

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



**Dissertação**

**Variabilidade morfogênética, virulência e detecção de genes de compatibilidade sexual em isolados de *Bipolaris oryzae* do Rio Grande do Sul**

**Wellington Rodrigues da Silva**

**Pelotas, 2017**

**Wellington Rodrigues da Silva**

**Variabilidade morfogenética, virulência e detecção de genes de compatibilidade sexual em isolados de *Bipolaris oryzae* do Rio Grande do Sul**

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

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

Co-Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Ribeiro de Barros

Pelotas, 2017

Wellington Rodrigues da Silva

**Variabilidade morfogenética, virulência e detecção de genes de compatibilidade sexual em isolados de *Bipolaris oryzae* do Rio Grande do Sul**

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Candida Renata Jacobsen de Farias  
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Beatriz Helena Gomes Rocha  
Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes pela Universidade Federal de Pelotas.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Ribeiro de Barros  
Doutora em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa.

---

Prof. Dr. Leandro José Dallagnol  
Doutor em Fitopatologia pela Universidade de São Paulo.

À minha mãe **Silvana Aparecida Venturini da Silva** pelo amor, carinho e apoio inesgotável durante todos esses anos longe de casa. Mesmo com a distância, estará sempre em meu coração.

**DEDICO**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Silvana Aparecida V. da Silva e Adilson Rodrigues da Silva, principalmente à minha mãe, pelo apoio inesgotável nessa jornada. Sou o fruto da tua força, bondade e dignidade, obrigado por ter lutado junto comigo em todos os momentos e pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que sou.

A minha avó, Petronília Molena Venturini, que me transmitiu os valores mais importantes como bondade, perdão, honestidade e principalmente paciência. Obrigado por sempre saber o que dizer para me fazer sentir melhor, com suas palavras calmas e sábias, e seus abraços amorosos.

Aos meus amigos Eduardo Machado, Robson Camargo, Viviane Tavares, Douglas Posso, Caroline Tavares, Kellen Rodrigues, Andriara Raseira e Lessandro Rosa, Tiago Rodrigues, Ana Marina Pedrolo e demais amigos que não cito aqui, pela sincera amizade e carinho, pois através delas esta jornada se tornou muito mais valiosa e gratificante.

Às minhas queridas amigas do Laboratório de Patologia de Sementes: Victoria Moreira, Vanessa Gonçalves, Viviana Gaviria, Priscila Rossato, Caliandra Bernardi e Renata Moccellin pelo envolvimento com o trabalho, pelo incentivo e por me proporcionarem momentos de muita alegria. A amizade de vocês é uma das minhas maiores conquistas durante o mestrado!

Às professoras Candida Renata Jacobsen de Farias e Danielle Ribeiro de Barros por suas inestimáveis contribuições em minha formação profissional, na forma de ensinamentos, dedicação e apoio.

À laboratorista Rosaria pela dedicação e auxílio profissional durante este período de aprendizado, sempre disponível e disposta a ajudar.

Aos estagiários Jéssica Tavares, Ligiani Simões e Alexandre Neumann pela amizade, colaboração e auxílio.

À equipe do Laboratório de Virologia Vegetal pela paciência, contribuições e por estarem sempre dispostos a auxiliar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, à Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, representada pelos professores que se dedicam ao ensino, buscando qualificação e profissionalismo dos alunos.

## Resumo

RODRIGUES-SILVA, Wellington. **Variabilidade morfo-genética, virulência e detecção de genes de compatibilidade sexual em isolados de *Bipolaris oryzae* do Rio Grande do Sul**. 2017, 84f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

O fungo *Bipolaris oryzae* é o agente causal da mancha parda do arroz e tem a semente como sua principal fonte de inóculo. Variações quanto à morfologia e agressividade podem ocorrer devido ao número de núcleos em suas células. Diante disso, o trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade morfo-genética, a virulência e detectar os genes de compatibilidade sexual de isolados de *Bipolaris oryzae* do Rio Grande do Sul. Foram utilizados 15 isolados fúngicos de diferentes regiões do RS. Foi realizado agrupamento conforme características morfológicas, crescimento micelial e esporulação e, posteriormente submetidos à análise de similaridade. A partir da amplificação da região ITS e do gene codificador da enzima GAPDH, foi realizada a análise filogenética pelo método de *Neighbour-Joining*. Os isolados foram avaliados quanto à atividade enzimática em meio sólido, a virulência em sementes e plântulas das cultivares BRS Sinuelo CL e Puitá Inta CL. A compatibilidade sexual foi verificada a partir de cruzamentos de isolados monospóricos e através da amplificação da região HMG-box. Com os resultados obtidos, foram formados seis grupos morfológicos, com base na coloração da colônia e formação de setores. A análise de similaridade morfológica demonstrou variações fenotípicas entre os isolados da mesma região. As árvores filogenéticas demonstraram que não houve relação entre o agrupamento e região geográfica, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre os microorganismos. Foram observadas variações quanto à produção de enzimas extracelulares, sendo que a amilase apresentou as maiores relações halo/colônia. Os resultados dos estudos de virulência mostraram diferenças entre os índices da doença, incidência e taxa de transmissão entre isolados, nas cultivares testadas. Foi identificado o tipo compatível de sete isolados, a partir dos cruzamentos monospóricos e, posteriormente confirmada à presença do gene *MAT-2*, através da amplificação da região HMG-box. O conjunto amostral de isolados avaliados apresenta variabilidade morfo-genética. A atividade enzimática dos isolados estudados pode ser relacionada à virulência, com destaque para os isolados LPS15 e LPS17, como os mais virulentos. O primer ChHMG2 é eficiente na amplificação da região HMG-box, correspondente ao gene *MAT-2* para *B. oryzae*.

**Palavras-chave:** *Bipolaris oryzae*, variabilidade, filogenética, virulência, *mating type*.

## Abstract

RODRIGUES-SILVA, Wellington. **Morphogenetic, virulence and detection of genes of sexual compatibility in *Bipolaris oryzae* isolates from Rio Grande do Sul.** 2017, 84f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

*Bipolaris oryzae* is the causal agent of brown spot of rice and has the seed as its main source of inoculum. Morphological and aggressiveness variations can occur due to the number of nuclei in their cells. The aim of this study was evaluate the morphogenetic variability, the virulence and to detect the genes of sexual compatibility of *Bipolaris oryzae* isolates from Rio Grande do Sul. Fifteen fungal isolates from different RS regions were used. The grouping was performed according to morphological characteristics, mycelial growth and sporulation and, afterwards, submitted to similarity analysis. From the amplification of the ITS region and the gene encoding the GAPDH enzyme, phylogenetic analysis was performed by the *Neighbour-Joining* method. The isolates were evaluated for enzymatic activity in solid medium, virulence in seeds and seedlings of the cultivars BRS Sinuelo CL and Puitá Inta CL. Sexual compatibility was verified from crosses of monosporic isolates and through the amplification of the HMG-box region. From the obtained results, six morphological groups were formed, based on colony coloration and formation of sectors. The analysis of morphological similarity demonstrated phenotypic variations among isolates from the same region. The phylogenetic trees showed that there was no relation between the group and geographic region, suggesting the occurrence of gene flow among the microorganisms. Variations were observed in the production of extracellular enzymes, and the amylase presented the highest halo/colony relationships. The results of the virulence studies showed differences between the index of disease, incidence and transmission rate among isolates in the tested cultivars. The compatible type of seven isolates was identified from the monosporic crosses and confirmed to the presence of the *MAT-2* gene through the amplification of the HMG-box region. The sample of evaluated isolates presents morphogenetic variability. The enzymatic activity of the studied isolates may be related to virulence, especially the LPS15 and LPS17 isolates, as the most virulent. The primer ChHMG2 is efficient in the amplification of the HMG-box region, corresponding to the *MAT-2* gene for *B. oryzae*.

