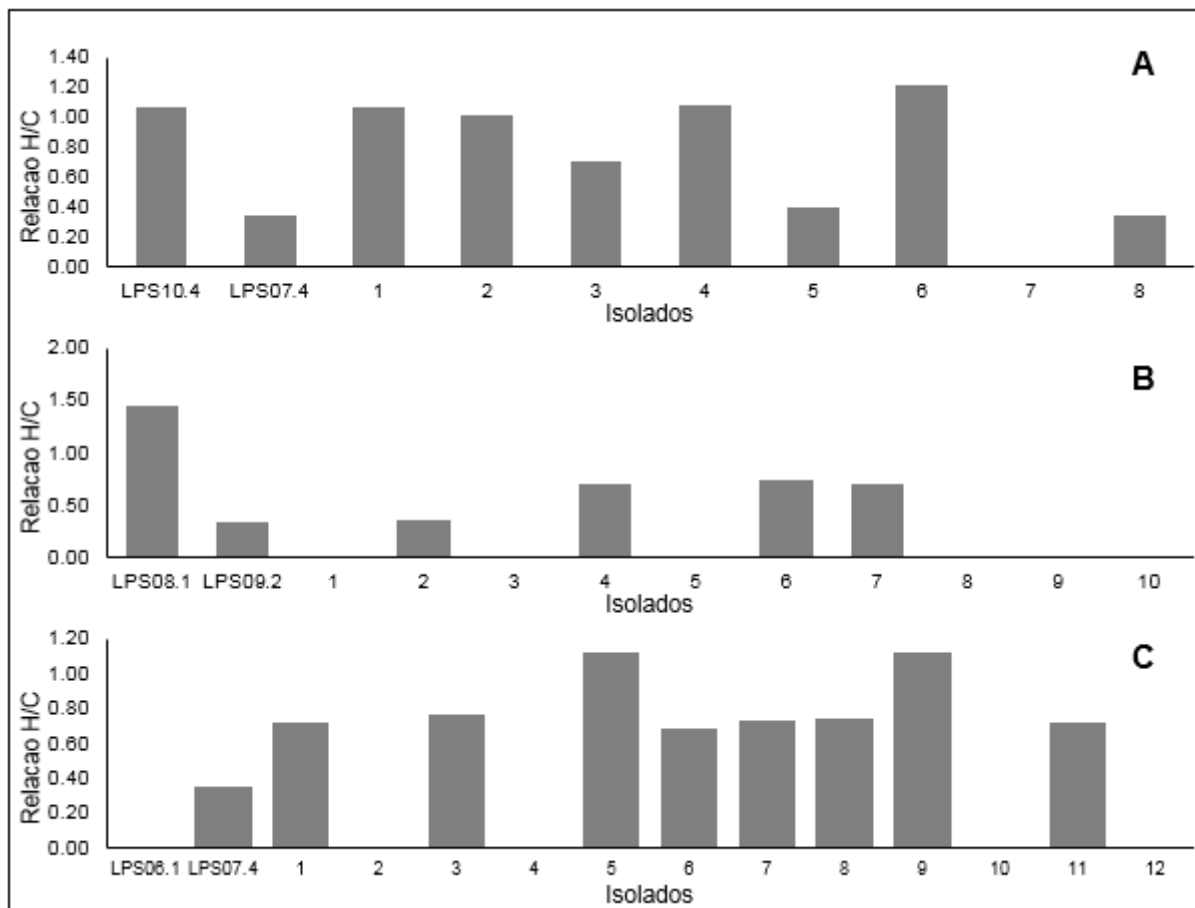
Para à atividade amilolítica, quase toda a população 1 apresentou capacidade de degradação de amido, na qual o isolado 6 foi o que teve maior valor de índice da atividade enzimática (1,22) junto com os isolados 1, 2 e 4 (1,08; 1,02 e 1,08 respectivamente) o qual tiveram um comportamento similar ao genitor LPS10.4 (1,07) (Figura 10A). Os demais isolados apresentaram comportamento semelhante ao genitor, LPS07.4 (0,35), variando de 0,35 a 0,70, a exceção do isolado 7 que não foi capaz de degradar a amilase.

Os menores valores da atividade enzimática de amilase foram observados na população 2, na qual 60% das progêneses segregantes não foi capaz de degradá-la.



Os valores médios da população segregantes variaram de 0,34 a 0,74. O genitor LPS08.1 apresentou maior atividade com uma média de 1,46 (Figura 10B).

Na população 3 observa-se que todos os isolados que formaram halos foram superiores a seus genitores, e 33% da população segregantes não mostraram atividade para esta enzima. Os valores médios variaram de 0,69 a 1,13, sendo o isolado 5 e 9 os que tiveram maior capacidade para degradar o amido (Figura 10C).



**Figura 10.** Relação Halo/Colônia dos genitores e população segregantes para atividade de amilase. A- População 1 (LPS010x07). B- População 2 (LPS08.1x09). C- População 3 (LPS06x07).

A amilose é um polímero linear constituído de unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4; a amilopectina é formada por cadeias curtas de amilose ligadas entre si de modo a formar uma estrutura ramificada por ligações  $\alpha$ -1,6. Dois tipos de polímeros estão presentes na molécula de amido: amilose e amilopectina. (Bobbio & Bobbio, 1992).

O amido constitui-se no principal polissacárideo de reserva nas células vegetais (PASCHOLATI, 2011). A maioria dos microrganismos produzem amilases, mas

desconhece-se sua atividade com a patogênese, e sua produção depende de cada gênero e espécie envolvida. Geralmente o amido pode ser usado pelos fungos como uma fonte de energia para seu desenvolvimento e esporulação (NWUFO; FAJOLA, 1988; GRIFFIN, 1994).

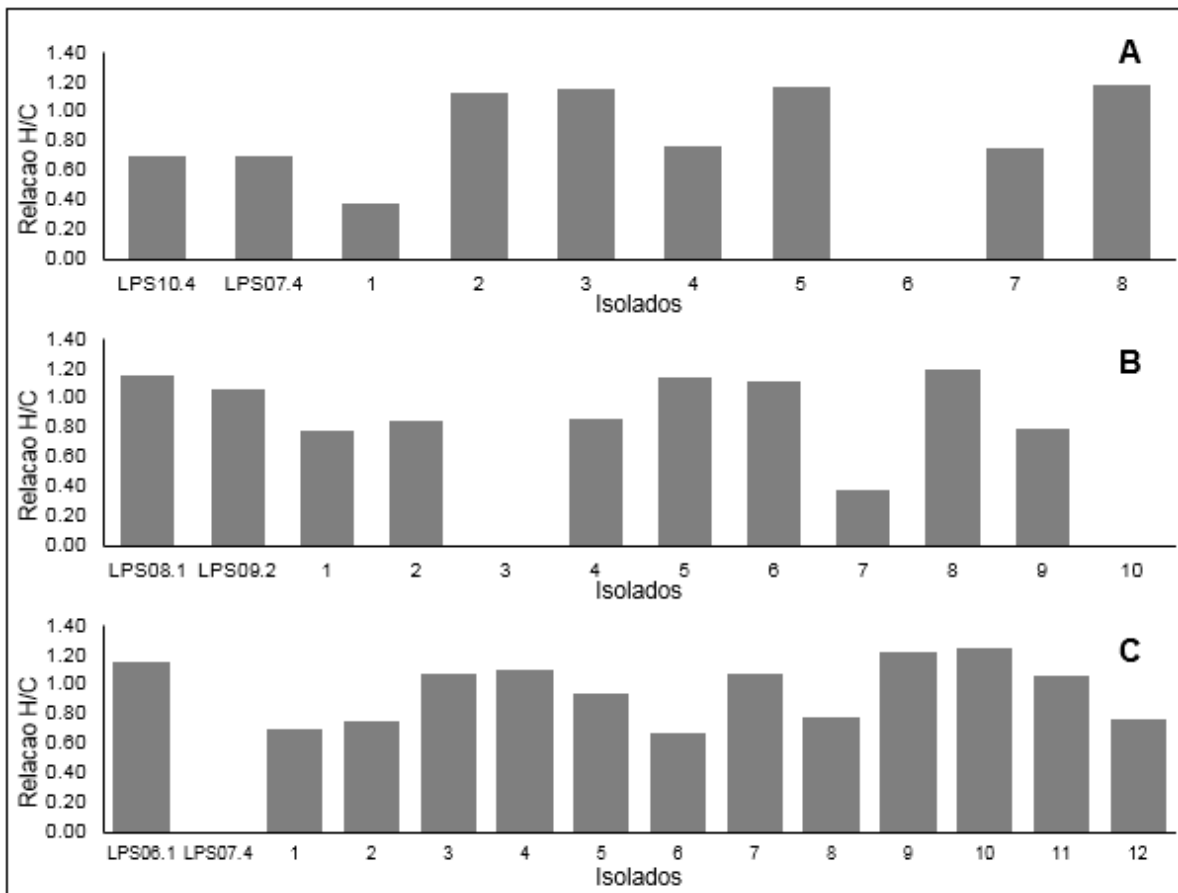
A ausência da produção de amilase *in vitro* também foi observado em outros patógenos como *Alternaria citri*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium roseum*, *F. solani*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichothecium roseum*, *Cylindrocladium spathiphylli* (EL-SHAIEB; MALIBARI, 1995; MIGOTTO et al., 2013).

Em relação atividade celulolítica, observa-se que na população 1, a maioria dos isolados apresentaram maiores valores que seus genitores, variando de 0,75 a 1,19, destacando-se o isolado 8 com maior capacidade de degradação. Porém o isolado 6 não foi capaz de degradar a enzima celulase (Figura 11A).

Na população 2, os isolados 5, 6 e 8 apresentaram valores similares aos seus genitores, enquanto que os restantes tiveram uma menor capacidade de degradar celulose, sendo o isolado 7 o que obteve menor atividade com 0,37. Também observou-se que os isolados 3 e 10 não apresentaram habilidade para degradar esta enzima (Figura 11B).

Para a população 3, observa-se os maiores valores de degradação da enzima celulose comparada com as outras progênies, na qual variou de 0,67 a 1,25, destacando-se os isolados 9 e 10 com maior atividade (Figura 11C).

A celulase é o principal componente estrutural da parede celular dos vegetais. É degradada pela hidrólise enzimática das celulases, um complexo celulolítico composto por endo- $\beta$ -1,4-glicanases, celobio-hidrolases e  $\beta$ - glicosidases, que atuam em sinergismo (BHAT, 2000). A degradação da celulose é finalizada pela liberação de moléculas de glucose (FERREIRA et al., 2014). A produção de celulose já foi detectada em *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Penicillium*, *Pythium ultimum*, *Colletotrchum* sp., porém existem poucos estudos da importância desta enzima na patogênese (PIERO; PASCHOLATI, 2000; PASCHOLATI, 2011).

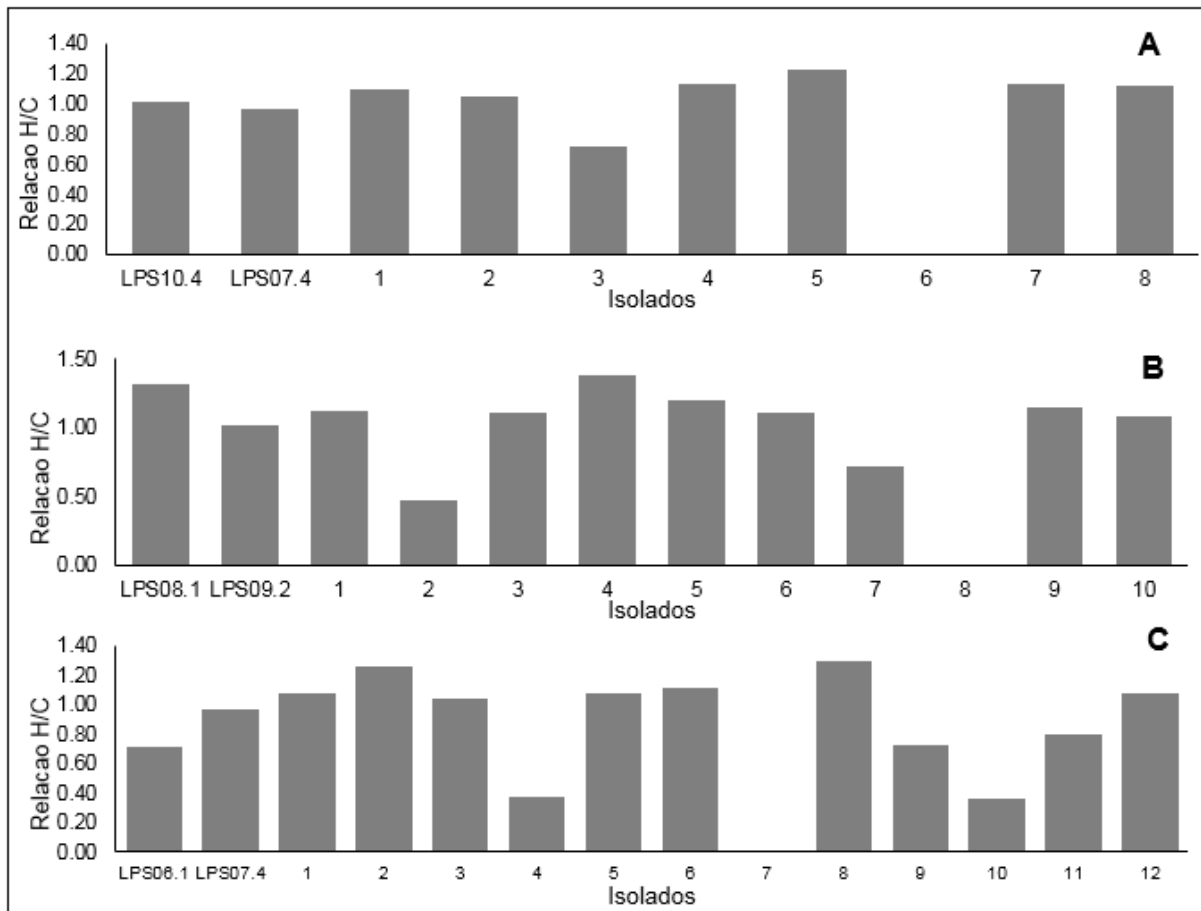


**Figura 11.** Relação Halo/Colônia dos genitores e população segregantes para atividade de celulose. A- População 1 (LPS010x07). B- População 2 (LPS08.1x09). C- População 3 (LPS06x07).

A produção de pectinase nas progêneses segregante da população 1 foi maior que seus genitores variando de 1,05 a 1,22, a exceção do isolado 3 que teve valores menores (0,71), e o isolado 6 que não teve a habilidade de degradar a pectina (Figura 12A).

Na população 2, o isolado 4 destacou-se com maior atividade em comparação com os genitores com valor médio de 1,38, e os menores valores foram obtidos nos isolados 2 e 7 com valores de 0,47 e 0,71, respectivamente. Cerca de 70% da população apresentaram atividade enzimática com valores similares aos genitores (Figura 12B).

Por outro lado para população 3, observa-se que 75% das progêneses segregante obtiveram valores acima de seus genitores, enquanto que os isolados 4 e 10 tiveram abaixo de 0,37 e 0,36 respectivamente, e o isolado 7 não foi capaz de degradar esta enzima (Figura 12C).

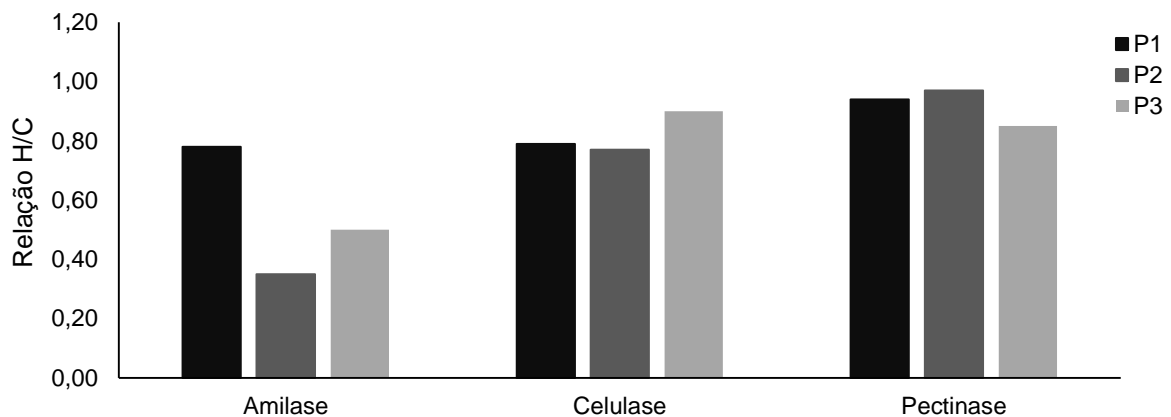


**Figura 12.** Relação Halo/Colônia dos genitores e população segregantes para atividade de pectinase. A- População 1 (LPS010x07). B- População 2 (LPS08.1x09). C- População 3 (LPS06x07).

As pectinas são constituintes importante da lamela média e da parede primária das células vegetais. As enzimas pectinases são as mais estudadas quanto a sua importância na patogenicidade, porém sua indução *in vitro* muitas vezes pode estar ligada à obtenção de nutrientes do que especificamente associada à patogenicidade.

Sua produção depende da composição do meio de cultivo, dos isolados utilizados, idade da cultura e outros fatores que possam regular sua síntese (PASCHOLATI, 2011).

Considerando-se os resultados para todas as enzimas testadas em cada população, nota-se que na figura 13 a população 1 foi a que teve maior atividade enzimática para amilase, enquanto que, para celulase a maior atividade foi para a população 3. Para pectinase, observa-se que as três populações foram similares na capacidade de degradação, variando de 0,85 a 0,97, sendo a população 3 a que obteve menores valores médios.



**Figura 13.** Médias de relação H/C por população (genitores e progênes segregantes) para cada enzima. P1= População 1. P2= População 2. P3= População 3

Fungos fitopatogênicos são capazes de produzir grande número de enzimas hidrolíticas extracelulares. O perfil enzimático constitui ferramenta alternativa, simples e rápida, para auxiliar na diferenciação de espécies ou entre isolados de uma mesma espécie fúngica (MAHMOUD E OMAR, 1994; COUTO et al., 2002). O uso de meio de cultura sólido para a detecção de enzimas produzidas por fungos tem sido utilizado há vários anos, na qual permite diferenciar isolados de uma mesma espécie de forma simples (HANKIN E ANAGNOSTAKIS, 1974).

Alguns autores correlacionam as enzimas com a patogenicidade como Singh e Saxena (1989) que descreveram que isolados de *F. solani*, patógeno de couve-flor, altamente agressivo, apresentaram tanto *in vitro* como *in vivo*, alta atividade da enzima amilase e baixa da protease. Neste estudo, observa-se que a população 2 e 3 apresentaram maior incidência de sintomas em plântulas e maior agressividade nas sementes causando morte pós e pré-emergência, mas não observaram uma correlação com as enzimas avaliadas, por serem deficientes em produzi-las.

Verifica-se uma grande variação na produção de enzimas extracelulares. Estas desempenham um papel crucial na interação hospedeiro-patógeno na degradação da parede celular dos vegetais. As três progênes conseguiram produzir em diferentes quantidades de amilase, celulase e pectinase. Esta última facilita a entrada intra e intercelular dos patógenos nas células do hospedeiro, debilitando a parede celular liberando polímeros para ser degradados pelas celulases (SONI; BHATIA, 1981).

A ausência de correlação da capacidade de degradação das enzimas avaliadas com a agressividade em sementes e folhas pode ser devido ao patógeno

utilizar outros mecanismos de ataque para penetração nos tecidos, como as fitotoxinas. Em relação a isto, estudos revelaram que fitoxinas ophiobolin A e ophiobolin B produzidas por *B. oryzae* são responsáveis pela clorose nas folhas de arroz (ORSENIGO, 1957; XIAO et al., 1991). Segundo Dallagnol et al., (2011), as fitotoxinas podem levar á acumulação de espécies reativa de oxigênio como consequência resultante da peroxidação lipídica e de fugas de eletrólitos, concluindo que este patógeno afeta principalmente a fisiologia foliar através do dano de células a nível da membrana.

Existem trabalhos em outros patosistemas confirmando os resultados observados neste estudo, onde a reprodução sexual pode favorecer a geração de novos indivíduos. De acordo com Michelmore e Ingram (1981), ressaltam a importância da fase telomórfica na epidemiologia e na geração de novos fenótipos e estruturas de sobrevivência em progênies a partir da reprodução sexual de *Bremia lactucae*. Bi et al. (2014) caracterizando a progênie de *Phytophthora capsici* quanto a resistência a fungicida na China, observaram que a reprodução sexual pode ocorrer e aumentar o desenvolvimento da resistência aos fungicidas avaliados.

O êxito da infecção e colonização dos patógenos em seus hospedeiros depende do isolado virulento, das condições ambientais assim como dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Neste estudo, observa-se uma baixa severidade das plântulas de arroz da cultivar BRS Sinuelo CL, considerada moderadamente resistente, ressaltam-se para futuras pesquisas à importante de avaliar estes isolados em cultivares que apresentam-se reação de susceptibilidade à mancha parda.

### **3.4. Conclusões**

As progênies de diferentes populações apresentam comportamentos diferentes quanto a virulência em relação a seus genitores, com severidade e incidência alta ou baixa após um ciclo sexual.

As diferentes populações apresentaram atividade enzimática distintas, na qual não puderam ser correlacionadas com a agressividade em semente e plântulas.

Todos indivíduos tiveram capacidade de degradar amido, celulose e pectinas, porém não apresentaram atividade para as enzimas esterase e protease.

## Capítulo 3

### **Variabilidade morfológica e agressividade em indivíduos descendentes de *Bipolaris oryzae* a partir da anastomose de hifas.**

#### **4.1. Introdução**

Mais da metade da população mundial tem como alimento básico o arroz (*Oryza sativa* L.). No Brasil este cereal ocupa o terceiro lugar em áreas cultivadas com culturas anuais, seguido da soja e trigo (CONAB, 2017). A safra do arroz irrigado no ano agrícola 2016/2017 foi de 10,8 mil toneladas, com 1.448 mil hectares de área plantada, destacando-se a região sul com mais de 81% da produção nacional.

No entanto, a cultura ainda não expressa todo seu potencial produtivo e de qualidade de grãos em função dos problemas fitossanitários. Entre eles destaca-se danos causados por fungos. Estes podem causar danos diretos, como diminuição no estande inicial de plantas, menor peso e número de grãos por panículas e manchas nos grãos, como também danos indiretos por queda na produtividade (SOSBAI, 2014; SCHEUERMAN, 2015).

As mudanças nos sistemas de produção da cultura do arroz no Rio Grande do Sul (RS), associada a alterações nas práticas culturais, tem modificado o comportamento da severidade das doenças endêmicas e de pouco dano econômico e o surgimento de muitas outras (NUNES, 2013). Nos últimos anos a mancha parda, causada por *Bipolaris oryzae* (Haan) Shoemaker, tem se mostrado de forma frequente nas regiões de Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SOSBAI, 2014).

A mancha parda está amplamente distribuída nas regiões orizícolas, sendo a principal doença responsável por manchas nos grãos tanto no arroz irrigado como no arroz de sequeiro, causando gessamento afetando a qualidade e o rendimento do engenho, podendo reduzir de 12 a 30% o peso dos grãos e de 18 a 22% no número de grãos cheios por panícula (PRABHU et al., 1980; SCHEUERMAN, 2015).



As sementes quando infectadas pelo fungo juntamente com os restos culturais, assim como áreas vizinhas de cultivos de arroz onde ocorre a doença, podem servir como fonte de inoculo primário. O patógeno vinculado a semente, pode sobreviver até quatro anos no seu interior, sendo disseminado, dando origem a uma epidemia se as condições climáticas forem favoráveis e o hospedeiro susceptível (FILHO; FARIAS, 2012; SCHEUERMAN, 2015). Além disso, as sementes quando infectadas apresentam um menor poder germinativo podendo causar morte das plântulas, comprometendo o estande inicial (SCHEUERMAN, 2015).

O gênero *Bipolaris* apresenta elevada variabilidade, que é uma característica típica evidenciada tanto nos aspectos morfológicos, como na agressividade (SOUSA et al., 1984; BEDENDO; PRABHU, 2005, SAFARI; ANVARI, 2010; BURGOS, et al., 2013). Entre os mecanismos que conferem variabilidade, em fungos, estão as mutações, parassexualidade, heterocariose e a recombinação somática (AZEVEDO, 1976; VIEGAS, 1989; CAMARGO, 1995; GLASS et al., 2000; MCDONALD; LINDE, 2002). Enquanto para a espécie *B. oryzae* as pesquisas quanto a estas características são escassas.

Trabalhos relacionados com a variabilidade na recombinação somática e os grupos de compatibilidade vegetativa (GCV), assim como, sobre a caracterização dos indivíduos descendentes a partir de uma anastomose de hifas em *B. oryzae* inexistem. Os GCV se caracterizam pela fusão de hifas permitindo com que ocorra a comunicação entre os compartimentos das mesmas, processo denominado anastomose (GLASS et al., 2000). Existem várias pesquisas sobre a existência de GCV em diferentes espécies de fungos como por exemplo em *Verticillium dahliae* (STRAUSBAUGH et al., 2016); *Monilinia frutícola* (DE CAL et al., 2014), *Bipolaris sorokiniana* (ARABI; JAWHAR, 2007; POLONI et al., 2009), *Colletotrichum* spp. (RODRIGUEZ-GUERRA et al., 2003), *Fusarium oxysporum* (RODRIGUEZ-MOLINA et al., 2013).

Entender a variação na população de *B. oryzae*, quanto a morfologia das colônias e agressividade, assim como os mecanismos que influenciam nas alterações genótípicas e fenotípicas podem auxiliar nas estratégias de controle da doença.

Desta forma o objetivo deste estudo foi analisar a ocorrência de compatibilidade vegetativa, assim como caracterizar os indivíduos descendentes após anastomose de hifas, em relação a variabilidade morfológica e agressividade.

## 4.2. Materiais e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (FAEM-UFPe), no Município de Capão do Leão- RS, nos anos 2015 a 2017.

Os isolados utilizados neste estudo foram provenientes da coleção do Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos, FAEM-UFPe. Tendo como origem as diferentes regiões produtoras de arroz do Rio Grande do Sul (Tabela 10), conforme estabelecido pelo Instituto Rio Grande de Arroz (IRGA).

**Tabela 10.** Isolados utilizados no experimento, segundo a cultivar, região e município

Isolado	Cultivar	Região	Município
LPS05	Irga 424	Campanha	Dom Pedrito
LPS06	Irga 424	Zona Sul	Pelotas
LPS07	Irga 424	Planície Costeira Interna	Camaquã
LPS08	Irga 424	Depressão central	Santo Antônio da Patrulha
LPS09	BRS Querência	Costa externa	Cachoeira do Sul
LPS10	Puita Inta CL	Planície Costeira Interna	Tapes
LPS12	Puita Inta CI	Planície Costeira Interna	Tapes
LPS13	Irga 424	Costa externa	Mostardas
LPS18	Irga 424 R1	Zona Sul	Rio Grande
LPS19	Irga 424 R1	Zona sul	Jaguarão
LPS17	Irga Br 424 R1	Zona Sul	São Lourenço

### 4.2.1. Avaliação da compatibilidade vegetativa entre isolados de *Bipolaris oryzae*

Foram utilizados um total de 11 isolados, na qual foram realizadas colônias monospóricas para realização dos cruzamentos vegetativos possíveis de *B. oryzae*.

Para a obtenção dos monospóricos foi feita uma suspensão de conídios com água destilada estéril, na qual 100µL de cada isolado foi transferido e espalhado sobre a superfície, utilizando meio de cultura ágar-água em placas de Petri. Posteriormente com auxílio de um microscópio estereoscópico, um único esporo foi retirado e colocado em placas com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados em sala de crescimento a 23±1°C.

Para a avaliação da compatibilidade vegetativa de isolados de *B. oryzae*, foram realizados o pareamento entre as colônias monospóricas de diferentes isolados.

Para isso, discos de micélio das colônias monospóricas, foram repicados para placas de Petri contendo meio de BDA, sendo combinados dois a dois, a uma distância de 2 cm um do outro, segundo a metodologia de Poloni et al. (2008). As placas foram mantidas em sala de crescimento a  $23\pm 1^\circ\text{C}$  e foi feito o acompanhamento do desenvolvimento das colônias diariamente (avaliação visual) por 20 dias ou até atingir o borde das placas.

As avaliações de compatibilidade foram feitas de acordo com o comportamento na área de encontro das hifas em cada combinação, sendo classificadas em três grupos de acordo com Roca et al (2004): o primeiro grupo denominado incompatíveis, foi considerado isolados que tiveram seu crescimento inibido pela presença das hifas do outro isolado, o segundo grupo denominado compatíveis vegetativamente, os isolados cresceram normalmente sem nenhuma inibição pela presença das hifas do outro isolado, e o terceiro grupo incluiu-se os isolados que apresentam comportamento intermediário, ou seja crescimento que foi afetado pela presença do outro, porém não completamente inibido, denominados parcialmente compatível.

As colônias que apresentaram compatibilidade vegetativa foram observadas a presença de anastomose, utilizando a metodologia descrita por Rodriguez - Guerra et al. (2003). Para isso, lâminas estéreis foram incorporadas em placas de Petri contendo meio BDA, e fragmentos pequenos dos isolado compatíveis foram repicados a uma distância de 0,5 cm um do outro, e incubados em sala de crescimento a  $23\pm 1^\circ\text{C}$ . Posteriormente foram observadas as regiões de crescimento das hifas, as quais foram coradas com azul de triptano-lacotefenol para observação no microscópio óptico.