**Key words:** *Bipolaris oryzae*, variability, phylogenetic, virulence, mating type.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Isolados representando os agrupamentos morfológicos de *Bipolaris oryzae*. FAEM/UFPeI, 2017. .... 23
- Figura 2.** Curvas de crescimento micelial de todos os isolados de *Bipolaris oryzae*. FAEM/UFPeI, 2017. .... 25
- Figura 3.** Dendrograma resultante da análise de isolados de *Bipolaris oryzae* com base em caracteres morfológicos, utilizando o método de agrupamento UPGMA. O coeficiente de similaridade é de 0.81. FAEM/UFPeI, 2017. .... 28
- Figura 4.** Dendrograma baseado na análise “*Neighbour-Joining*” derivado das sequências das regiões ITS do rDNA, com base em 1000 réplicas de “*bootstrap*”, de isolados de *Bipolaris oryzae*. O isolado LPS20 foi usado como “*outgroup*”. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os isolados. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de “*bootstrap*” na qual as ramificações foram observadas. FAEM/UFPeI, 2017. .... 30
- Figura 5.** Dendrograma baseado na análise “*Neighbour-Joining*” derivado das sequências parciais do gene codificador da proteína gliceraldeído-3fosfato-desidrogenase, com base em 1000 réplicas de “*bootstrap*”, de isolados de *Bipolaris oryzae*. O isolado LPS20 foi usado como “*outgroup*”. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os isolados. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de “*bootstrap*” na qual as ramificações foram observadas. FAEM/UFPeI, 2017. .... 32
- Figura 6.** Halos produzidos pela degradação do substrato pelas enzimas: A) protease; B) amilase; C) pectinase; D) celulase; E) esterase. FAEM/UFPeI, 2017. .... 42
- Figura 7.** Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de amilases. FAEM/UFPeI, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). .... 43
- Figura 8.** Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de proteases. FAEM/UFPeI, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). .... 44
- Figura 9.** Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de esterases. FAEM/UFPeI, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). .... 45
- Figura 10.** Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de celulases. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). .... 46
- Figura 11.** Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de pectinases. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). .... 47

- Figura 12.** Médias da relação halo/colônia (H/C) de todos os isolados para atividade enzimática de cada teste. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ..... 48
- Figura 13.** Plântulas de arroz infectadas por *Bipolaris oryzae*. A) classificação de acordo com o grau da lesão; B) semente colonizada C) colonização coleóptilo; D) conídio de *B. oryzae*. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. .... 48
- Figura 14.** Plântulas de arroz com sintomas de mancha parda em folhas. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. .... 52
- Figura 15.** A) Formação da fase sexuada de *Bipolaris oryzae in vitro*; B) Pseudotécios sobre papel filtro; C) Ascas e ascósporos de *Cochliobolus miyabeanus*; D) Ascas bitunicadas e ascósporos em forma helicoidal. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. .... 60
- Figura 16.** Expressão do gene *MAT-2* em *Bipolaris oryzae*. 1) Marcador molecular 100 pb; 2) LPS07; 3) LPS07; 4) LPS08; 5) LPS13; 6) Branco. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. .... 62
- Figura 17.** Regiões orizícolas do Rio Grande do Sul (Adaptado de KLERING et al., 2016). FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. .... 79
- Figura 18.** 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. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. .... 82
- Figura 19.** Estádios de crescimento de plântulas de arroz. V1) Colar formado na primeira folha do ramo principal; V2) Colar formado na segunda folha do ramo principal; V3) Colar formado na terceira folha do ramo principal; V4) Colar formado na terceira folha do ramo principal; V5) Colar formado na quinta folha do ramo principal. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. .... 83
- Figura 20.** Folhas de arroz com lesões de mancha parda e severidades de: A) 1-5%; B) 6-25%; C) 26-50%; e D) >50%. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. .... 84

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> presentes no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	19
<b>Tabela 2.</b> Grupos morfológicos dos isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> . FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. .	24
<b>Tabela 3.</b> Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação ( $\times 10^4$ conídios/mL) dos isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> . FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	26
<b>Tabela 4.</b> Características morfológicas dos conídios de <i>Bipolaris oryzae</i> . FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	27
<b>Tabela 5.</b> Relação dos isolados, espécies e identidades, com os códigos de acesso ao GenBank, resultantes da comparação com sequências parciais da região ITS e com o gene codificador da GAPDH. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	29
<b>Tabela 6.</b> Isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> presentes no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Pelotas. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	37
<b>Tabela 7.</b> Percentual de infecção por <i>Bipolaris oryzae</i> nas classes da escala de transmissão semente-plântula, índice da doença (ID) e taxa de transmissão (TT) em sementes de arroz da cultivar BRS Sinuelo CL. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	51
<b>Tabela 8.</b> Percentual de infecção por <i>Bipolaris oryzae</i> nas classes da escala de transmissão semente-plântula, índice da doença (ID%) e taxa de transmissão (TT%) em sementes de arroz da cultivar Puitá Inta CL. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	51
<b>Tabela 9.</b> Percentual do índice da doença (ID%) e incidência (%) de <i>Bipolaris oryzae</i> em plântulas de arroz das cultivares Puitá Inta-CL e BRS Sinuelo CL. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	53
<b>Tabela 10.</b> Isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> presentes no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Pelotas FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	57
<b>Tabela 11.</b> Sexualidade e tipo compatível de isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	60
<b>Tabela 12.</b> Meio mínimo para produção de exoenzimas. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	81
<b>Tabela 13.</b> Meio mínimo para produção de pectinases. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	81
<b>Tabela 14.</b> Listagem e composição das soluções utilizadas. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	81
<b>Tabela 15.</b> Escala de notas para avaliação dos danos ocasionados por <i>Bipolaris oryzae</i> a partir da transmissão semente – plântula de arroz. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	82
<b>Tabela 16.</b> Escala de desenvolvimento de plântulas de arroz. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	83
<b>Tabela 17.</b> Escala de avaliação da severidade de <i>Bipolaris oryzae</i> em folhas de plântulas de arroz. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017. ....	84

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução geral</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Capítulo 1 - Variabilidade morfogênética de isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> de diferentes locais do Rio Grande do Sul</b> .....	<b>17</b>
2.1	<b>Introdução</b> .....	<b>17</b>
2.2	<b>Material e Métodos</b> .....	<b>19</b>
2.2.1	<b>Variabilidade morfológica</b> .....	<b>19</b>
2.2.2	<b>Crescimento micelial</b> .....	<b>20</b>
2.2.3	<b>Densidade e morfologia dos conídios</b> .....	<b>21</b>
2.2.4	<b>Variabilidade genética</b> .....	<b>21</b>
2.2.5	<b>Análise da similaridade</b> .....	<b>22</b>
2.3	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>23</b>
2.4	<b>Conclusão</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Capítulo 2 – Atividade de enzimas extracelulares e virulência de diferentes isolados de <i>Bipolaris oryzae</i></b> .....	<b>35</b>
3.1	<b>Introdução</b> .....	<b>35</b>
3.2	<b>Material e Métodos</b> .....	<b>37</b>
3.2.1	<b>Atividade de enzimas extracelulares</b> .....	<b>37</b>
3.2.2	<b>Avaliação da virulência</b> .....	<b>39</b>
3.3	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>42</b>
3.3.1	<b>Atividade de enzimas extracelulares</b> .....	<b>42</b>
3.3.2	<b>Virulência dos isolados em sementes de arroz</b> .....	<b>48</b>
3.3.3	<b>Virulência dos isolados em plântulas de arroz</b> .....	<b>52</b>
3.4	<b>Conclusão</b> .....	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Capítulo 3 – Compatibilidade sexual e detecção dos genes de compatibilidade sexual em <i>Bipolaris oryzae</i></b> .....	<b>55</b>
4.1	<b>Introdução</b> .....	<b>55</b>
4.2	<b>Material e Métodos</b> .....	<b>57</b>
4.3	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>59</b>
4.4	<b>Conclusão</b> .....	<b>64</b>
4.5	<b>Considerações finais</b> .....	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>79</b>

## 1 Introdução geral

Entre as culturas anuais, o arroz (*Oryza sativa* L.) ocupa posição de destaque, do ponto de vista econômico e social. A espécie se destaca pela adaptabilidade aos mais diversos ecossistemas. Entre os produtos destinados à alimentação humana, é o segundo em importância, ficando atrás apenas, do trigo e, em algumas partes do mundo, principalmente na Ásia, é base da alimentação de sua população (FAO, 2015).

A estimativa da produção mundial do grão para safra 2017/18 é de mais de 506 milhões de toneladas, sendo esperadas 11,8 milhões de toneladas produzidas no Brasil (FAO, 2017; USDA, 2017), deixando o país em uma posição de destaque no cenário orizícola mundial e com grande potencial de crescimento. A produção brasileira se concentra na região Sul, onde o Estado do Rio Grande do Sul destaca-se como o principal produtor e responsável por 68,8% da produção nacional. As boas condições climáticas da safra 2017/2018 geraram uma expectativa de aumento de 15% em relação à safra anterior, sendo esperada uma colheita com cerca de 8,5 milhões de toneladas em área de 1,12 milhões de hectares (CONAB, 2017; IRGA, 2017). A produtividade do Estado na safra de 2016/2017 foi de 7,8 mil quilos por hectare, considerada abaixo da expectativa daquele ano, devido ao fenômeno El Niño (IRGA, 2016).

Ainda que, o Rio Grande do Sul ocupe papel importante no cenário orizícola brasileiro, existem diversos fatores que determinam perdas na produtividade, principalmente em função das condições fitossanitárias, devido à presença de insetos praga, plantas daninhas e/ou patógenos. Dentre as doenças que reduzem a produtividade e a qualidade dos grãos, bem como a qualidade fisiológica da semente, em ordem decrescente de importância, são: brusone (*Pyricularia grisea*), mancha-parda (*Bipolaris oryzae*), mancha-de-grãos (complexo de patógenos) e escaldadura (*Gerlachia oryzae*) (KIMATI et al., 2005; SOSBAI, 2014).

A mancha parda, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem [teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi)], tem aumentado em importância. Há relatos que a redução na produtividade em resposta à epidemia

desta doença pode atingir até 74%, devido à redução no número de grãos por panícula e peso dos grãos (KOHLS et al., 1987; MOLETTI et al., 1997, SOSBAI, 2014). A qualidade de grão também pode ser afetada com a descoloração e mancha das glumas, principalmente no cultivo irrigado, o que leva à diminuição no peso de grãos, aumento do percentual de espiguetas estéreis e, quando em alta severidade, aumento do número de grãos quebrados no beneficiamento do grão (MALAVOLTA et al., 2007; SOSBAI, 2014).

Em folhas os sintomas da doença se manifestam na forma de manchas necróticas com halos amarelados, podendo ocorrer em todos os estádios fenológicos da cultura (PADWICK, 1950; PRABHU; FILIPPI; RIBEIRO, 1999). Na colonização do fungo no tecido hospedeiro está envolvida a produção de enzimas extracelulares e de toxinas não específicas, formadas juntamente com a germinação do conídio e que promovem a ruptura dos tecidos superficiais das células, diminuem a quantidade de cloroplastos e promovem a formação de manchas cloróticas e colapso celular (SCHICKLI; PECIH, 1984; XIAO et al., 1991).

Para que ocorra a penetração do fungo à parede celular deve haver uma combinação entre a dissolução enzimática da cutícula da planta hospedeira e a força mecânica exercida pelas estruturas de infecção do patógeno (SHADECK et al., 1998; LEITE; STANGARLIN, 2008). Neste contexto, entra em ação a turgescência das estruturas de infecção, como o apressório, que auxilia no combate à resistência imposta pelo tecido vegetal, e a produção das enzimas extracelulares, com papel fundamental na desintegração dos componentes celulares, pois a resistência do tecido da planta é muitas vezes superior à pressão exercida pelas estruturas de penetração, logo, na prática, é impossível o sucesso da penetração da hifa somente pela força mecânica (MACDONALD et al., 2002; MEDEIROS; FERREIRA; DIANESE, 2003; PASCCHOLATI et al., 2008). As enzimas extracelulares mais estudadas nas relações patógeno-hospedeiro são as amilases, celulases, esterases, lipases, pectinases e proteases (GRIFFIN, 1994; FERNANDES et al., 2012; WENZEL et al., 2013; MYTHILI et al., 2014).

Uma das características das espécies do gênero *Bipolaris*, apresentar variabilidade em vários aspectos, como morfológico, fisiológico, genético e patogênico (KAMAL; MIA, 2009; KUMAR et al., 2011; CASTELL-MILLER, 2012). Este gênero é resultante da divisão do gênero *Helminthosporium*, onde se concentrava grande número de espécies fitopatogênicas causadoras de manchas

foliares em diversas famílias botânicas, principalmente na família Poaceae. A partir de estudos filogenéticos e morfológicos, como morfologia dos conídios, conidiogênese e sua associação com a fase teleomórfica, este gênero foi revisado e dividido em três novos gêneros: *Bipolaris* (teleomorfo *Cochliobolus*) por Shoemaker (1959), *Drechslera* (teleomorfo *Pyrenophora*) por Ito (1930) e *Exserohilium* (teleomorfo *Setosphaeria*) por Leonard e Suggs (1974) (OU, 1985, ALCORN, 1988).

A variabilidade presente nesse gênero é explicada pela condição multinucleada das células, como também pela heterocariose, que pode levar a recombinação mitótica desses fungos (MEW; GONZALES, 2002; FARIAS, 2007; MANN, 2014). Podem ocorrer ainda, processos como mutações, dissociação de heterocários, recombinação e parassexualidade (GLASS et al., 2000; MCDONALD; LINDE, 2002).

As variações na virulência de um fitopatógeno é resultado da interação de vários fatores, como a produção de enzimas extracelulares, fitotoxinas, hormônios e até mesmo proteínas (PASCHOLATI, 1993; CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002). Durante a interação planta-patógeno vários genes são expressos, os quais estão estreitamente relacionados à síntese de exoenzimas atuantes da degradação da parede vegetal (KAHMANN; BASSE, 2001).

A obtenção de informações acerca da variabilidade fisiológica em espécies do gênero *Bipolaris* tem se baseado em métodos como a produção de enzimas extracelulares capazes de degradar diversos substratos e de toxinas, como por exemplo, a toxina HmT (toxina T) produzida por *Cochliobolus heterostrophus* (anamorfo *B. maydis*), responsável pela queima das raízes em plântulas e alterações na fotossíntese. (MEDEIROS, 2003; CHAND et al., 2014; ZAINUDIN et al., 2015).

É importante salientar que a reprodução sexuada contribui significativamente para o aumento da variabilidade e no surgimento de genótipos recombinantes para a maioria dos fungos fitopatogênicos (GALBIERI; URASHIMA, 2008; SALEH et al., 2012). Trabalhos realizados por Farias et al. (2011) descrevem a formação da fase sexuada em laboratório através do pareamento entre isolados monospóricos. Muitos desses pareamentos foram realizados com isolados do mesmo campo de produção, o que sugere a formação dessa fase em condições de campo.

A reprodução sexual em fungos pode ocorrer entre indivíduos com o mesmo material genético ou entre células do mesmo indivíduo, nesse caso o fungo é

chamado de homotático ou autofértil, mas a reprodução sexual pode ocorrer ainda entre indivíduos com diferenças genéticas, onde o fungo precisa de um “parceiro sexual” para realizar o acasalamento, sendo conhecidos como heterotáticos ou autoestéreis e os grupos sexuais definidos por genes de compatibilidade, como no caso dos fungos do gênero *Bipolaris* (ALEXOPOULOS et al., 1996, ROBERTSON et al., 1998, GLASS et al., 2000, SAUPE, 2000; HICKEY et al., 2002).

Na reprodução sexuada heterotática, os parceiros de um cruzamento são geneticamente diferentes, embora idênticos morfológicamente, pois a diferenciação morfológica sexual é rara nestes microrganismos. O que torna esses fungos geneticamente distintos é a existência de certas sequências genéticas em um parceiro e em outro não. Esse sistema genético é definido por genes de compatibilidade, conhecidos como genes do locus *MAT* (*mating type*) (ROBERTSON et al., 1998, GLASS et al., 2000, HICKEY et al., 2002; FERREIRA, 2005).

Este locus é estruturalmente incomum, porque as duas sequências alternativas (*MAT-1* e *MAT-2*) são completamente diferentes, mas ocupam a mesma posição cromossômica, por esse motivo, chamados de idiomorfos e não alelos. Os genes dos loci *MAT* possuem regiões conservadas que se denominam  $\alpha$ -box (para o idiomorfo *MAT-1*) e HMG-box (para o idiomorfo *MAT-2*) e garantem que apenas os núcleos geneticamente distintos irão se fundir e passar por meiose antes da formação dos esporos sexuais, pois codificam fatores de transcrição que controlam a produção de feromônios e seus respectivos receptores de membrana (CONDE-FERRÁEZ, 2007).

A fase teleomórfica do gênero *Bipolaris*, representada pelo gênero *Cochliobolus*, apresenta espécies autoestéreis (homotáticas, exigindo parceiros geneticamente distintos) e auto férteis (heterotáticas, não exigindo nenhum parceiro obrigatório), ou seja, todas as espécies heterotáticas podem ter *MAT-1* ou *MAT-2*, ao passo que espécies homotáticas podem transportar tanto *MAT-1* e *MAT-2* no mesmo núcleo de um indivíduo (TURGEON et al., 1993).

No Brasil a fase sexuada ainda não foi relatada a campo, porém em outros países como nos Estados Unidos, esta fase já é relatada ocorrendo em campos de produção de arroz desde 1956 (DICKSON, 1956). Além do Brasil, em países como Japão, México e Iran, existem vários relatos da formação da fase sexuada em condições de laboratório (COILA, 2009; FARIAS et al., 2011; CASTELL-MILLER; SACAC, 2012; AHMADPOUR et al, 2017, NO PRELO).