Os eventos de fusão de hifas foram confirmados mediante a visualização da anastomose entre os isolados compatíveis com auxílio de um microscópio óptico utilizando aumento de 10X e 40X.

#### **4.2.2. Obtenção dos indivíduos descendentes de *B. oryzae* obtida a partir de compatibilidade vegetativa**

A partir dos isolados agrupados dentro do grupo dois, ou seja, que foram compatíveis vegetativamente, realizaram-se repicagem da linha de encontro das colônias, onde ocorreu a compatibilidade, para meio de BDA. Desta forma obteve-se um indivíduo após recombinação somática.

Posteriormente, os genitores e os indivíduos resultantes foram caracterizados morfológicamente, quanto as características macroscópicas das colônias e microscópicas dos conídios, crescimento micelial e esporulação. Como também foi avaliada a agressividade dos isolados na transmissão das sementes para plântulas de arroz. Sendo estas variáveis comparadas com as dos respectivos genitores para a observação da variabilidade dos indivíduos descendentes.

#### **4.2.3. Avaliação morfológica das colônias, crescimento micelial e esporulação**

Para análise da morfologia macroscópica, colocou-se um disco (5mm) de micélio no centro de cada placa contendo meio BDA. As placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25±1°C e fotoperíodo 12 horas.

As colônias foram avaliadas quanto as características macroscópicas observando-se a forma, margem e elevação de acordo com a chave descrita por Microbiology Society (2016) (Anexo 2), assim como a coloração com auxílio da escala de Mussel (1954) e presença de setores. Para a avaliação das características microscópicas dos conídios, primeiramente foram realizadas lâminas microscópicas, contendo fragmentos do fungo e, com ajuda de um microscópio óptico foram capturadas fotos. Estas, posteriormente foram analisadas com auxílio do software Motic Images Plus 2.0 (2010), onde foram realizadas as medições de comprimento e largura dos conídios, contagem do número de septos, de 20 esporos para cada isolado.

Posteriormente, foi aplicado teste T para comprimento e largura por apresentarem uma distribuição normal e teste de Mann-Whitney para o número de septos para distribuição anormal, sendo este último um teste não paramétrico utilizado para variáveis quantitativas discretas; com duas amostras independentes.

Para o crescimento micelial, as avaliações foram efetuadas diariamente até o sétimo dia, levando-se em consideração a média de dois diâmetros ortogonais das colônias em desenvolvimento. Foi avaliado o índice de crescimento micelial (ICM) a partir da fórmula:

$$ICM = \frac{C1 + C2 + \dots + C7}{N1 + N2 + \dots + N7}$$

Onde: ICM= índice de crescimento micelial; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>7</sub> = crescimento das colônias na primeira, segunda e última avaliação; N1, N2 e N7 número de dias (REY et al., 2005).

Foi avaliado a esporulação dos genitores e dos indivíduos resultantes, para isto cinco discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados de igual maneira para toda as colônias e colocados em tubos de ensaio com 5mL de água estéril autoclavada e agitados por 5 segundos em agitador. Posteriormente, suspensões foram retiradas para a contagem de esporos com auxílio da câmara de Neubauer.

#### **4.2.4. Avaliação da agressividade dos genitores e indivíduos descendentes**

Para a avaliação da agressividade dos isolados compatíveis vegetativamente e dos indivíduos resultantes de *B. oryzae*, foram utilizadas sementes de arroz do cultivar BRS Sinuelo CL, fornecido pela Embrapa Clima Temperado, classificada como moderadamente resistente a mancha parda.

As sementes foram inoculadas artificialmente pelo método de condicionamento osmótico, a fim de evitar a germinação durante o processo de inoculação (COUTINHO et al., 2001). Para isto, discos de micélio de 5mm foram transferidos para placas com meio BDA modificado osmoticamente, com sacarose a -0,6 Mpa e incubados a 25±1°C, com fotoperíodo de 12 horas luz.

Após cinco dias de crescimento do fungo, as sementes, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, foram depositadas sobre as colônias, separadamente e em camada única, e incubadas 23±1°C em fotoperíodo de 12 horas por 72horas. A testemunha consistiu em sementes desinfetadas e depositadas sobre o meio BDA modificado osmoticamente sem o fungo. Após o tempo de inoculação, as sementes foram retiradas das placas, desinfestadas novamente com hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, e secadas em estufa com circulação de ar a 30°C por três horas.

Posteriormente, as sementes foram plaqueadas em caixas plásticas do tipo gerbox, contendo papel mata borrão umedecido, e foram incubadas 23±1°C com fotoperíodo de 12 horas luz, por sete dias. Após esse tempo, 25 sementes por isolados com o mesmo potencial de inóculo foram transferidas para copos plásticos (de 50mL) com vermiculita estéril. Os copos foram acondicionados dentro de caixas plásticas e

em câmara de incubação a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas luz e irrigação diária por sete dias, para avaliação da transmissão da doença.

Para avaliação da severidade da doença, os sintomas foram classificados de acordo com a escala do grau das lesões estabelecidas por Cardoso (2012), (Anexo 3), atribuindo-se: E0 = plântulas sem sintoma, E1 = plântulas com lesões típicas nas folhas, E2 = plântulas com lesões típicas no coleótilo, E3 = plântulas com lesões avaliação de sintomas típicas no coleótilo e folhas, E4 = morte pós-emergência, E5 = morte de pré-emergência.

Os valores obtidos de cada isolado foram utilizados para calcular a incidência das escalas de severidade em plântulas (E1 a E5), índice de doença (ID%) e taxa de transmissão (TT%).

O cálculo do índice da doença (ID) das plântulas foi realizado de acordo com a fórmula estabelecida por Mckinney (1923):

$$\text{ID (\%)} = \frac{\sum(\text{Valor da escala} \times \text{N}^\circ \text{ de plântulas com esta nota})}{\text{N}^\circ \text{ de plântulas} \times \text{valor máximo da escala de notas}} \times 100$$

A taxa de transmissão TT (%), foi calculada seguindo a fórmula utilizada anteriormente por Malavolta et al. (2002):

$$\text{TT(\%)} = \frac{\text{Incidência de plantulas com sintoma}}{\text{Incidencia do patógeno na semente}} \times 100$$

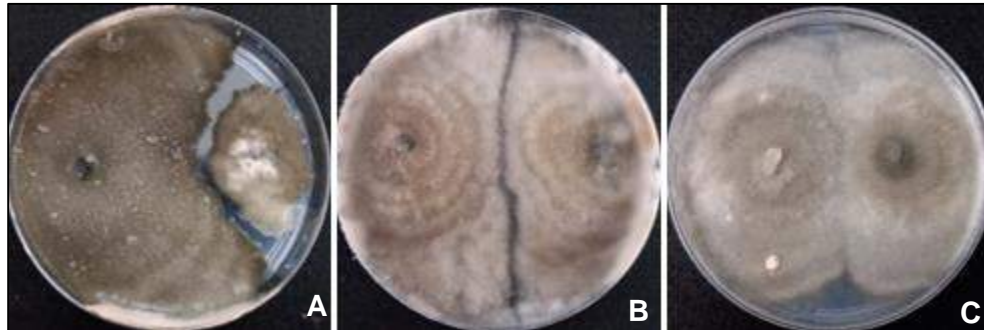
Plântulas com sintomas típicos foram acondicionadas em caixas plásticas com papel umedecido, incubando-se a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas luz por 48 horas para indução da esporulação, posteriormente foram analisadas em microscópio óptico a presença das estruturas características do agente causal eram referentes ao isolado inoculado nas sementes.

### **4.3. Resultados e discussão**

#### **4.3.1. Avaliação da compatibilidade vegetativa entre isolados de *Bipolaris oryzae***

A partir dos 55 cruzamentos identificou-se três grupos, conforme a classificação de Rocca (2004), em incompatíveis, parcialmente compatível e compatíveis (Figura 14). Sendo que, 9% destes cruzamentos foram classificados

como incompatível, 23% como compatível e 68% como parcialmente compatível (Tabela 11). Todos os isolados quando confrontados entre si mostraram-se compatível vegetativamente.



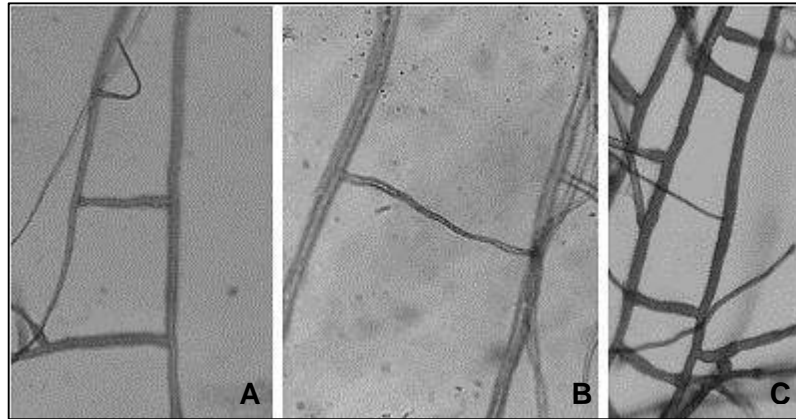
**Figura 14.** Compatibilidade vegetativa entre os isolados de *Bipolaris oryzae*. A- Cruzamento incompatível entre os isolados LPS06.1 e LPS10.1. B- Cruzamento parcialmente compatível entre os isolados LPS13.1 e LPS09.1. C- Cruzamento compatível entre os isolados LPS19.1 e LPS05.1.

Nos cruzamentos compatíveis as colônias apresentaram uma superposição, onde os isolados cresceram normalmente, sem nenhuma inibição pela presença das hifas do outro isolado. Nestes cruzamentos, foi possível observar no microscópio óptico, a anastomoses entre as hifas mediante pontes entre as células das hifas paralelas (Figura 15).

**Tabela 11.** Compatibilidade vegetativa dos isolados de *Bipolaris oryzae*

Isolados	LPS 08.1	LPS 09.1	LPS 17.1	LPS 19.1	LPS 05.1	LPS 13.1	LPS 12.2	LPS 18.1	LPS 07.1	LPS 10.1	LPS 06.1
LPS08.1	x	PC*	PC	PC	PC	PC	PC	C	PC	I	PC
LPS09.1		x	C	C	PC	PC	PC	C	I	PC	PC
LPS17.1			x	C	C	PC	PC	PC	PC	PC	I
LPS19.1				x	C	C	PC	PC	C	PC	PC
LPS05.1					x	PC	PC	C	PC	PC	PC
LPS13.1						x	C	PC	PC	PC	PC
LPS12.2							x	PC	PC	PC	PC
LPS18.1								x	PC	C	PC
LPS07.1									x	C	I
LPS10.1										x	I
LPS06.1											x

\*I= Incompatível. C= compatível, PC= parcialmente compatível



**Figura 15.** Anastomose de hifas do tipo H entre os isolados de *Bipolaris oryzae*. A- Entre os isolados LPS07.1 e LPS19.1. B- entre os isolados LPS18.1 e LPS09.1. C- entre os isolados LPS19.1 e LPS17.1.

De acordo com Glass et al. (2000), em isolados incompatíveis pode-se observar uma barreira na região de contato indicando a morte das hifas. Isto está de acordo com o observado em 9% dos cruzamentos deste trabalho, indicando a incompatibilidade entre os isolados.

Neste estudo foram poucos os isolados incompatíveis comparados com o trabalho de Poloni et al. (2009), no qual observaram que 58% dos 31 cruzamentos testados para *B. sorokiniana* foram incompatíveis, e somente 13% foram compatíveis. Os autores ressaltam a importância de estudar-se a formação da fase sexuada do fungo devido à baixa compatibilidade encontrada, visto que a fusão das hifas antecede a formação de heterocariose na recombinação sexual e parassexual, mecanismos responsáveis pela variabilidade genética.

De acordo com os testes de compatibilidade, pode-se diferenciar 10 grupos vegetativamente compatíveis (GVC), onde dentro de cada grupo os isolados são compatíveis entre eles (Tabela 12). Os dois primeiros grupos estão compostos por três isolados, e os demais por somente dois isolados. Foi possível constatar que não houve uma correlação entre os GVC e o local geográfico, já que isolados da mesma região foram compatíveis, como por exemplo LPS09.1 e LPS17.1 da região Sul, mas não foram compatíveis com o isolado LPS18.1 da mesma localidade. O mesmo aconteceu para os isolados LPS09 e LPS13, ambos da região Costa Externa, na qual mostraram-se parcialmente compatíveis.



**Tabela 12.** Grupos de compatibilidade vegetativa entre diferentes isolados de *Bipolaris oryzae*

<b>Grupo vegetativamente compatível (GVC)</b>	<b>Isolados</b>
GVC I	LPS09.1/ LPS17.1/ LPS19.1
GVC II	LPS05.1/ LPS17.1/ LPS19.1
GVC III	LPS13.1/ LPS12.2
GVC IV	LPS13.1/ LPS19.1
GVC V	LPS18.1/ LPS08.1
GVC VI	LPS18.1/ LPS09.1
GVC VII	LPS18.1/ LPS05.1
GVC VIII	LPS07.1/ LPS19.1
GVC IX	LPS10.1/ LPS18.1
GVC X	LPS10.1/ LPS07.1

Neste estudo a avaliação da compatibilidade foi feita em meio de cultura BDA, segundo Poloni et al. (2009) ao avaliarem a compatibilidade de *B. sorokiniana* em diferentes meios de crescimentos, e afirmam que os isolados podem responder de forma diferentes segundo o meio de cultura, ou seja, que a disponibilidade de nutrientes é um fator que pode estar influenciando na compatibilidade vegetativa. Talvez muitos dos cruzamentos que classificaram-se como parcialmente compatíveis apresentem um comportamento distinto em outros meios com diferentes nutrientes.

Muitos estudos têm verificado a variabilidade da compatibilidade vegetativa em vários patossistemas. Como por exemplo em *Cochliobolus sativus* onde os pesquisadores Arabi e Jawhar (2007), a partir de 40 isolados avaliados, foram agrupados em três grupos. Roddriguez-Guerra et al. (2003), trabalhando com 19 isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* formaram oito grupos. De Cal et al. (2014), trabalhando com *Monilinia fruticola* identificaram cinco grupos compatíveis vegetativamente quando utilizados meios de cultura deficiente em nitrogênio e seis grupos quando o meio foi BDA. No entanto, para *B. oryzae* este é o primeiro estudo sobre a variabilidade da compatibilidade vegetativa entre diferentes isolados.

#### **4.3.2. Avaliação morfológica das colônias e crescimento micelial dos genitores e descendentes**

Foram avaliadas as características macroscópicas e microscópicas das colônias, assim como também seu crescimento micelial ao longo do tempo, dos

indivíduos descendentes e comparadas com seus respectivos genitores para observação da variabilidade após anastomose de hifas.

Quanto às características macroscópicas pode-se observar que a coloração das colônias teve uma elevada variação onde os indivíduos descendentes em sua maioria apresentaram coloração cinza esverdeado, variando para cinza escura, diferenciando-se dos genitores que obtiveram em sua maioria coloração cinza (Tabela 13).

Em relação à ausência ou presença de setores nas colônias, observou-se que a maioria dos indivíduos descendentes foram capazes de formar setores, exceto para os indivíduos LPS19x07 e LPS09x17 (Tabela 13). Visto que, esta é uma importante característica para auxiliar no estudo da variabilidade, podendo ser uma possível causa de geração de novas variantes genéticas.

A formação dos setores nas colônias revela mutações somáticas que podem ocorrer por erros na duplicação cromossômica durante a mitose (KISTLER; MIAO, 1992; CAMARGO, 1995). Os indivíduos descendentes que não formaram setores tiveram menor crescimento micelial comparados com os demais que formaram, segundo Artigiani e Bedendo (1966) após anastomose, os núcleos haploides fundiram-se, resultando em uma colônia diploide, apresentando um crescimento micelial mais rápido que a haploide, provocando-se sua formação.

**Tabela 13.** Características morfológicas das colônias dos genitores e suas progênes a partir de anastomose de hifas de *Bipolaris oryzae*

Isolado	Forma*	Margem*	Elevação*	Coloração**	Setor
LPS17.1	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS05.1	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza (5/N Gley 1)	P
LPS17x05	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	P
LPS08.1	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	A
LPS18.1	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS08x18	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	P
LPS13.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	P
LPS12.2	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
LPS13x12	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	P
LPS13.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	P
LPS07.1	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
LPS13x07	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (6/10Y Gley 1)	P
LPS19.1	Circular	Undulate	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS07.1	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A

LPS19x07	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	A
LPS17.1	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS19.1	Circular	Undulate	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS17x19	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	P
LPS09.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	P
LPS18.1	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS09x18	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado escuro (4/10Y Gley 1)	P
LPS09.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	P
LPS17.1	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS09x17	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza esverdeado muito escuro (3/10Y Gley 1)	A
LPS19.1	Circular	Undulate	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS13.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	P
LPS13x19	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	P
LPS19.1	Circular	Undulate	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS05.1	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza (5/N Gley 1)	P
LPS05x19	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	P
LPS05.1	Irregular	Filiforme	Umbonada	Cinza (5/N Gley 1)	P
LPS18.1	Irregular	Inteiro	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS18x05	Filamentosa	Filiforme	Umbonada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	P
LPS07.1	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (5/10Y Gley 1)	A
LPS10.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza escuro (4/N Gley 1)	A
LPS10x07	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado (6/10Y Gley 1)	P
LPS09.1	Irregular	Filiforme	Elevada	Cinza (6/N Gley 1)	P
LPS19.1	Circular	Undulate	Elevada	Cinza (5/N Gley 1)	A
LPS19x09	Filamentosa	Filiforme	Elevada	Cinza esverdeado escuro (4/10Y Gley 1)	P

\* Forma, margem e elevação segundo chave descrita por Microbiology Society (2016).

\*\* Coloração das colônias segundo escala de solos de Mussel (1954).

\*\*\*P= presença de setores/ A= Ausência de setores

Para as características microscópicas, como comprimento, largura e número de septos, somente foi detectada diferença significativa quando comparado os indivíduos LPS08x18, LPS09x17 e LPS10x07 para seus dois genitores em relação ao comprimento dos conídios (Tabela 14, Figura 16) e os indivíduos LPS13x12, LPS19xLPS07, LPS19x09 e LPS18x05 para a largura dos conídios. Já para o número de septo a maioria dos indivíduos descendentes apresentaram diferença significativa para os dois genitores (Tabela 14).

Em relação ao ICM, a maioria dos indivíduos descendentes obtiveram valores entre os apresentados pelos genitores. Os indivíduos LPS13x12, LPS13x19 e LPS18x05, foram 60%, 11% e 3% superiores respectivamente, em relação ao genitor de maior valor. Para LPS19x07 e LPS09x17 o ICM foi 26% inferior e para LPS17x19 foi de 19% inferior, em relação aos genitores de menor valor (Tabela 14).

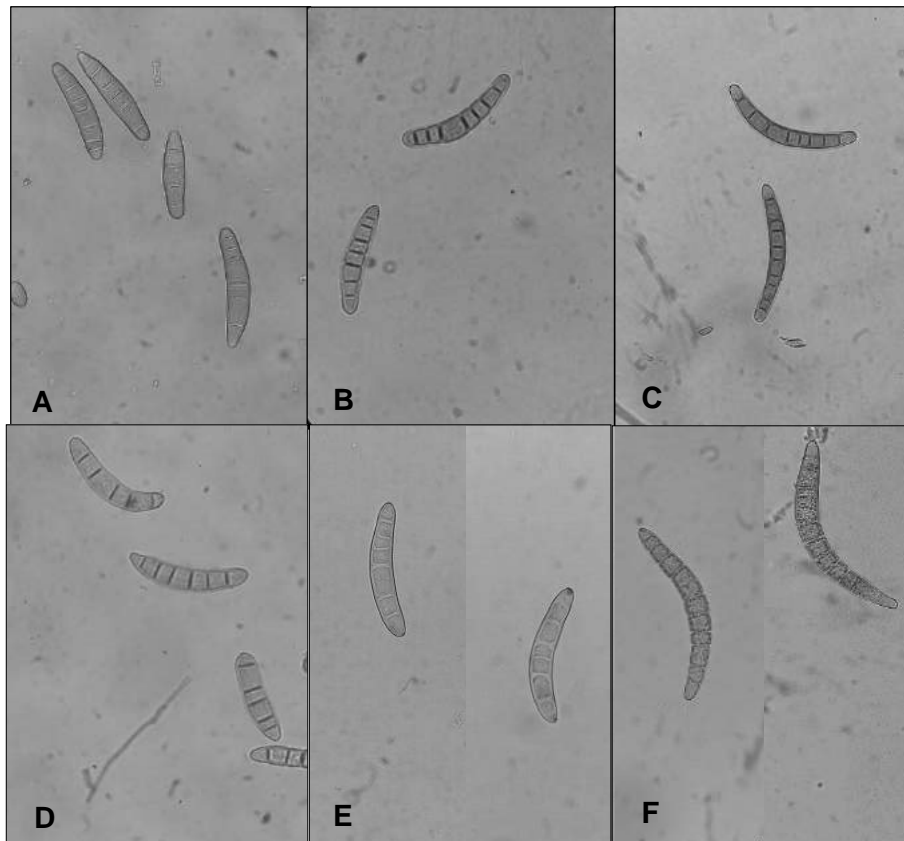
**Tabela 14.** Comprimento, largura e número de septos médio, máximo e mínimos, e índice de crescimento micelial (ICM) dos genitores e descendentes de cruzamentos compatíveis vegetativamente de *Bipolaris oryzae*.

Isolado	Comprimento		Largura		Septo		ICM
	Média	Min - Max	Média	Min - Max	Média	Min - Max	
LPS17.1	65,2 <sup>ns</sup>	47,9 - 79,9	13,8 <sup>ns</sup>	12,4 - 15,8	5 <sup>α</sup>	3 - 7	11,67
LPS05.1	73,6 <sup>ns</sup>	54,5 - 87,1	13,6 <sup>ns</sup>	12,2 - 15	5 <sup>α</sup>	4 - 7	7,68
LPS17x05	92,2	66,6 - 139,9	13,9	11,5 - 15,7	8	4 - 11	8,88
LPS08.1	86,2*	70,7 - 102,5	14,7 <sup>ns</sup>	10,7- 18,1	7 <sup>α</sup>	5 - 9	7,15
LPS18.1	72,4*	57,0 - 90,7	13,8 <sup>ns</sup>	11,5 - 15,9	6 <sup>α</sup>	5 - 7	11,74
LPS08x18	112,3	71,5 - 129,2	14,3	10,1 - 16,4	10	7 - 13	11,73
LPS13.1	90,2*	43,0 - 119,4	14,8*	11,2- 15,7	7 <sup>ns</sup>	5 - 9	9,78
LPS12.2	76,5 <sup>ns</sup>	57,4 - 97,1	14,6*	12,8 - 17,0	6 <sup>α</sup>	5 - 9	9,97
LPS13x12	100,7	74,5 - 126,6	13,1	11,0 - 13,9	8	7 - 13	16,12
LPS13.1	90,2 <sup>ns</sup>	43,0 - 119,4	14,8 <sup>ns</sup>	11,2- 15,7	7 <sup>α</sup>	5 - 9	9,78
LPS07.1	63,6*	43,7 - 83,1	12,1*	9,7 - 15,0	4 <sup>α</sup>	3- 6	18,32
LPS13x07	103,3	76,2 - 123,9	13,6	11,2 - 15,5	9	6 - 11	11,77
LPS19.1	67,6 <sup>ns</sup>	53,3 - 82,5	13,9*	11,6 - 16,8	6 <sup>ns</sup>	4 - 7	12,53
LPS07.1	63,6 <sup>ns</sup>	43,7 - 83,1	12,1*	9,7 - 15,0	4 <sup>α</sup>	3- 6	18,32
LPS19x07	79,1	52,1 - 120,5	10,9	8,4 - 12,2	6	3 - 10	9,24
LPS17.1	65,2 <sup>ns</sup>	47,9 - 79,9	13,8 <sup>ns</sup>	12,4 - 15,8	5 <sup>α</sup>	3 - 7	11,67
LPS19.1	67,6 <sup>ns</sup>	53,3 - 82,5	13,9 <sup>ns</sup>	11,6 - 16,8	6 <sup>α</sup>	4 - 7	12,53
LPS17x19	98,61	55,0 - 123,8	12,9	12,3 - 18,0	8	5 - 11	9,47
LPS09.1	69,6 <sup>ns</sup>	48,4 - 86,4	12,5 <sup>ns</sup>	9,7 - 15,2	5 <sup>α</sup>	3 - 7	13,02
LPS18.1	72,9 <sup>ns</sup>	57,0 - 90,7	13,8 <sup>ns</sup>	11,5 - 15,9	6 <sup>α</sup>	5 - 7	11,74
LPS09x18	84,9	71,1 - 98,0	13,5	11,6 - 15,2	8	6 - 10	12,29
LPS09.1	69,6*	48,4 - 86,4	12,5 <sup>ns</sup>	9,7 - 15,2	5 <sup>α</sup>	3 - 7	13,02
LPS17.1	65,2*	47,9 - 79,9	13,8 <sup>ns</sup>	12,4 - 15,8	5 <sup>α</sup>	3 - 7	11,67
LPS09x17	92,7	68,8 - 131,3	11,1	9,1 - 12,9	9	6 - 12	8,64
LPS19.1	67,6*	53,3 - 82,5	13,9*	11,6 - 16,8	6 <sup>ns</sup>	4 - 7	12,53
LPS13.1	90,2*	43,0 - 119,4	14,8*	11,2- 15,7	7 <sup>ns</sup>	5 - 9	9,78
LPS13x19	88,8	79,2 - 105,4	13,2	10,6 - 18,1	9	8 - 10	13,89
LPS19.1	67,6*	53,3 - 82,5	13,9 <sup>ns</sup>	11,6 - 16,8	6 <sup>α</sup>	4 - 7	12,53
LPS05.1	73,7 <sup>ns</sup>	54,5 - 87,1	13,6 <sup>ns</sup>	12,2 - 15	5 <sup>α</sup>	4 - 7	7,68
LPS05x19	90,9	67,7 - 127,5	14,3	10,7 - 19,8	9	5 - 11	10,53
LPS05.1	73,7*	54,5 - 87,1	13,6*	12,2 - 15	5 <sup>α</sup>	4 - 7	7,68
LPS18.1	72,4 <sup>ns</sup>	57,0 - 90,7	13,8 <sup>ns</sup>	11,5 - 15,9	6 <sup>α</sup>	5 - 7	11,74
LPS18x05	102,0	87,7 - 130,8	14,9	12,8 - 16,5	8	5 - 10	12,07
LPS07.1	63,5 <sup>ns</sup>	43,7 - 83,1	12,1*	9,7 - 15,0	4 <sup>α</sup>	3- 6	18,32
LPS10.1	68,9*	52,2 - 81,5	14,3*	11,8 - 16,6	6 <sup>α</sup>	5 - 8	5,42
LPS10x07	111,8	75,7 - 108,4	15,0	12,0 - 17,7	8	7 - 10	17,63
LPS09.1	69,6*	48,4 - 86,4	12,5*	9,7 - 15,2	5 <sup>α</sup>	3 - 7	13,02
LPS19.1	67,6*	53,3 - 82,5	13,9 <sup>ns</sup>	11,6 - 16,8	6 <sup>α</sup>	4 - 7	12,53
LPS19x09	95,7	72,9 - 103,5	14,5	12,6 - 14,1	9	9 - 10	11,35

Médias dos genitores acompanhadas por \* diferem de sua progênie pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ).

Médias dos genitores acompanhadas por <sup>α</sup> diferem de sua progênie pelo teste Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ).

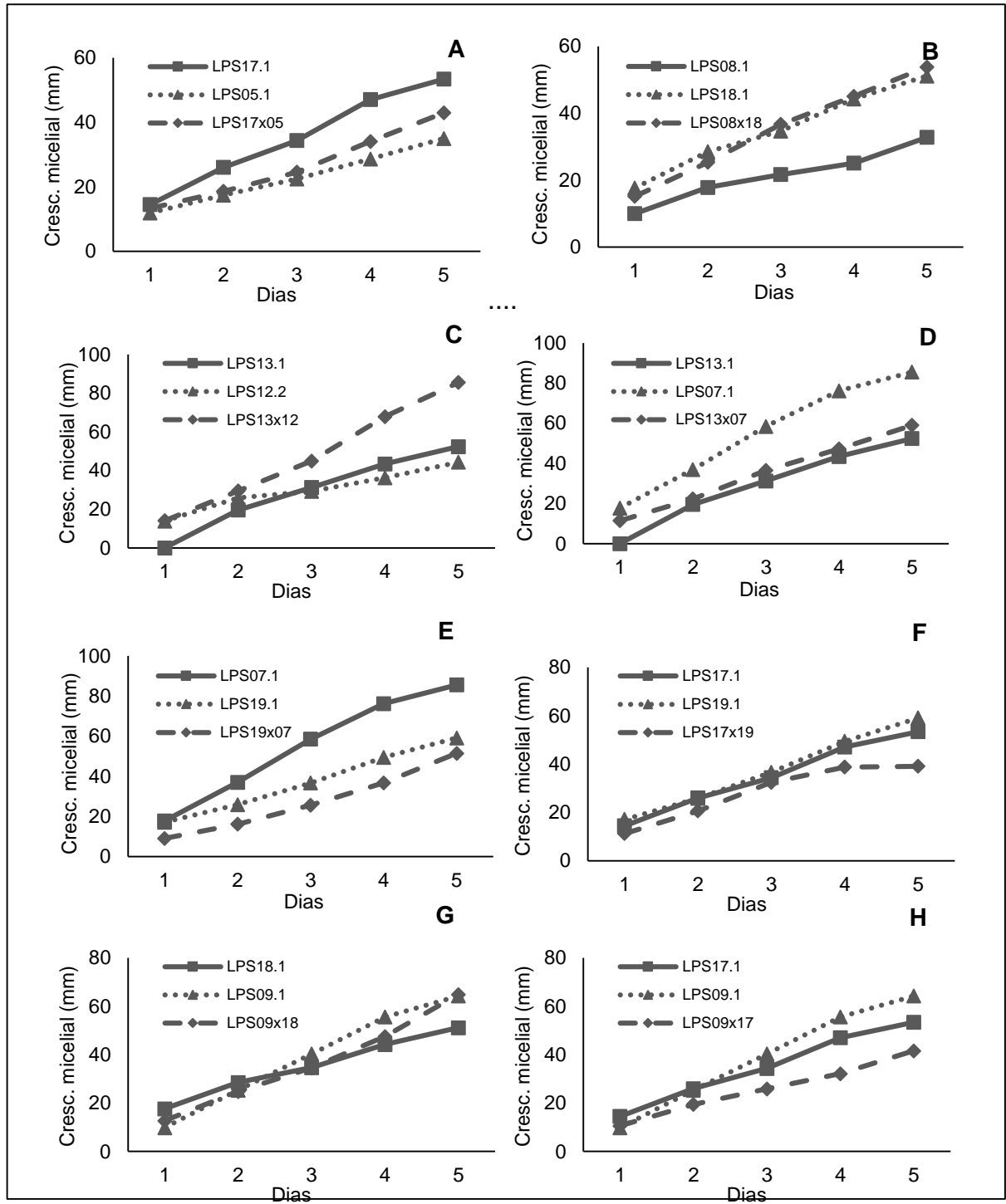
<sup>ns</sup>= não apresentam diferenças significativas.