Uma ferramenta que vêm sendo bastante utilizada para detecção dos genes *MAT* é a técnica de PCR-(Polymerase Chain Reation) que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença de DNA polimerase (ZABEAU, 1993) combinado com primers específicos que auxiliam na amplificação das regiões  $\alpha$ -box e HMG-box, responsáveis pela transcrição dos genes *MAT-1* e *MAT-2*, respectivamente, e a partir disso obter informações sobre a frequência desses genes de compatibilidade na população estudada. (CASTELL-MILLER; SAMAC, 2012).

Outros trabalhos relatam o sucesso do uso de alguns primers, juntamente com a técnica do PCR multiplex, que identifica múltiplas sequências alvo dentro de uma mesma amostra, para conhecimento da frequência dos idiomorfos em espécies de ascomicetos (MOHAMMADIAN et al., 2011).

A biologia molecular também tem contribuído significativamente com a fitopatologia no tocante aos marcadores moleculares que fornecem informações biológicas e que levam a identificação precisa de espécies, isto porque os estudos genômicos permitem selecionar, *a priori*, genes associados à determinada característica e testar se seus variantes contribuem para variações no fenótipo (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Contudo, conhecer a frequência e as possíveis causas das variações morfológicas, genéticas, patogênicas, fisiológicas e a ocorrência de reprodução sexuada em fitopatógenos são de suma importância no desenvolvimento de estratégias de manejo e controle de doenças, pois a alta variabilidade leva à quebra da resistência de cultivares aos agentes causais ou a perda da suscetibilidade a fungicidas (KANDAN et al., 2014; NAZARI et al., 2015).

Diante do exposto, e no intuito de conhecer melhor as variações em populações do fungo *B. oryzae*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade morfogenética e a virulência deste fitopatógeno, assim como determinar os genes de compatibilidade sexual e a sexualidade, através cruzamentos e de primers específicos, em isolados de diferentes regiões orizícolas do Rio Grande do Sul.

## **2 Capítulo 1 - Variabilidade morfogenética de isolados de *Bipolaris oryzae* de diferentes locais do Rio Grande do Sul**

### **2.1 Introdução**

O fungo *Bipolaris oryzae* pode apresentar variabilidade genética e morfológica, quanto ao crescimento micelial, esporulação, germinação, coloração das colônias, além de variações na virulência. Fitopatógenos com alta variabilidade são difíceis de diagnosticar e controlar, pois a variabilidade morfológica impede a correta identificação do agente causal, assim como a variabilidade fisiológica dificulta avaliações de patogenicidade (COILA, 2008; KAMAL; MIA, 2009; KUMAR; ANSHU; KUMAR, 2011; CASTELL MILLER, 2012; KUMAR et al., 2016). A variabilidade presente nesta espécie é resultado de uma série de fatores, baseados principalmente no grande número de núcleos geneticamente diferentes nas células, tanto das hifas como nos conídios, proporcionado pela heterocariose e suas posteriores consequências, assim como pela ocorrência de processos como mutações, formação e dissociação de heterocários, recombinação e parassexualidade, muitas vezes evidenciada pela presença de setores nas colônias (GLASS et al., 2000; MCDONALD; LINDE, 2002).

A estrutura genética de populações está relacionada à quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações, e é uma consequência da interação de mecanismos evolutivos, como mutação, sistemas de reprodução, fluxo gênico ou migração, os quais contribuem para a variabilidade. Dessa forma, o conhecimento da diversidade fenotípica e genotípica na população de patógenos é um passo importante no desenvolvimento de estratégias controle de doenças, pois a alta variabilidade leva à perda da suscetibilidade a certos fungicidas com o desenvolvimento de resistência quantitativa ou qualitativa (MCDONALD; LINDE, 2002; KANDAN et al., 2015; NAZARI et al., 2015).

Os marcadores moleculares são usados como ferramentas importantes para a caracterização da diversidade genética de fitopatógenos nos quais as características morfológicas não são capazes de diferenciar corretamente as

variações intra e interespecíficas (BURGOS et al., 2013). No entanto, os caracteres genéticos fúngicos são altamente influenciados por condições ambientais e culturais. A região geográfica é também um dos principais fatores que influenciam a estrutura genética de fungos fitopatogênicos. Isto se deve principalmente a vários tipos de solo e a certos hospedeiros alternativos, como plantas daninhas, que servem como fontes de inóculo (BISWAS et al., 2008; ARCHANA; KUKANDHURU; HARISHCHANDRA, 2014).

O rDNA (DNA ribossomal) é muito utilizado em estudos moleculares envolvendo microrganismos patogênicos e fornece informações relevantes a respeito da diversidade genética (PIANZZOLA et al., 2004; JEON; WAXMAN; BERGSTROM, 2011; NGUYEN; LEE, 2015; KHEMMUK et al., 2016). Além de estar presente em todos os organismos, o rDNA evolui rapidamente e, em vista disso, é apropriado para distinguir espécies crípticas e até mesmo variantes de uma mesma espécie.

Atualmente, o centro de várias pesquisas tem sido no uso de múltiplos marcadores moleculares que levem a uma identificação acurada das espécies, tais como as sequências dos genes que codificam a actina (ACT) e a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GADPH). Alguns autores ressaltam que os marcadores GAPDH podem determinar as posições filogenéticas das espécies do gênero *Bipolaris*, pois as regiões codificadoras e seus íntrons frequentemente apresentam mais variações que a região ITS (WEIR et al., 2012; KIHARA et al., 2014; SANAHUJA; LOPEZ, 2016).

As regiões ITS (genes 18S, 5.8S e 28S) carregam informações sobre a filogenia e o nível taxonômico, uma vez que têm evoluído lentamente e são altamente semelhantes dentro de diferentes táxons (FUNGARO, 2000). O fato das regiões ITS serem relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (CARBONE; KOHN, 1997; SKOUBOE et al., 1999; LEAL-JUNIOR, 2002). Como consequência disso, é possível encontrar um grande número de sequências ITS de diferentes fungos disponíveis nos bancos de sequências de nucleotídeos.

Populações de *B. oryzae* foram estudadas em vários países produtores de arroz, como Bangladesh, Canadá, Filipinas, Índia e Iran. Os autores desses trabalhos utilizaram caracteres morfológicos e genéticos para verificar a variabilidade fenotípica e genotípica do fungo (OUEDRAOGO et al., 2004; MOTLAGH; KAVIANI,

2008; KUMAR; ANSHU; KUMAR, 2011; KANDAN et al., 2015; NAZARI et al, 2015; KUMAR et al., 2016).

Neste contexto, o presente trabalho teve como conhecer a variabilidade morfofenética de isolados de *B. oryzae* de regiões orizícolas do Rio Grande do Sul.

## 2.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) e de Virologia Vegetal (LVV), do Departamento de Fitossanidade pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os isolados fúngicos de *B. oryzae* foram provenientes da coleção do LPSFF, estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Isolados de *Bipolaris oryzae* presentes no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Cidade	Região
LPS05	Dom Pedrito	Campanha
LPS06	Pelotas	Zona Sul
LPS07	Camaquã	Zona Sul
LPS08	Cachoeira do Sul	Depressão Central
LPS09	Santo Antônio da Patrulha	Planície Costeira Externa
LPS10	Tapes	Planície Costeira Interna
LPS11	Pedro Osório	Zona Sul
LPS12	Tapes	Planície Costeira Interna
LPS13	Mostardas	Planície Costeira Externa
LPS14	Pelotas	Zona Sul
LPS15	São Lourenço	Zona Sul
LPS16	Pelotas	Zona Sul
LPS17	São Lourenço	Zona Sul
LPS18	Rio Grande	Zona Sul
LPS19	Jaguarão	Zona Sul
LPS20	Pelotas	Zona Sul

### 2.2.1 Variabilidade morfológica

Os isolados foram avaliados e agrupados de acordo com a morfologia da colônia. Para isso, discos de micélio de cada isolado foram repicados em placas de Petri, com oitenta e cinco centímetros de diâmetro, contendo meio BDA (batata-

dextrose-ágar) e incubados a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas luz, expostas a luz fluorescente branca. Após o crescimento das colônias procedeu-se a análise morfológica com base na observação da coloração, forma, elevação, formato da borda e presença ou ausência de setores. Os isolados que apresentaram características semelhantes foram incluídos em um mesmo grupo morfológico.

### 2.2.2 Crescimento micelial

Para o crescimento micelial (CM), foram utilizadas placas de Petri com oitenta e cinco centímetros de diâmetro contendo o meio de cultivo BDA, sendo realizadas quatro repetições para cada isolado. Foi inoculado no centro de cada placa um disco de BDA contendo o material fúngico. As placas foram vedadas, identificadas e incubadas à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e luz branca.

As avaliações foram realizadas por medições do diâmetro micelial (média de duas medidas diametralmente opostas), utilizando-se paquímetro digital, a cada 24 horas a partir da instalação do experimento, perdurando até a quinta avaliação, representando o crescimento máximo. A partir dos resultados foi calculado o Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) através da fórmula descrita por Oliveira (1992):

$$\text{IVCM} = \left\{ \frac{\sum(D - D_a)}{N} \right\}$$

Onde: IVCM= índice de velocidade do crescimento micelial; D = diâmetro médio atual da colônia;  $D_a$  = diâmetro médio da colônia no dia anterior; e N = número de dias após a inoculação na placa.

Para fins estatísticos os dados obtidos foram transformados para  $\sqrt{x}$  e analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ( $p \leq 0,05$ ). Constatando-se significância estatística, o IVCM de cada isolado foi comparado pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

### 2.2.3 Densidade e morfologia dos conídios

Para a avaliação da densidade de conídios discos de micélio de cada isolado foram repicados em placas de Petri contendo meio AA (ágar-água) e incubados a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas luz, expostas a luz fluorescente branca para promover a esporulação. Após a esporulação das colônias, foram preparadas suspensões de conídios de cada isolado através da adição de 50 mL de água destilada às placas de Petri. Com o auxílio de um pincel realizou-se raspagem da colônia fúngica de modo que fossem liberadas as estruturas reprodutivas do fungo do meio de cultura. A suspensão obtida foi filtrada em copo tipo béquer, com auxílio de um funil de vidro e camada de gaze. A suspensão foi homogeneizada e, em seguida, quantificada o número de conídios com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Durante a quantificação da densidade de conídios também foram realizadas observações quanto à morfologia destes. Para isso, os conídios foram fotografados e medidos. Foram medidos o comprimento, largura e realizada a contagem do número de septos em uma amostra de 30 conídios de cada isolado, com auxílio do programa Motic Image Plus 2.0.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ( $p\leq 0,05$ ). Constatando-se significância estatística, o comprimento, a largura e o número de septos de cada isolado foram comparados pelo teste de Duncan ( $p\leq 0,05$ ).

### 2.2.4 Variabilidade genética

Para a caracterização molecular, foi realizada a extração de DNA total dos isolados, conforme descrito por Doyle & Doyle (1991). O DNA dos isolados foi utilizado em uma reação de PCR com volume final de 50  $\mu\text{L}$  contendo 30,5  $\mu\text{L}$  de água DEPC, 10,0  $\mu\text{L}$  de tampão PCR Buffer 10X (Tris HCl 0,2 M pH 8,4, KCl 0,5 M), 4,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTP 10  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA Polimerase 5 U/ $\mu\text{L}$ , 2,0  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA genômico e 1,0  $\mu\text{L}$  dos primers ITS-4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS-5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') para a região ITS e os primers GPD-F (5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3') e GPD-R (5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTG-3') para o gene que codifica a GADPH. Para a amplificação da região ITS a reação de PCR seguiu as seguintes condições de amplificação: desnaturação a 95°C durante 2 min, seguido por 34 ciclos de 95°C durante 1 min, 50°C durante 1 min, 72°C durante 1 min e com uma extensão final a 72°C durante 10 min. Para GADPH a reação de amplificação procedeu-se com um ciclo de desnaturação a 95°C durante 2 min, seguido por 34 ciclos de 95°C durante 1 min, 50°C durante 1 min, 72°C durante 1 min, 72°C durante 0,45 s, com extensão final de 72°C durante 10 min. Na fase de extensão final da PCR com os primers GPD-R e GPD-F houve um incremento de 0,45 s por ciclo. Todas as reações foram mantidas a 4°C. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X a 100V cm<sup>-1</sup>, utilizando-se 5 µL de reação.

Os fragmentos amplificados foram purificados com kit de purificação (PROMEGA), utilizando o protocolo do produto, e encaminhados para sequenciamento automático das bases nucleotídicas na empresa Helixxa. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank (Tabela 6).

### 2.2.5 Análise da similaridade

A análise morfológica levou em consideração a coloração da colônia, forma, elevação, formato da borda e presença ou ausência de setores, também foram inseridos nessa análise o IVCM, comprimento e largura dos conídios e número de septos.

Baseado na matriz de similaridade de caracteres morfológicos foi construído dendrograma utilizando o método de agrupamento das médias das distâncias (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – UPGMA). O estudo de relacionamento filogenético foi desenvolvido através da Distância Euclidiana. Nas análises foram incluídos os caracteres dos 15 isolados de *B. oryzae* e de um isolado de *Exserohilium rostratum*.

As sequências genéticas foram analisadas pelo algoritmo *Blastn*, disponível online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os alinhamentos múltiplos das

sequências de nucleotídeos (nt) e a geração das matrizes de similaridade foram realizadas com o auxílio do programa BioEdit.

A análise filogenética foi realizada com as sequências parciais dos genes dos isolados obtidos e de uma sequência *outgroup*, de *E. rostratum*. As sequências foram alinhadas utilizando o ClustalW (v. 1.6) em MEGA 6.06. A árvore filogenética foi construída pelo método *Neighbour-Joining* com o software MEGA 6.06 e 1000 repetições de *bootstrap*.

### 2.3 Resultados e Discussão

Os 15 isolados analisados apresentaram grande variabilidade quanto à morfologia colonial (Figura 1), sendo formados seis grupos distintos, classificados de acordo com a cor e presença ou ausência de setores em: colônia de cor branca e presença de setores (grupo I), colônia de cor branca e ausência de setores (grupo II), colônia de cor cinza e presença se setores (grupo III), colônia de cor cinza e ausência de setores (grupo IV), colônia de cor negra com presença de setores (grupo V) e colônia de cor negra e ausência de setores (VI). O grupo que obteve o maior número de isolados foi o grupo VI e nenhum isolado foi classificado no grupo II. O menos frequente foi o grupo IV onde foi classificado apenas um isolado, conforme Tabela 2.



Figura 1. Isolados representando os agrupamentos morfológicos de *Bipolaris oryzae*. FAEM/UFPel, 2017.

Tabela 2. Grupos morfológicos de *Bipolaris oryzae*. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Grupo	Características	Número de isolados	Isolados
I	Branco com setores	4	LPS06, LPS08, LPS12 e LPS16
II	Branco sem setores	0	-
III	Cinza com setores	2	LPS11 e LPS18
IV	Cinza sem setores	1	LPS15
V	Negro com setores	2	LPS09 e LPS14
VI	Negro sem setores	6	LPS05, LPS07, LPS10, LPS13, LPS17 e LPS19

Os setores são zonas de coloração diferenciadas do micélio que iniciam normalmente com a mesma textura e, posteriormente, vão se modificando em relação ao restante. Setores são formados geralmente em culturas assexuadas e haplóides dos fungos fitopatogênicos e estão relacionados à ocorrência de mutações somáticas (CAMARGO, 1995). Essas mutações ocorrem, principalmente, por erros na duplicação cromossômica durante a mitose (KISTLER; MIAO, 1992). A presença ou ausência de setores, juntamente com a coloração da colônia tem sido utilizada para demonstrar a variabilidade em alguns fitopatógenos, entre eles *B. oryzae* (SOUZA RIBEIRO; GALLI, 1994; ARTIGIANI FILHO; BENDENDO, 1996; REBELO 2003), em vista disso, a simples presença de setores e a variação da coloração da colônia evidenciam a existência de variabilidade entre os isolados.

A coloração da colônia fúngica é mediada pela produção de melanina, um polímero pigmentado e escuro que se acumula em paredes de células fúngicas. *B. oryzae* produz 1,8-dihidroxinaftaleno(DNH)-melanina, sendo que três genes estão envolvidos na biossíntese desse polímero, o *PKS1*, *SCD1* e o *THR1* (MORIWAKI et al., 2004; KIHARA et al., 2004). Desta forma, para que as colônias tenham a cor escura é necessária a presença e expressão desses genes. Kumar, Anshu e Kumar (2011) relataram que as condições climáticas também influenciam na coloração da colônia. Estes autores ainda verificaram que isolados que formavam colônias negras eram mais agressivos que colônias de coloração cinza ou branca.

Em alguns patossistemas, como *Magnaporthe grisea* x arroz, o papel da melanina na patogenicidade já é esclarecido. Pesquisas revelaram que o mecanismo que leva ao aumento de turgor no apressório deste fitopatógeno depende das vias metabólicas que coordenam o acúmulo de altas concentrações intracelulares de glicerol e que melanização da parede celular do apressório é responsável por manter o glicerol no interior da célula, pois a melanina torna a

parede impermeável a este. Mutantes não melanizados de *M. grisea* não foram capazes de gerar ou manter o turgor dos apressórios e, por consequência, não penetraram as células e não provocaram doença (CHUMLEY, VALENT, 1990; DE JONG et al., 1997; MONEY et al., 1997).