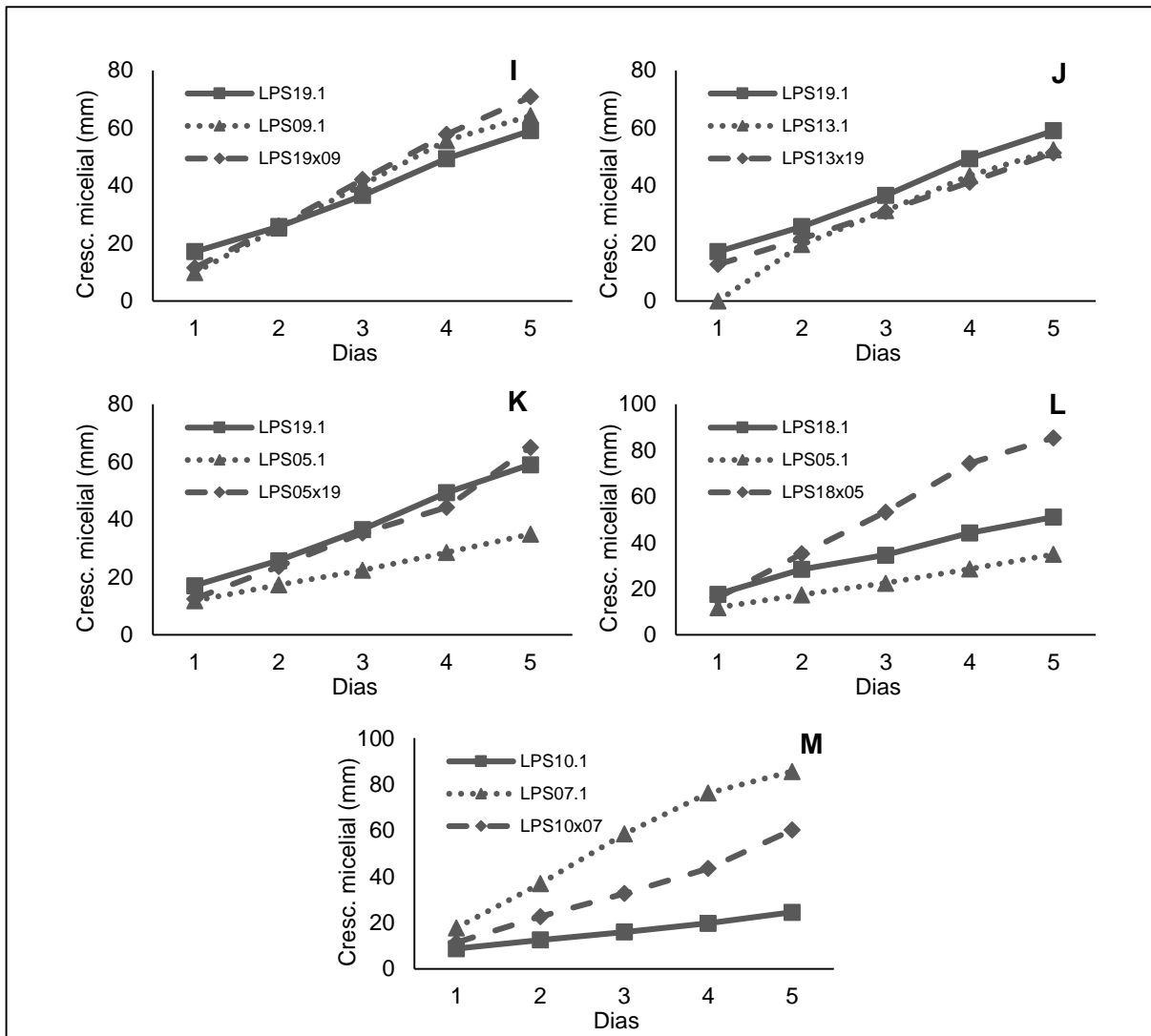
**Figura 16.** Conídios de genitores e descendentes de *Bipolaris oryzae* após anastomose de hifas. A- LPS17, B- LPS09, C- LPS09x17 D- LPS18, E- LPS08, F- LPS08x18.

A partir das colônias compatíveis obteve-se o crescimento micelial dos indivíduos descendentes e este foram comparados com seus genitores. Observa-se na figura 17 que existem indivíduos que apresentaram comportamento similar aos seus genitores, onde a curva de crescimento micelial ao longo dos dias situa-se entre as curvas de seus respectivos genitores (Figura 17A, B, D, F, H, J, K e M).

Embora, obteve-se indivíduos onde o crescimento micelial ao longo dos dias foram diferentes aos seus respectivos genitores, alguns apresentaram crescimento superior (Figura 17C e L) e outros inferiores (Figura 17F e H).



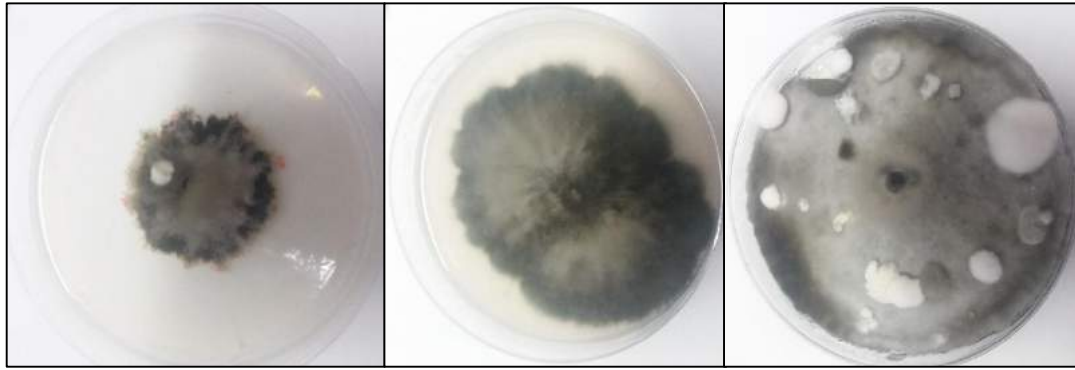
**Figura 17.** Crescimento micelial médio ao longo dos dias por genitores e indivíduo produzido a partir dos cruzamentos compatíveis de *Bipolaris oryzae*.



**Figura 17 (Cont.).** Crescimento micelial médio ao longo dos dias por genitores e indivíduo produzido a partir dos cruzamentos compatíveis de *Bipolaris oryzae*.

Baseado no crescimento micelial das colônias aos cinco dias obteve-se isolados com lento, moderado e rápido crescimento (Figura 18), segundo as categorias sugeridas por Kumari et al., (2015). Nota-se que três dos indivíduos descendentes tiveram um rápido crescimento quando comparados com seus respectivos genitores na qual foram de lento a moderado (Tabela 15).

O crescimento micelial é um parâmetro que vem sendo utilizado para abordar diferenças quanto à agressividade do patógeno. Desta forma, isolados após serem submetidos a uma recombinação obtiveram alterações em seu crescimento. Este rápido crescimento em patógenos, pode-se tornar uma vantagem no momento da colonização dos hospedeiros, podendo causar danos num menor espaço de tempo.



**Figura 18.** Classificação das colônias quanto ao crescimento micelial. A- crescimento lento, LPS17xLPS19. B- crescimento moderado, LPS19x07. C- crescimento rápido, LPS18x05

**Tabela 15.** Crescimento micelial e classificação dos isolados de *Bipolaris oryzae*

Classificação (mm)	Isolados genitores	Isolados indivíduos descendentes
Crescimento lento (20 - 45) *	LPS08.1	LPS17x05
	LPS05.1	LPS17x19
	LPS12.2	LPS09x17
	LPS07.1	
Crescimento moderado (50 - 70)	LPS09.1	LPS08x18
	LPS17.1	LPS13x07
	LPS19.1	LPS19x07
	LPS13.1	LPS13x19
	LPS18.1	LPS05x19
		LPS10x07
Crescimento rápido (>70)	LPS10.1	LPS18x09
		LPS13x12
		LPS18x05
		LPS19x09

\*Classificação adaptada segundo Kumari et al., (2015)

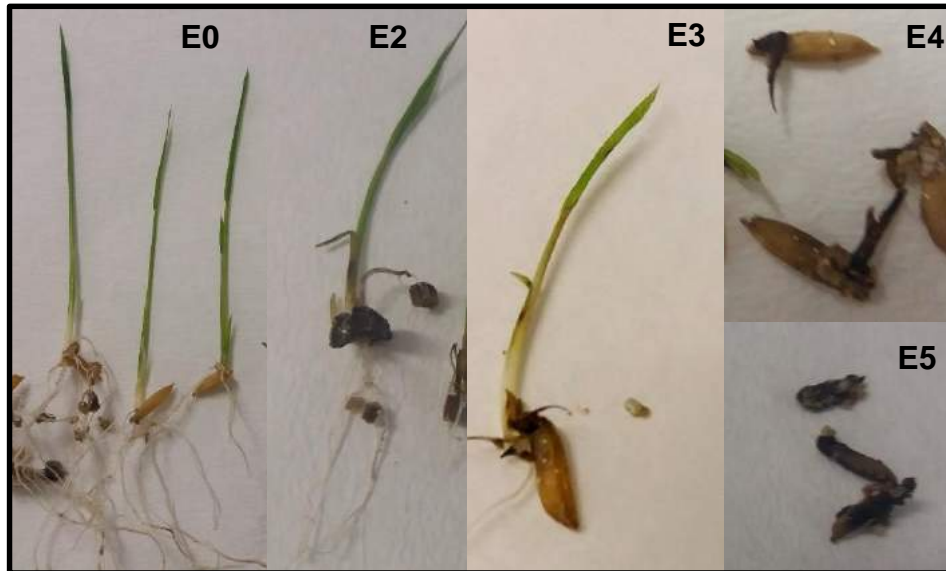
#### 4.3.4. Avaliação da agressividade dos genitores e descendentes de *Bipolaris oryzae*

A partir do estudo de transmissão de *B. oryzae*, verifica-se que os indivíduos descendentes e genitores conseguiram transmitir-se da semente para a plântula causando diferentes sintomas na planta (Tabela 16, Apêndice 2), caracterizados com lesões de coloração pardo-escuras e forma ovalada, sendo identificados tanto no coleótilo como nas folhas, assim como também, foi observado a capacidade dos isolados em causar morte de pré e pós-emergência (Figura 8 e 19).



**Tabela 16.** Índice de crescimento micelial (ICM), Crescimento micelial (CM) aos cinco dias, Esporulação (Esp), Índice de doença (ID) e Taxa de transmissão (TT) segundo os genitores e indivíduos descendentes.

<b>Isolado</b>	<b>CM (mm) ao 5 dias</b>	<b>Esp x10<sup>4</sup>/mL</b>	<b>ID</b>	<b>TT (%)</b>
LPS17.1	53,36	0,50	72,0	88,0
LPS05.1	34,93	1,75	46,4	60,0
LPS17x05	42,87	1,00	72,8	100,0
LPS08.1	32,77	1,75	92,8	100,0
LPS18.1	51,10	0,50	73,6	92,0
LPS08x18	53,77	0,00	74,4	100,0
LPS13.1	52,38	0,25	44,0	76,0
LPS12.2	44,32	1,00	79,2	96,0
LPS13x12	85,50	0,00	61,6	95,0
LPS13.1	52,38	0,25	44,0	76,0
LPS07.1	24,46	0,25	47,2	68,0
LPS13x07	58,99	0,00	64,0	100,0
LPS19.1	59,07	0,50	55,2	76,0
LPS07.1	24,46	0,25	47,2	68,0
LPS19x07	51,37	0,75	40,8	80,0
LPS17.1	53,36	0,50	72,0	88,0
LPS19.1	59,07	0,50	55,2	76,0
LPS17x19	39,05	0,50	58,4	95,0
LPS09.1	64,26	0,00	71,2	100,0
LPS18.1	51,10	0,50	73,6	92,0
LPS09x18	64,88	0,00	72,8	100,0
LPS09.1	64,26	0,00	71,2	100,0
LPS17.1	53,36	0,50	72,0	88,0
LPS09x17	41,56	0,50	53,6	100,0
LPS19.1	59,07	0,50	55,2	76,0
LPS13.1	52,38	0,25	44,0	76,0
LPS13x19	51,88	0,25	62,4	90,0
LPS19.1	59,07	0,50	55,2	76,0
LPS05.1	34,93	1,75	46,4	60,0
LPS05x19	65,11	0,00	72,0	100,0
LPS05.1	34,93	1,75	46,4	60,0
LPS18.1	51,10	0,50	73,6	92,0
LPS18x05	85,50	0,75	72,0	100,0
LPS07.1	24,46	0,25	47,2	68,0
LPS10.1	85,50	1,25	75,2	100,0
LPS10x07	60,20	0,50	62,4	100,0
LPS09.1	64,26	0,00	71,2	100,0
LPS19.1	59,07	0,50	55,2	76,0
LPS19x09	70,82	1,00	57,6	100,0



**Figura 19.** Sintomas observados segundo a escala de severidade de Cardoso (2012). E0- Plântulas sem sintomas; E2- Plântulas com lesões típicas no coleóptilo; E3- Plântulas com lesões típicas no coleóptilo e folhas; E4- Plântulas com morte de pós-emergência; E5- Plântulas com morte de pré-emergência.