Quanto ao crescimento micelial, foi possível observar diferenças nas velocidades em que cada isolado cresceu após a inoculação e mesmas condições nutricionais, de luz e temperatura (Tabela 3; Figura 2). Os isolados LPS08 e LPS09 mostraram um crescimento acelerado em comparação aos demais, registrando um diâmetro médio de 18,29 e 15,17 cm, respectivamente, após as primeiras 24 horas, além disso, estes dois isolados foram os primeiros a alcançarem o crescimento máximo da pala de Petri, com IVCM de 13,33 e 14,60.

O isolado LPS05 demonstrou o menor crescimento entre todos os isolados, apresentando um diâmetro médio de 8,61 cm na primeira avaliação e apenas 19,09 cm após os cinco dias de cultivo, não alcançando o fechamento da placa. O IVCM deste isolado foi de 3,72. O IVCM dos isolados LPS12, LPS13, LPS14 e LPS16 não foram estatisticamente diferentes, com um IVCM médio de 12,13.

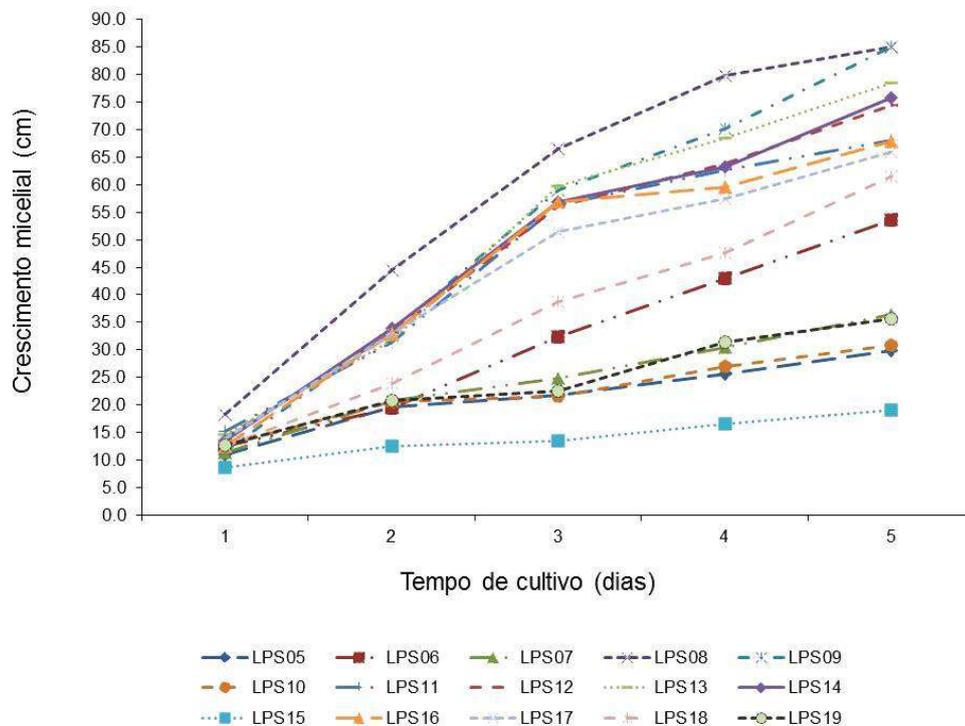


Figura 2. Curvas de crescimento micelial de todos os isolados de *Bipolaris oryzae*. FAEM/UFPel, 2017.

A contagem de conídios de *B. oryzae* demonstrou uma variação de  $1,35 \times 10^4$  a  $3,65 \times 10^4$  conídios/mL (Tabela 3). A maior esporulação foi observada no isolado LPS10, classificado no grupo VI como negro e sem setores, destacando que as maiores esporulações foram observadas em isolados deste mesmo grupo. As menores esporulações foram observadas nos LPS09, LPS16 e LPS18, porém não diferenciaram estatisticamente dos isolados LPS11, LPS12 e LPS14, todos pertencentes a grupos com formação de setores na colônia. Resultado semelhante foi relatado por Kumari, Kumar e Rani (2015), onde foi observada maior esporulação em isolados de cor negra e crescimento suprimido e menor esporulação em isolados de cores cinza e branco de crescimento cotonoso.

Tabela 3. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e esporulação ( $\times 10^4$  conídios/mL) dos isolados de *Bipolaris oryzae*. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	IVCM	Esporulação ( $\times 10^4$ conídios/mL)
LPS05	3.72 G <sup>1/</sup>	2.62 B
LPS06	8.20 E	2.35 B
LPS07	5.11 F	2.58 B
LPS08	13.33 B	2.47 B
LPS09	14.60 A	1.45 C
LPS10	3.60 G	3.65 A
LPS11	10.66 D	2.22 BC
LPS12	12.17 C	2.1 BC
LPS13	12.63 BC	2.62 B
LPS14	12.52 BC	2.25 BC
LPS15	2.19 H	2.67 B
LPS16	11.23 CD	1.35 C
LPS17	10.51 D	3.1 AB
LPS18	9.81 D	1.54 C
LPS19	4.70 G	3.24 AB

<sup>1/</sup> médias acompanhadas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

A morfologia dos conídios, mensurada pelo comprimento, largura e número de septos, também evidenciou a existência de variação fenotípica entre os isolados. Quanto às dimensões, as médias dos comprimentos dos conídios variaram de 109,76  $\mu\text{m}$  para o isolado LPS18, sendo que este não diferiu estatisticamente dos isolados LPS08, LPS11, LPS16 e LPS17, a 75,26  $\mu\text{m}$  para o isolado LPS10 que não diferiu dos isolados LPS14 e LPS19 (Tabela 4).

Tabela 4. Características morfológicas dos conídios dos isolados de *Bipolaris oryzae*. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Número de septos
LPS05	90,79 DEF <sup>1/</sup>	13,06 DE	9,05 BC
LPS06	95,99 CD	13,69 BCD	10,25 A
LPS07	98,72 BCD	10,62 G	9,05 BC
LPS08	102,89 ABC	13,56 CD	10,20 A
LPS09	90,36 DEF	14,58 AB	8,50 CD
LPS10	75,26 G	11,55 F	7,10 F
LPS11	104,35 ABC	12,67 E	9,75 AB
LPS12	94,12 CDE	12,48 E	10,00 A
LPS13	96,12 CD	12,42 E	10,05 A
LPS14	80,87 FG	14,08 BC	7,50 EF
LPS15	88,87 DEF	14,55 AB	9,10 BC
LPS16	112,98 A	13,72 BCD	10,65 A
LPS17	108,36 AB	15,19 A	10,15 A
LPS18	109,76 A	12,91 DE	10,00 A
LPS19	84,90 EFG	12,20 EF	8,05 DE

<sup>1/</sup>médias acompanhadas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

A média da largura dos conídios variou de 10,62  $\mu\text{m}$  no isolado LPS07 a 15,19  $\mu\text{m}$  nos conídios do isolado LPS17. Conídios dos isolados LPS05, LPS11, LPS12, LPS13, LPS18 e LPS19 não foram estatisticamente diferentes quanto à largura. O maior número de septos foi observado nos conídios dos isolados LPS06, LPS08, LPS11, LPS12, LPS13, LPS16, LPS17 e LPS18 e os isolados LPS10 e LPS14 apresentaram poucos septos por conídio, com média de 7,0 septos por conídio. Segundo Sivanesan (1987) os conídios de *B. oryzae* possuem de 6 a 14 septos transversais e medem de 11,0 a 22,0  $\mu\text{m}$  de largura e 63,0 a 150,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. Kumar et al. (2016) ao caracterizar morfológicamente isolados da Índia, observou conídios com dimensões médias de 115,7  $\mu\text{m}$  comprimento e 15,8  $\mu\text{m}$  de largura, porém não quantificou os septos.

Na análise de agrupamento hierárquico os isolados de *B. oryzae* foram separados em três grupos distintos, apresentando coeficiente de similaridade médio, para as variáveis morfológicas, de 0,86, indicando adequação no agrupamento e presença de variabilidade entre os isolados (ROHLF, 1970).

No grupo 1 encontram-se os isolados LPS07 e LPS10, destacando que estes isolados também ficaram no mesmo grupo quando foram classificados quanto a cor e presença ou ausência de setores. No grupo 2 estão os isolados LPS06, LPS08,

LPS11, LPS12, LPS15, LPS16, LPS17 e LPS18. Com exceção do isolado LPS17, os demais estão distribuídos em dois grupos quanto a cor e a presença de setores (grupos I e III) e a maioria procedentes da Zona Sul do Estado, exceto dos isolados LPS08 e LPS12 que são de regiões distintas. Neste grupo predominaram os isolados de coloração clara, branco ou cinza, e ausência de setores. O terceiro grupo foi formado pelos isolados LPS05, LPS09, LPS13, LPS14 e LPS19, todos de coloração negra e provenientes de diferentes locais de coleta (Figura 11).