Em relação ao ID verifica-se uma variação entre os isolados de 40 a 74. Observa-se que os indivíduos descendentes LPS13x07, LPS13x12 e LPS05x10 apresentaram valores superiores aos seus genitores, de 35%, 13% e 30% respectivamente, em relação ao genitor de maior valor. Porém, também registrou-se valores inferiores aos seus genitores nos indivíduos LPS19x07 e LPS10x07, sendo 14% e 24% respectivamente ao genitor com menor valor.

Para a taxa de transmissão (TT) de *B. oryzae* todos os isolados genitores conseguiram ser transmitidos para plântulas, destacando-se os isolados LPS08.1, LPS09.1 e LPS10.1 com 100%, e o LPS05.1 com a menor TT (60%). Todos os indivíduos descendentes apresentaram uma TT iguais ou maiores aos seus respectivos genitores com valores maiores a 80% (Tabela 16).

O crescimento micelial, assim como a esporulação, não apresentaram uma correlação com a agressividade. Isolados que apresentaram crescimento lento tiveram alto ID, como em LPS08.1, que obteve valores de 92,8 para ID e 100% na TT. Todos os isolados com crescimento rápido tiveram uma TT de 95-100%, já para o ID foi mais variável, com valores entre 57 a 75 (Tabela 16). Isto também concorda com Kumar et al. (2016) onde trabalhando com variabilidade em *B. oryzae*, foi visto que, a maior quantidade de esporos associava-se com isolados mais agressivos, porém isto não aconteceu para todos indivíduos avaliados.

A localização geográfica dos isolados não associou-se com as características de compatibilidade e morfologia. Isto está de acordo com outros estudos de variabilidade genética com *B. oryzae*, que demonstram pouca relação entre a estrutura genética do patógeno e a região de origem geográfica do mesmo (WEIKERT-OLIVEIRA et al., 2002; ARCHANA et al., 2014). Os autores Zhong e Steffenson (2001), também não encontraram associação entre a genética, os isolados e local geográfico nos diferentes isolados de *C. sativus*, sinalando este fato ao efeito da recombinação parassexual nas populações de fungos e a migração do patógeno através das diferentes regiões.

Neste estudo, pode-se observar que as colônias que apresentaram coloração mais escuras, cinza escuro ou cinza esverdeado apresentaram maiores taxas de transmissão do patógeno para as plântulas. Diferentes pesquisadores relatam que existe uma correlação entre as características da colônia e a agressividade, onde geralmente as colônias com morfologia de cor preta são as mais agressivas (CHAND et al., 2003; KUMAR et al., 2011). Outros pesquisadores trabalhando com variabilidade em *Bipolaris sorokiniana*, observaram, de um total de 121 isolados testados 5 grupos, com base no diâmetro radial, produção de esporos e cor da colônia, observando ainda, que as de coloração branca são as que produziram menos conídios (CHAND et al., 2003). Segundo Chand et al. (2003) e Jaiswal et al. (2007) existe uma correlação entre a agressividade e a morfologia da colônia, dos isolados de *C. sativus*, onde o micélio de cor preta são os mais agressivos. Kamal e Mia (2009) avaliando a agressividade de *B. oryzae*, encontraram diferenças segundo o isolado testado, relacionados à variação em falhas da germinação (20,5%-84,5%), mortes de plântulas pós-emergência e redução dos rendimentos.

Nos indivíduos descendentes, quase todos formaram setores, não sendo possível relacioná-los com a coloração das colônias, ou tamanho e quantidades dos esporos. A presença de setores junto com o desenvolvimento micelial, produção e dimensões dos esporos e cor das colônias, é outra característica utilizada para avaliar a variabilidade em fungos, já que sua presença revela mutações somáticas (CAMARGO, 1995; ARTIGIANI; BEDENDO, 1996). Existem estudos onde avaliando a ocorrência de setores em *Helminthosporium oryzae*, em diferentes meios de cultura e temperatura de incubação, não conseguiram agrupar os isolados devido a grande variabilidade que o fungo apresentou (ARTIGIANI; BEDENDO, 1996).

Pode se dizer que os indivíduos descendentes apresentaram-se mais agressivos que seus genitores, devido ao maior número de plântulas com sintomas de pré e pós-emergência e a maior taxa de transmissão de *B. oryzae* de semente para plântula.

Além da mutação e reprodução sexuada, a recombinação somática também é um importante mecanismo que pode gerar variabilidade (KRNJAJA et al., 2013). Neste trabalho, fica evidenciado que indivíduos originários de uma anastomose entre dois isolados compatíveis, distantes ou não geograficamente, podem ser diferentes aos seus genitores. Tanto em características morfológicas, como dimensões nos conídios e coloração mais escuras das colônias, como também nas características patogênicas, onde a severidade pode ser aumentada.

Isto é possível porque nas divisões mitóticas de núcleos diploides a recombinação pode ocorrer entre os cromossomos homólogos, como ocorre na fusão de hifas de um ciclo parasexual, onde a recombinação genética existe e podem gerar novas variantes genéticas (KRNJAJA et al., 2013).

Estudo realizados por Rodriguez-Guerra et al., (2003) em outros patossistema como em *C. lindemutthianum*, verificaram que a capacidade de anastomose entre isolados de diferentes origens é frequente e podem ser capazes de gerar novas variantes genéticas pela anastomose de hifas. Franco et al. (2011) em estudos de compatibilidade vegetativa e segregação a partir do ciclo parasexual também sugere que este ciclo pode ser uma alternativa de variabilidade genética nos isolados de *C. acutatum*.

Outro aspecto a considerar é que as cultivares de arroz que mostram-se moderadamente resistente a *B. oryzae*, como a cultivar utilizado neste estudo (BRS Sinuelo CL), podem-se mostrar susceptível nos primeiros estádios da cultura, com transmissão moderadamente alta. Isto pode comprometer o início de desenvolvimento da cultura do arroz, onde o patógeno pode atacar as plântulas antes ou após emergência, causando uma morte pré ou pós-emergência (“damping-off”), como foi observado neste estudo.

#### 4.4. Conclusões

Constatou-se compatibilidade vegetativa nos isolados de diferentes localidades no meio de BDA.

A anastomose de hifas aumenta a variabilidade de *B. oryzae*.

Indivíduos descendentes são diferentes aos genitores apresentando alterações principalmente na coloração e formação de setores das colônias, dimensões e número de septos dos conídios e crescimento micelial, assim como no índice da doença e taxa de transmissão de semente para plântulas.

A variabilidade observada nas características morfológicas e a agressividade são independentes do local geográficos dos isolados.

## 5. Considerações finais

A reprodução sexuada e anastomose por hifas aumentam a variabilidade tanto nas características morfológicas como na agressividade das populações de *B. oryzae*.

Enquanto as características macroscópicas, as colorações das colônias foi a que aprestou maior variabilidade.

Enquanto as características microscópicas as dimensões dos conídios das populações apresentaram valores superiores e inferiores aos seus genitores.

O crescimento micelial distingue-se como outro fator apresentando diferenças nos padrões de crescimento.

As populações após passagem pelo ciclo sexual ou anastomose por hifas podem tornar-se mais ou menos agressivos.

A compatibilidade vegetativa entre isolados de diferentes locais é possível.

A origem dos diferentes isolados não influi nas características avaliadas.

## 6. Referências

ALCAZAR, G.M.; AÑAÑOS, M.A., BLANCO, R., CIFUENTES, D. Grupos de compatibilidade vegetative de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radices-cucumerinum* en la Provincia de Almería. **Boletín de sanidad vegetal de plagas**, v.32, p. 535-541, 2006.

AMARAL, H.M., FURLAN, S.H., MENTEN, J.O. Localização de *Drechslera oryzae*, *Rhynchospodium oryzae* e *Trichoconiella padwickii* em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 4, 1985, Brasília. **Resumos**. Brasília, DF: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1985. 118p.

ARCHANA, B.; KINI, K. R.; PRAKASH, H. S. Genetic diversity and population structure among isolates of the brown spot fungus, *Bipolaris oryzae*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 238-244, 2014.

ARABI, M.I.E.; JAWHAR, M. Vegetative compatibility and pathogenicity in *Cochliobolus sativus*. **Australasian plant pathology**, v. 36, n. 2, p. 173-174, 2007.

ARTIGIANI, V.H.; BEDENDO, I.P. Variabilidade de *Helminthosporium oryzae* detectada através da ocorrência de setores na colônia, sensibilidade a fungicidas, crescimento em diferentes meios de cultura e temperatura de incubação. **Summa Phytopathologica**, v. 22, n. 3, p. 217-221, 1996.

AZAMBUJA, I.H.V.; VERNETTI, F.J., MAGALHAES, Jr. **Aspectos socioeconômicos da produção de arroz**. In: Arroz Irrigado no Sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

AZEVEDO, J. L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v. 2, p. 3-15, 1976.

BA, V. V.; SANGCHOTE, S. Seed borne and transmission of *Bipolaris oryzae*, the causal pathogen of brown spot of rice. **Kasetsart Journal, Natural Science**, v.2, n. 40, p. 353-360, 2006.

BALARDIN, R.S. **Doenças do arroz**, Santa Maria: Orium, 2003. 53p.

- BEDENDO, I. P.; PRABHU, A. S. Doenças do arroz. In: KIMATI, K. et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 79-90.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug. 2000.
- BI, Y.; HU, J.; CUL, X.; SHAO, J.; LU, X.; MENG, Q.; LIU, X. Sexual reproduction increases the possibility that *Phytophthora capsici* will develop resistance to dimethomorph in China. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1365-1373, 2014.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.
- BORÉM, A.; RANGEL, P.H.N. **Arroz do plantio à colheita**. Viçosa, UFV, 2015. 242 p.
- BURDON, J.J.; ROELFS, A. The Effect of Sexual and Asexual Reproduction on the Isozyme Structure of Populations of *Puccinia graminis*. **Phytopathology**, v. 75, n. 9, p. 1068-1073, 1985.
- BURGOS, M. R. G.; KATIMBANG, M. L. B.; DELA PAZ, M. A. G.; BELIGAN, G. A.; GOODWIN, P. H.; ONA, I. P.; MAULEON, R. P.; ARDALES, E. Y.; CRUZ, C. M. Genotypic variability and aggressiveness of *Bipolaris oryzae* in the Philippines. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 2, p. 415- 429, 2013.
- CAMARGO, L.E.A. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: FILHO, A.B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.455-469, 1995.
- CAMPOS, A.S.; CERESINI, P.A. Incompatibilidade somática em *Rhizoctonia solani* AG-1 IA da soja. *Summa Phytopathologica*, v. 32, n. 3, p. 247-254, 2006.
- CARDOSO, G. Efeito do potencial de inóculo de *Bipolaris oryzae* em sementes na transmissão para plântulas do arroz. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.
- CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, G.W. **The fungi**. San diego academic. Press. 2001.
- CASA-COILA, V.H. Variabilidade de *Bipolaris* sp., agente causal da mancha parda do arroz. 2008. 65 f. **Dissertação** (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.



CELMER, A.; GRIPA, M.; DEBORTOLI, M.; NAVARINI, L.; SILVEIRO, R. Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n. 6, p. 901-904, 2007.

CHAMBERLAIN, M.; INGRAM, D.S. The Balance and Interplay Between Asexual and Sexual Reproduction in Fungi. **Advances in Botanical Research**, v. 24, p. 71-87, 1997.

CHAND, R.; PANDEY, S. P.; SINGH, H. V.; KUMAR, S.; JOSHI, A. K. Variability and it's probable cause in natural populations of spot blotch pathogen *Bipolaris sorokiniana* of wheat (*T. aestivum* L.) in India. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 110, n. 1, p. 27-35, 2003.

CHISTENSEN, J.J. Studies on the parasitismo of *Helminthosporium sativum*. Minnesota Agricultural Experimental Station Technical, Bulletin 11, p. 61 -84. 1922.

CONAB. **A cultura de arroz**. Brasília: Conab, 2015. 179p. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_03\\_01\\_16\\_56\\_00\\_a\\_cultur\\_a\\_do\\_arroz\\_-\\_conab.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultur_a_do_arroz_-_conab.pdf) Acesso em jun. 2017.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**: Grãos. Safra 2016/2017. v. 4, n. 7. CONAB, Brasília, 2017. 157 p.

COUTINHO, W.C.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; FERREIRA, D.F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p. 127-135, 2001.

COUTO, E.F.; MENEZES, M.; COELHO, R.S.B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação enzimática em meio sólido específico de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, p.260-266, 2002.

COSTA, M.L.N.; DHINGRA, O.D.; SILVA, J.L. Influence of internal seedborne *Fusarium semitectum* on cotton seedlings. **Fitopatología brasileira**, v.30, n.2, p. 183-186, 2005.

CZEMBOR, P.C.; ARSENIUK, E. Segregation and recombination of PCR based markers in sexual progeny of *Phaeosphaeria* species, **Mycological Research**, v. 104, n. 8, p. 919-926, 2000.

DE CAL, A.; EGUEN, B.; MELGAREJO, P. Vegetative compatibility groups and sexual reproduction among Spanish *Monilinia fructicola* isolates obtained from peach

and nectarine orchards, but not *Monilinia laxa*. **British mycological society promoting fungal Science**, v. 118, n. 5-6, p. 484-494, 2014.

DALLAGNOL, L.J.; RODRIGUES, F.A.; MARTINS, S.C.V.; CAVATTE, P.C.; DAMATTA, F.M. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australasian Plant Pathology*, v. 40, n. 4, p. 360-365, 2011.

DYER, P.S.; LUCAS, J.A. Incidence of apothecia of *Tapesia yallundae* at set-aside sites in England and sensitivity of the ascospore off springs to the fungicides benomyl and prochloraz. **Plant Pathology**, v.44, p.796-804, 1995.

ELIAS, A.; FERREIRA, A.B.M.; BUENO, C.J. Produção in vitro de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira. *Summa Phytopathology*, v. 41, n. 4, p. 315-317, 2015.

EL-SHAIEB, M.K.Z.; MALIBARI, A.A. Enzymatic activities of soft rot causal organisms affecting vegetables and fruits in Saudi Arabia. **Alexandria Journal of Agricultural Research**, v. 40, n.3 p. 293-304, 1995.

FAOSTAT - Food and agriculture organization of the united nations. **Production Crops**. 2014. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: agosto 2016.

FARIAS, C.R.J. Espécies de *Bipolaris* associadas a helminthosporiose do arroz (*Oryza sativa* L.) no sul do Brasil. 2007, 104 f. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

FERREIRA, V.; CARES, E.; FERREIRA, O.P. Mecanismo de ataque de patógenos em plantas. In: Zambolim et al., O essencial da fitopatologia, epidemiologia de doenças de plantas. **Viçosa, MG**: UFV, DEP, 2014, p. 211-263.

FILHO, O.A.L; FARIAS, C.R.J. **Patologia de sementes**. In: Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos. Pelotas, Ed. Universitária/ UFPel, 2012. p. 273-369.