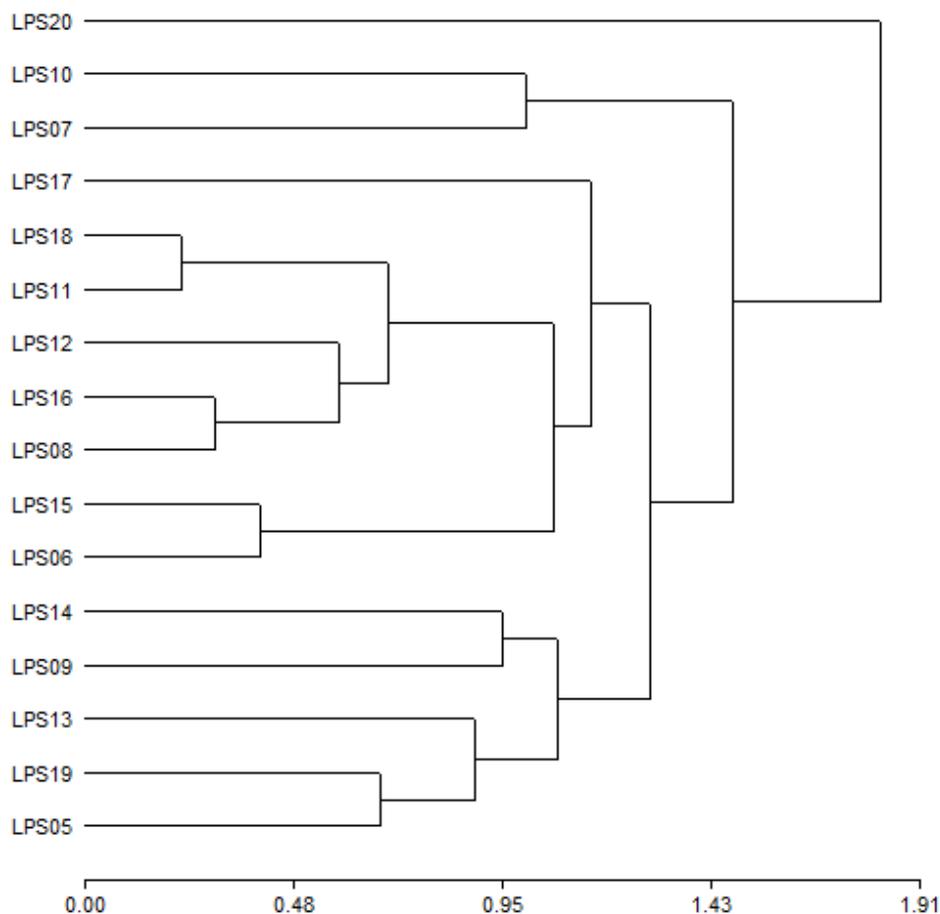


Figura 3. Dendrograma resultante da análise de isolados de *Bipolaris oryzae* com base em caracteres morfológicos, utilizando o método de agrupamento UPGMA. O coeficiente de similaridade é de 0.81. FAEM/UFPel, 2017.

O fungo *E. rostratum* (LPS20) foi usado nesta análise como *outgroup* e, dessa forma, não foi classificado em nenhum grupo, evidenciando a diferença deste com os demais. Estes dois gêneros, *Bipolaris* e *Exserohilium*, apresentam características morfológicas semelhantes, separados apenas com base na morfologia dos conídios, como tamanho, número de septos, curvatura e presença ou ausência de célula

desproporcionalmente aumentada (SIVANESAN, 1987). A inserção do isolado de *E. rostratum* na análise de similaridade demonstra variações intra e interspecíficas quanto a morfologia de *B. oryzae*.

Grande parte dos isolados pertencem a diferentes cidades e regiões orizícolas, com condições edafoclimáticas distintas. Os grupos 2 e 3 foram divididos em subgrupos e embora a relação entre o agrupamento e a região de coleta seja baixa, notou-se uma tendência dos isolados se aglomerarem segundo sua coloração. Porém, é salienta-se que o fator região pode ser um dos responsáveis pela variabilidade intraespecífica.

Esta análise fornece importantes a cerca da distribuição espacial dos fenótipos do patógeno e da adaptação local ou inadequada desses indivíduos a ambientes espacialmente heterogêneos, como o Rio Grande do Sul, e por meio disso entender melhor sobre os processos evolutivos dessa espécie.

Na comparação das sequências de nucleotídeos dos isolados em estudo com sequências disponíveis no GenBank, foram observadas similaridades acima de 83,0% para sequências da região ITS e de 87,0% para o gene da GAPDH (Tabela 5).

Tabela 5. Relação dos isolados, espécies e identidades, com os códigos de acesso ao GenBank, resultantes da comparação com sequências parciais da região ITS e com o gene codificador da GAPDH. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017.

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

A árvore filogenética com as sequências parciais da região ITS foi capaz de separar os isolados em três grandes grupos e cinco subgrupos, e a partir desses, foi constatada alta diversidade genotípica nos isolados de *B. oryzae* das diferentes áreas amostrais do Rio Grande do Sul (Figura 4).

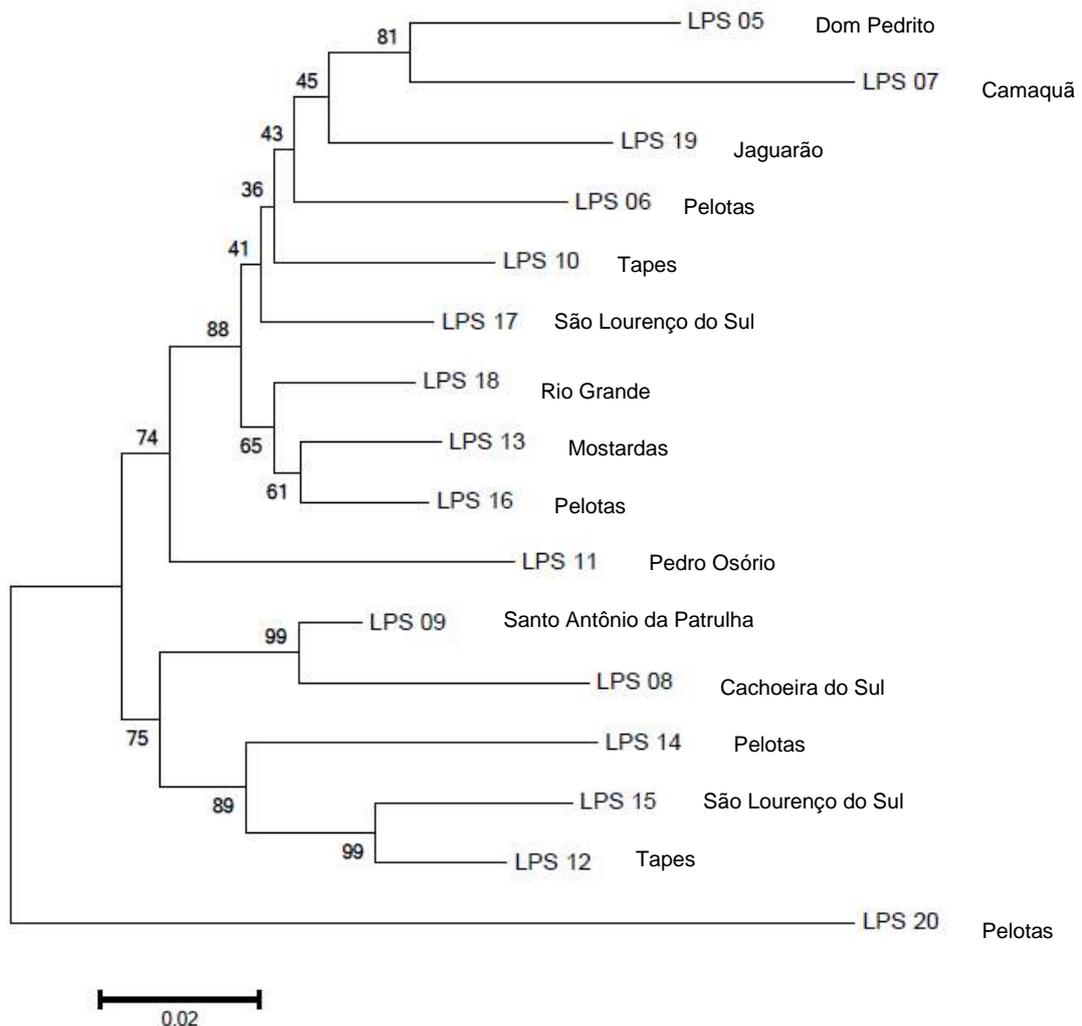


Figura 4. Dendrograma baseado na análise “*Neighbour-Joining*” derivado das sequências das regiões ITS do rDNA, com base em 1000 réplicas de “*bootstrap*”, de isolados de *Bipolaris oryzae*. O isolado LPS20 foi usado como “*outgroup*”. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os isolados. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de “*bootstrap*” na qual as ramificações foram observadas. FAEM/UFPeI, 2017.