FRANCO, C.C.S.; SANT, J.R.; ROSADA, A.L.J.; KANESHIMA, E. N.; STANGARLIN, J.R.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Vegetative Compatibility Groups and Parasexual

Segregation in *Colletotrichum acutatum* Isolates Infecting Different Hosts. **Phytopathology**, v. 101, n. 8, p. 923-928, 2011.

FRAZZON, A.P.G.; MATSUMURA, A.T.S.; SAND, S.T.V.D. Morphological characterization and genetic analysis of *Drechslera teres* isolates. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 235-241, 2002.

FUNCK, G.R.D.; KEMPF, D. **Doenças do arroz irrigado no Rio Grande do Sul**. Boletim Técnico n.5. Cachoeirinha: IRGA, 2008. 39p.

GALBIERI R., URASHIMA A.S. Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual em *Pyricularia grisea* de diferentes hospedeiros. **Summa Phytopathologica** v. 34, n. 1, p. 22-28, 2008.

GAVINO, P.D.; SMART, C.D.; SANDROCK, R.W.; MILLER, J.S.; HAMM, P.B.; LEE, T.Y.; DAVIS, R.M.; FRY, W.E. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: generation of an aggressive lineage. **Plant Disease**. v.84, p.731-735, 2000.

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.

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

GORMAN, C.M.O.; FULLER, H.T.; DYER, P.S. Discovery os sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 457, n. 22, p. 471-475, 2009.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2ª edição. New York: John Wiley & Sons, 458p, 1994.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HANLIN, R. T. **Illustrated genera of Acomycetes**. St. Paul: American Phytopathological Society. 1990. 263 p.

HICKEY, P.C.; JACOBSON, D.J.; READ, N.D.; GLASS, N.L. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Fungal genetics and biology**, v. 37 n. 1, p. 109-119, 2002.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Standard Evaluation System (SES) for Rice**. Philippines: 64p, 2013.

JAISWAL, S. K.; SWETA, L.; PRASAD, C.; SHARMA, S.; KUMAR, S.; PRASAD, R.; PANDEY, S.P.; CHAND, R.; JOSHI, A. K. Identification of Molecular Marker and Aggressiveness for Different Groups of *Bipolaris sorokiniana* Isolates Causing Spot Blotch Disease in Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Current microbiology**, v. 55, n.2, p.135-141, 2007.

JUNIOR, A.A.M.; FAGUNDES, P.R.F.; FRANCO, D.; ANDRES, A.; RANGEL, P.H.; MORAES, O.P.; NETO, F.M.; SEVERO, A.C.M. BRS Sinuelo CL': Cultivar de Arroz irrigado para o sistema Clearfield. **Embrapa clima temperado**, comunicado técnico n. 233, 2010.

KAMAL, M. M.; MIA, M. A. T. Diversity and pathogenicity of the rice brown spot a pathogen, *Bipolaris oryzae* (Breda de Hann) Shoem. In Bangladesh assessed by genetic fingerprint analysis. **Bangladesh Journal of Botanic**, v. 38, n. 2, p. 119-125, 2009.

KAUFMANN, P.J.; WEIDEMANN, G.J. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera. **Plant Disease**, Saint Paul. v.80, n.11, p. 1289-1293, 1996.

KISTLER, H.C.; MIAO, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. Annual Review. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p.131-152, 1992.

KRNJAJA, V., LEVIĆ, J.; STANKOVIĆ, S.; VASIĆ, T. The Use of Vegetative Compatibility Tests for Identification of Biodiversity of Phytopathogenic Fungi. **Journal Pesticides and Phytomedicine**, v. 28, n.3, p. 157-165, 2013.

KUMAR, P.; ANSHU, V.; KUMAR, S. Morpho-pathological and molecular characterization of *Bipolaris oryzae* in rice (*Oryzae sativa*). **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 1, p. 51-56, 2011

KUMAR, A.; SOLANKI, I.S.; AKHTAR, J.; GUPTA, V. Morpho-molecular diversity of *Bipolaris oryzae* causing brown spot of paddy. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 86, n. 5, p. 615-620, 2016.

KUMARI, S.; KUMAR, A.; RANI, S. Morphological characterization of *Bipolaris oryzae* causing brown spot of paddy in Binhar. **International education e research jornal**, v. 1, n. 5, p. 85-87, 2015.

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

LOBO, S. V. L.; AGUILAR, T. J.; CORTES, M. C. B; FILIPPI, C. M.; PRABHU, S. A. Critérios para Avaliação da Resistência à Mancha Parda e Relação entre a Mancha Parda na Folha Bandeira e a Mancha de Grãos em Genótipos de Arroz. Santo Antônio de Goiás, **Embrapa Arroz e Feijão**, 2014. 25p.

MAHMOUD, A.L.E.; OMAR, S.A. Enzymatic activity and mycotoxinproducing potencial of fungi isolated from rotted lemons. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v.15, p.117-124, 1994.

MALAVOLTA, V.M.A.; PARISI, J.J.D.; TAKADA, H.M.; MARTINS, M.C. Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos, transmissão do patógeno às plântulas e produção. **Summa Phytopathologica**, v.28, n.4, p.336-340, 2002

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.

MATHO, B. N.; GURUNG, S.; NEPAL, A.; ADHIKARI, T. B. Morphological, pathological and genetic variations among isolates of *Cochliobolus sativus* from Nepal. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 2, p. 405-417, 2012.

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

McKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.26, p.195-217, 1923.

MICROBIOLOGY SOCIETY, Microbiology online, **Observing fungi in a petri dish**. Disponível em: <<http://microbiologyonline.org/teachers/observing-microbes/observing-fungi-in-a-petri-dish>>. Acesso em: mar. 2016.

MICHELMORE, R.W.; INGRAM, D.S. Recovery of progeny following sexual reproduction of *Bremia lactucae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 77, n.1, p. 131-137, 1981.

MIGOTTO, B.C.; FERREIRA, A.B.M.; BUENO, C.J. *Cylindrocladium spathiphylli* de espatifilo (*Spathiphyllum wallisii* Rengel): detecção de enzimas extracelulares em isolados normais e alterados por temperatura. **Summa Phytopathology**, v. 39, n. 2, p. 89-96, 2013.

MOLETTI, M.; GIUDICI M. L.; VILLA, B. Rice Akiochi-brown spot disease in Italy: agronomic and chemical control. *Cahiers Options Méditerranéennes*, **Montpellier**, v.15, n.3, p. 79-85, 1997.

MOURA, A. ; LUDWIG, J. ; GARSKE, A. ; TAVARES, J. ; NOGUEIRA, V. ; OBES, B. Biocontrol and seed transmission of *Bipolaris oryzae* and *Gerlachia oryzae* to rice seedlings. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 4, p. 407-412, 2014.

MOSS, N.A; CRUTE, I.R; LUCAS, J.A. Laboratory production of oospores of *Peronospora parasitica* (crucifer downy mildew) and the recovery and characterization of sexual progeny from crosses between isolates with different host specificity. **Plant pathology**, v. 43, n. 4, p. 713-725, 1994.

NI, M. et al. Sex in fungi. **Annu Rev Genet**.v.45, p.405-430, 2011.

NUNES, C.D.M.; RIBEIRO, A.S.; TERRES, A. L. S.. Principais doenças em arroz irrigado e seu controle. **In: Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 579-621, 2004.

NUNES, C.D.M. **Doenças da cultura de arroz irrigado**. Documentos, 360. Pelotas, Embrapa clima temperado, p. 83, 2013.

NWUFO, M.I.; FAJOLA, A.O. Production of amylolytic enzymes in culture by *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* associated with the corn rots of *Colocasia esculenta*. **Acta Microbiologica Hungarica**, v. 35, p.371-378. 1988.

O`GORMAN, C.M.; FULLER, H.T.; DYER, P.S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 457, n. 22, p. 471-475, 2009.

OLIVEIRA, V.; CARVALHO, V.; PRABHU, A. **Doenças do arroz**. Informe agropecuário, Belo Horizonte, v. 25, n. 222, p. 84-96, 2004.

ORSENIGO, M. Estrazine e purificazione della Cochliobolina, uma tossina prodotta da *Helminthosporium oryzae*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 29, n.1, p.189–196, 1957.

OU, S. H. **Rice Diseases**. 2ª ed. Kew: Commonwealth Agricultural Bureau. 1985. 380p.

REY, M.S.; LIMA, N.B.; SANTOS, J.; FARIAS, C.R.J.; PIEROBOM, C.R. Crescimento micelial de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* sob diferentes potenciais hídricos, **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, RS, v.11, n.3, p.309-313, 2005.

PASCHOLATI, S.F. **Fisiologia de parasitismo: como os patógenos atacam as plantas**. In: Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 543-591.

PEREIRA, D.; BANDEIRA, D.; FREIRE, E. Cultivo do arroz irrigado no Brasil, importância econômica, agrícola e alimentar do arroz. Embrapa clima temperado 2005. Disponível em:  
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/autores.htm>> Acesso em agosto 2016.

PIERO, R. M. D; PASCHOLATI, S. F. Produção de celulases por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 26, p. 361-341, 2000.

PINTO, H.M.A.. *Drechslera oryzae* (Breda de Hann) Subram & Jain em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) quantificação e localização do inóculo, efeitos no estabelecimento da cultura e controle com fungicidas. 1989, 85f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia/ Fitopatologia), ESALQ, Piracicaba.

POLONI, A.; PESSI, I.S, FRAZZON, A.P.G.; VAN DER SAND, S.T. Vegetative incompatibility among monoconidial isolates of *Bipolaris sorokiniana*. **Current Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 153-158, 2009.

PRABHU, A.S.; LOPES, A.M.; ZIMMERMANN, F.J.P.. Infecção da folha e do grão de arroz por *Helminthosporium oryzae* e seus efeitos sobre os componentes de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.15, n.2, p.183-189, abril 1980.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e seu controle. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do arroz no Brasil**. Goiás: Embrapa - Arroz e Feijão, p.262-307, 1999.

REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. Transmissão de *Bipolaris sorokiniana* de sementes para órgãos radiculares e aéreos do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, n.1, p.76-81, 1993.

REY, M.S.; LIMA, N.B.; SANTOS, J.; PIEROBOM, C.R. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*) **Arquivos do Instituto Biológico**. v.76, n.3, p. 465-470, 2009.

RIBEIRO, A. S.; SPERANDIO, C. A. Controle de doenças na cultura do arroz irrigado. Pelotas, UFPel, 2006. p.47

ROCA M., M.G., MACHADO, J.D.C., VIEIRA, M.G.C., DAVIDE, L.C. & ROCHA, M.L. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.016-020, 2004.

RODRIGUES, S.; RIBEIRO, J.; TORQUATO, A.; CASTRO, M.; ALMEIDA, R.; FREITAS, A.; RODRIGUES, I. Danos causados por doenças fúngicas no arroz cultivado em várzeas no Sul do Estado do Tocantins. **Bragantia, Campinas**, v. 70, n. 4, p. 869-875, 2011.

RODRIGUEZ-GUERRA, R.; RAMIREZ-RUEDA, M.T.; SIMPSON, J. Capacidad de anastomosis de cepas de hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., agente causal de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v. 22, n.1, p. 37-43, 2003.

RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C.; MORALES-RODRÍGUEZ, M.C.; PALO, C.; OSUNA, M.D.; IGLESIAS, M.J.; GARCÍA, J.A. Pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD analysis of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Extremadura. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 3, p. 639-650, 2013.

RODRIGUES, S.; RIBEIRO, J.; TORQUATO, A.; CASTRO, M.; ALMEIDA, R.; FREITAS, A.; RODRIGUES, I. Danos causados por doenças fúngicas no arroz cultivado em várzeas no Sul do Estado do Tocantins. **Bragantia, Campinas**, v. 70, n. 4, p. 869-875, 2011.



SAFARI, M.M.R; ANVARI, M. Genetic variation in a population of *Bipolaris oryzae* based on RAPD-PCR in north of Iran. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 36, p. 5800-5804, 2010.

SANOAMUANG, N.; GAUNT, R.E.; FAUTRIER, A.G. The segregation of resistance to carbendazim in sexual progeny of *Monilinia fructicola*. **Mycological Research**, v. 99, n. 6, p. 677-680, 1995.

SCHEUERMAN, K.K. **Manejo de doenças**. In: Arroz: do plantio à colheita. Vicosa; Ed. UFV, 2015. p. 199-219.

SERRA, I.M.R.S.; COELHO, R.S.; MENEZES, M. fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multispóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Summa Phytopathology*, v. 34, n. 2, p. 113-120, 2008.

SINISTERRA, X.; MEDINA, G., ARBELAEZ, G. Uso de compatibilidade vegetativa en la identificación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporu*, f. sp. *dianthi*. *Agronomía colombiana*, v. 10, n. 1, p. 28-32, 1993.

SINGH, R.; SAXENA, V.C. Pectinolytic, cellulolytic, amylase and protease production by three isolates of *Fusarium solani* variable in their virulence. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, v.19, n. , p. 22-29, 1989.

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

SILVA, M.E. Diversidade fenotípica de colonias policloniais, monocloneais e de pontas de hifas de *Bipolaris sorokiniana*. 1995. 125p. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

SONI, G.L.; BHATIA, I.S. Studies on pectinases from *Fusarium oxysporum*. **Indian journal of experimental biology**, v. 19, n. 6, p. 547-550, 1981.

SOUZA, E.A.; CAMARGO, O.A.; PINTO, J.M.A. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetic and molecular research**, v.9, n. 3, p. 1759-1769, 2010.

SOUSA, G. N. R.; RIBEIRO, S. A.; GALLI, J. Variabilidade do fungo *Helminthosporium oryzae*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 19, n.11, p. 1335- 1343, 1984.

SOSABI. **Arroz irrigado: recomendações técnicas de pesquisa para o Sul do Brasil/** XXX Reunião técnica da cultura de arroz irrigado, Bento Gonçalves, SOSABI, 2014. 192 p.

STRAUSBAUGH, C.A.; EUJAYL, I.A.; MARTIN, F.M. Pathogenicity, vegetative compatibility and genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from sugar beet. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.38, n.4, p. 1-48, 2016.

SOSBAI. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil.** Reunion técnica da cultura de arroz irrigado. Santa Maria, 2014. 192 p.

VIÉGAS, J. Variabilidade da morfologia, crescimento e fertilidade de isolados brasileiros de *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib) Drechsl. Ex Dastur. 1989. 222p. **Tese** (Doutorado em agronomia –Genética e Melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agronomia “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

WEBSTER, R. K.; GUNNELL, P. S. **Compendium of rice diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. 86 p.

WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B.; RESENDE, M.A.; VALÉRIO, H. M.; CALIGIORNE, R. B.; PAIVA, E. Genetic variation pathogens causing “*Helminthosporium*” diseases of rice, maize and wheat. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 639-643, 2002.

XIAO, J.Z.; TSUDA, M.; DOKE, N.; NISHIMURA, S. Phytotoxins produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*. **Phytopathology**, v. 81, n.1, p. 58–64, 1991.

ZHONG,S.; STEFFENSON, B.J. Virulence and Molecular Diversity in *Cochliobolus sativus*. **Phytopathology**, v.95, n.5, p. 469-476, 2001.

## **Apêndices**

**APENDICE 1.** Percentagem de severidade segundo escala para os genitores e população segregantes de *Bipolaris oryzae*

Isolado	Escala de severidade (%)*				
	E1	E2	E3	E4	E5
Testemunha	100	0	0	0	0
<b>Progênie 1- LPS010.4x LPS07.4</b>					
LPS010.4	0	8	20	60	12
LPS07.4	32	28	0	20	20
1	0	16	20	40	24
2	32	0	32	24	12
3	20	24	36	20	0
4	0	36	28	20	16
5	0	8	8	36	48
6	12	28	28	28	4
7	4	4	4	60	28
8	0	0	8	40	52
<b>Progênie 2- LPS08.1 x LPS09.2</b>					
LPS08.1	0	4	8	8	80
LPS09.2	0	8	44	32	16
1	0	16	28	4	52
2	0	16	36	40	8
3	0	12	28	28	32
4	0	0	20	16	64
5	0	0	4	36	60
6	0	12	36	24	28
7	0	8	0	0	92
8	0	24	20	24	32
9	0	8	8	0	84
10	0	12	16	28	44
<b>Progênie 3- LPS06.1 x LPS07.4</b>					
LPS06.1	0	28	8	64	0
LPS07.4	32	28	0	20	20
1	0	4	12	16	68
2	0	8	0	16	76
3	0	92	4	4	0
4	0	32	8	0	60
5	32	40	0	0	28
6	0	24	0	24	52
7	12	0	4	32	52
8	0	20	16	36	28
9	12	36	32	4	16
10	0	8	0	16	76
11	16	8	0	16	60
12	0	16	16	24	44

\*Escala segundo Cardoso, (2012).

**APENDICE 2.** Percentagem de severidade segundo escala para os genitores e descendentes após uma anastomose de hifas em *Bipolaris oryzae*

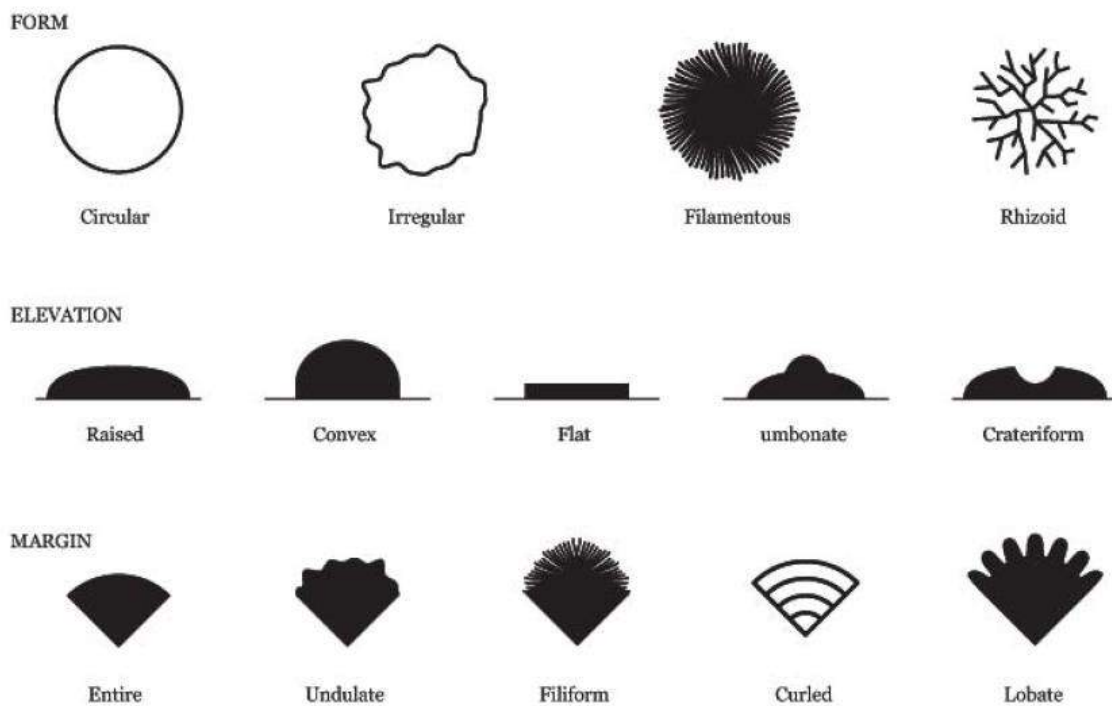
Isolado	Escala de severidade (%)*				
	E0	E2	E3	E4	E5
Testemunha	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LPS17.1	12,0	8,0	0,0	56,0	24,0
LPS05.1	40,0	0,0	24,0	20,0	16,0
LPS17x05	0,0	10,0	0,0	15,0	75,0
LPS08.1	0,0	4,0	8,0	8,0	80,0
LPS18.1	8,0	8,0	12,0	44,0	28,0
LPS08.1xLPS18.1	0,0	0,0	5,0	25,0	70,0
LPS13.1	24,0	44,0	0,0	28,0	4,0
LPS12.2	4,0	12,0	0,0	48,0	36,0
LPS13.1xLPS12.2	5,0	10,0	20,0	20,0	45,0
LPS13.1	24,0	44,0	0,0	28,0	4,0
LPS07.1	32,0	28,0	0,0	20,0	20,0
LPS13.1xLPS07.1	0,0	20,0	10,0	20,0	50,0
LPS19.1	24,0	24,0	0,0	32,0	20,0
LPS07.1	32,0	28,0	0,0	20,0	20,0
LPS19.1xLPS07.1	20,0	25,0	20,0	30,0	5,0
LPS17.1	12,0	8,0	0,0	56,0	24,0
LPS19.1	24,0	24,0	0,0	32,0	20,0
LPS17.1xLPS19.1	5,0	5,0	25,0	45,0	20,0
LPS09.1	0,0	8,0	44,0	32,0	16,0
LPS18.1	8,0	8,0	12,0	44,0	28,0
LPS09.1xLPS18.1	0,0	0,0	10,0	25,0	65,0
LPS09.1	0,0	8,0	44,0	32,0	16,0
LPS17.1	12,0	8,0	0,0	56,0	24,0
LPS09.1xLPS17.1	0,0	20,0	35,0	35,0	10,0
LPS13.1	24,0	44,0	0,0	28,0	4,0
LPS19.1	24,0	24,0	0,0	32,0	20,0
LPS13.1xLPS19.1	10,0	10,0	5,0	20,0	55,0
LPS05.1	40,0	0,0	24,0	20,0	16,0
LPS19.1	24,0	24,0	0,0	32,0	20,0
LPS05.1xLPS19.1	0,0	5,0	5,0	25,0	65,0
LPS18.1	8,0	8,0	12,0	44,0	28,0
LPS05.1	40,0	0,0	24,0	20,0	16,0
LPS18.1xLPS05.1	0,0	0,0	5,0	40,0	55,0
LPS10.1	0,0	8,0	20,0	60,0	12,0
LPS07.1	32,0	28,0	0,0	20,0	20,0
LPS10.1xLPS07.1	0,0	20,0	15,0	20,0	45,0
LPS19.1	24,0	24,0	0,0	32,0	20,0
LPS09.1	0,0	8,0	44,0	32,0	16,0
LPS19.1xLPS09.1	0,0	15,0	25,0	45,0	15,0

\*Escala segundo Cardoso, (2012).

## **Anexos**

**Anexo 1.** Extração de DNA de *Bipolaris oryzae* (Adaptado de Doyle; Doyle, 1991)

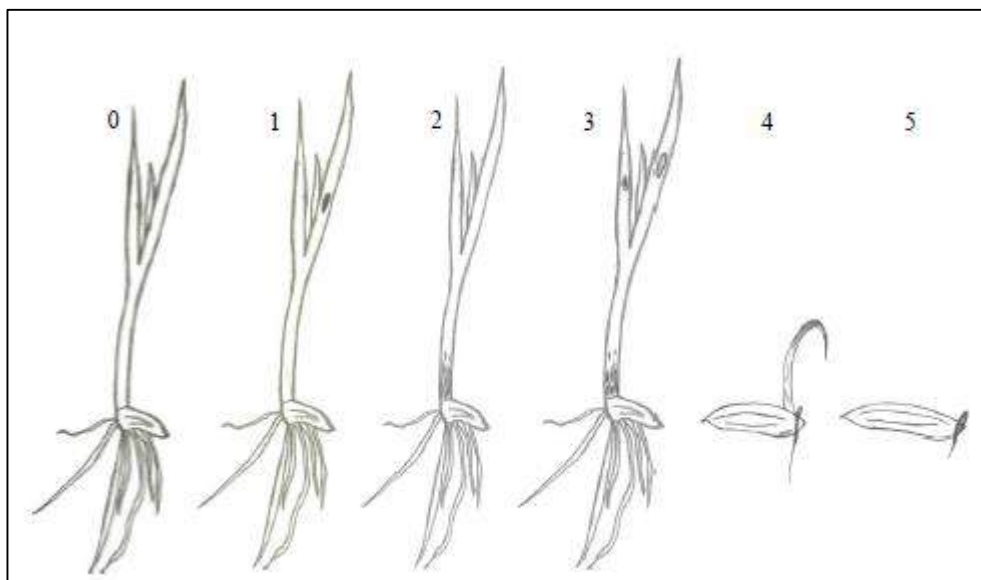
- a)** Raspar a colônia fúngica a fim de retirar somente micélio;
- b)** Macerar o tecido na presença de 400 µL de tampão de extração (Doyle & Doyle) aquecido em banho a 65 °C + 2,0 µL de β-mercaptoetanol;
- c)** Agitar no vortex por 5 segundos;
- d)** Incubar a 65°C por 30 minutos;
- e)** Esperar esfriar e adicionar 400 µL de clorofórmio e agitar por suaves inversões durante 5 minutos;
- f)** Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos;
- g)** Retirar 200 µL da fase aquosa e transferir para outro tubo (sobrenadante – parte superior cuidando para não pegar sólidos);
- h)** Adicionar 200 µL de isopropanol gelado e homogeneizar com suaves inversões por 1 minuto;
- i)** Incubar a -20°C por no mínimo 30 minutos (pode ficar até 1 hora);
- j)** Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos;
- k)** Descartar o sobrenadante (parte superior – isopropanol), tendo cuidado de não perder o pellet formado;
- l)** Adicionar 200 µL de etanol 70 %;
- m)** Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos;
- n)** Descartar o sobrenadante (etanol), tendo cuidado de não perder o pellet formado. Manter de boca para baixo sobre papel absorvente para secar por aproximadamente 20 min;
- o)** Ressuspender em 100 µL de TE+RNAse na concentração final de 40 µL;
- p)** Incubar a 37°C por 30 minutos;
- q)** Verificar a qualidade da extração em eletroforese, utilizando 3,0 µL de DNA ressuspendido.

**Anexo 2.** Chave utilizada para descrições fenológicas das colônias em fungos.

Fonte: Microbiology society (2016)

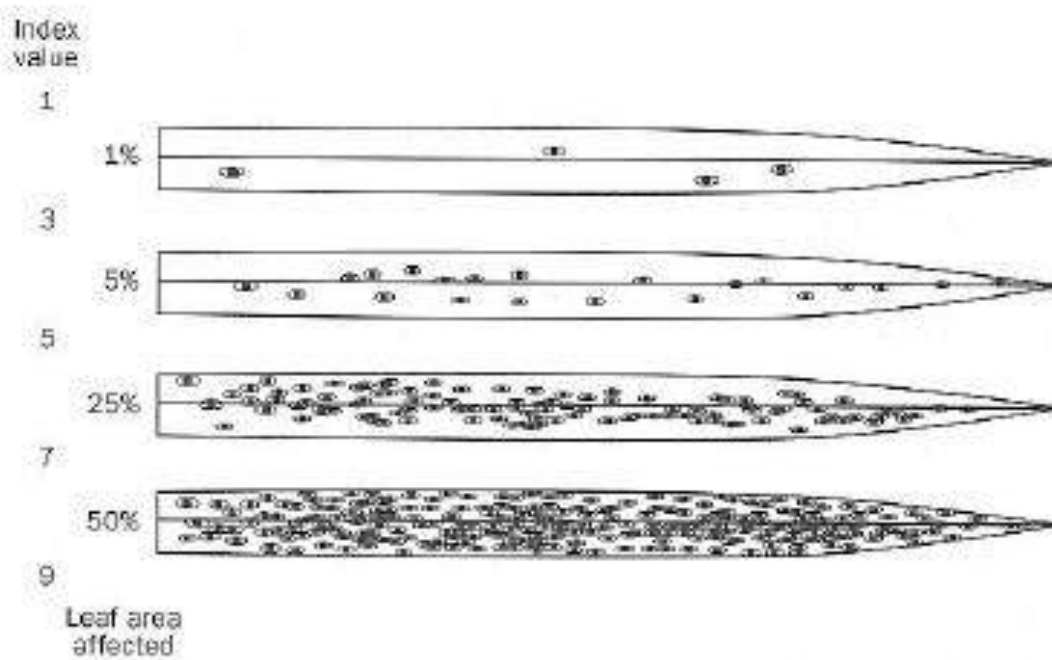


**Anexo 3.** Desenho esquemático representando os danos ocasionados na transmissão semente- plântulas de arroz por *Bipolaris oryzae*. 0- Plântulas sem sintomas; 1- Plântulas com lesões típicas nas folhas; 2- Plântulas com lesões típicas no coleóptilo; 3- Plântulas com lesões típicas no coleóptilo e folhas; 4- Plântulas com morte de pós-emergência; 5- Plântulas com morte de pré-emergência.



Fonte: Cardoso (2012)

**Anexo 4.** Escala de avaliação de severidade de *Bipolaris oryzae* nas folhas até o estágio V4.



FONTE: International rice research institute, (2013)

## Anexo 5. Meio mínimo e soluções para atividade enzimática

Meio mínimo para produção de exoenzimas.

Nutriente	Sigla	g/L
Nitrato de Sódio	NaNO <sub>3</sub>	6,0 g
Fosfato Monopotássico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,52 g
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,52 g
Cloreto de Potássio	KCl	0,52 g
Sulfato de Ferro	FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
Cloreto de Zinco	ZnCl <sub>4</sub>	0,01 g
Ágar	-	15,0 g
Água Destilada	-	1000 mL

Meio mínimo para produção de pectinases.

Nutriente	Sigla	g/L
Fosfato Monopotássico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
Fosfato de Potássio Dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0 g
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Sulfato de Amônio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g
Ágar	-	15,0
Água Destilada	-	1000 mL

Listagem e composição das soluções utilizadas.

Solução	Composição
Brometo de hexadeciltrimetilamônia 1%	1,0 g de Brom. de hexadeciltrimetilamônia / 100 mL água
Solução saturada (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,7 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 10 mL água
Solução de NaCl 4N	
Vermelho congo 1%	1,0 g vermelho congo / 100 mL água