Nesta árvore gerada pelo método de *Neighbour-Joining*, os isolados LPS08, LPS09, LPS12, LPS14 e LPS15 foram reunidos no mesmo grupo, suportados por valores de *bootstrap* de 99, 89 e 99 %, demonstrando alta similaridade entre estes. O segundo grupo foi formado por vários isolados, onde os isolados LPS13, LPS16 e LPS18 foram considerados geneticamente similares com *bootstraps* acima de 60%.

No terceiro grupo foram reunidos os isolados LPS05, LPS06, LPS07, LPS10, LPS17 e LPS19. Dentro deste grupo a maior similaridade foi observada entre os isolados LPS05 e LPS07 (81%), sendo que os demais isolados apresentaram *bootstraps* abaixo de 45%. O isolado LPS20 foi usado como *outgroup* na intenção de analisar a distância filogenética que este se encontra de *B. oryzae*, dessa forma, este isolado não ficou em nenhum dos grupos formados e geneticamente distante dos isolados de *B. oryzae*.

Os isolados LPS08 e LPS09, além de localizarem-se no mesmo grupo, foram altamente semelhantes, com *bootstrap* de 99%. Apesar de pertencerem a grupos morfológicos distintos, os dois são formadores de setores em suas colônias. Assim como nesses dois isolados, foi observado que não houve relação entre o agrupamento genético e a região de coleta, pois em nenhum grupo foram classificados isolados provenientes do mesmo município de coleta, evidenciando, apesar da baixa amostragem, considerável variabilidade genética entre esses isolados. Este fato pode ser explicado pela migração de indivíduos entre cultivos próximos, como por exemplo, os isolados de Pelotas e Rio Grande, proporcionando, o aparecimento de populações geneticamente diferenciadas. Esta migração pode estar ocorrendo tanto através da troca de material propagativo, como sementes, ou pela dispersão dos esporos do patógeno pelo vento (SIVANESAN, 1987).

Estes resultados são similares aos encontrados por Dela Paz et al. (2006) que também verificaram elevada variabilidade entre isolados de *B. oryzae*. Khemmuk et al. (2016) observaram diversidade genética em um complexo de fungos causadores de manchas foliares em genótipos de arroz, entre eles *B. oryzae*, sendo que os isolados da Austrália apresentaram grande diversidade na região norte do país. Abordagens filogeográficas também já foram base de estudos em outros patossistemas como *Mycosphaerella graminicola* x trigo (STUKENBROCK; MCDONALD, 2008), *Phytophthora infestans* x batata (GOSS et al., 2014), *Rhizoctonia solani* x tomate (WIBBERG et al., 2013), *Rhynchosporium commune* x cevada (MCDONALD, 2015) e *Ustilago maydis* x milho (MUNKACSI et al., 2008).

Os resultados desta análise sugerem a ocorrência de fluxo gênico entre estes microrganismos, onde os genes são trocados entre populações geograficamente separadas, modificando suas estruturas genéticas. Segundo Barret et al. (2008), patógenos que apresentam elevado fluxo gênico podem apresentar população com maior diversidade genética.

Em relação à árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene que codifica a enzima GAPDH os isolados foram agrupados de forma diferente, quando comparados à análise anterior. Nesta árvore os isolados foram separados em cinco grupos distintos e seis subgrupos, embasados por altos valores de *bootstrap*. O isolado LPS20 também foi usado como *outgroup* e não agrupou com nenhum isolado. Os agrupamentos observados por esta árvore foram sustentados por valores de *bootstrap* maiores que os observados na árvore com base nas sequências da região ITS, pois na árvore baseada nas sequências do gene codificador da GAPDH cinco agrupamentos alcançaram 100%, indicando que em todas as repetições de *bootstrap* essas ramificações foram observadas (Figura 5).

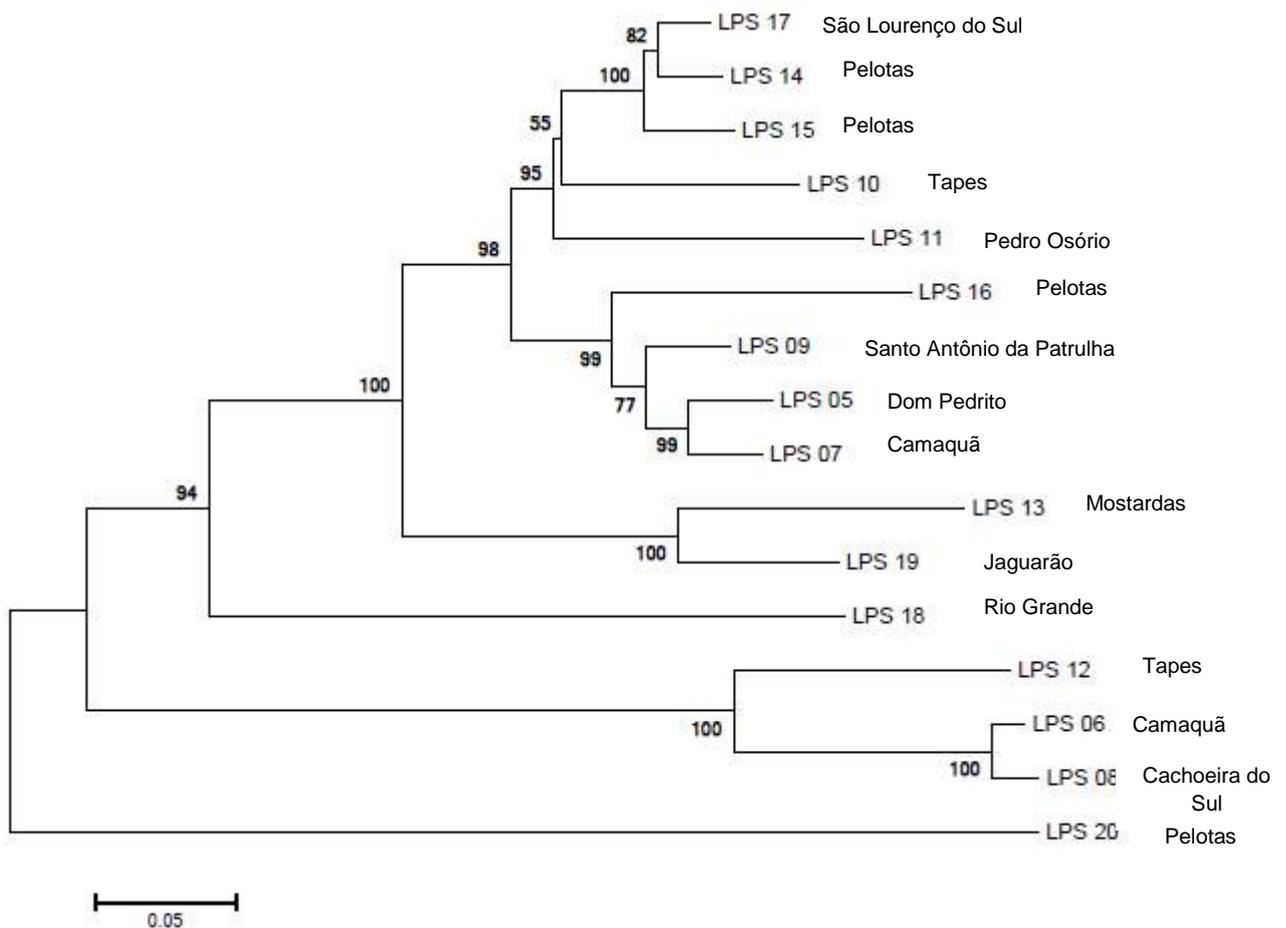


Figura 5. Dendrograma baseado na análise “*Neighbour-Joining*” derivado das sequências parciais do gene codificador da proteína gliceraldeído-3fosfato-desidrogenase, com base em 1000 réplicas de “*bootstrap*”, de isolados de *Bipolaris oryzae*. O isolado LPS20 foi usado como “*outgroup*”. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os isolados. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de “*bootstrap*” na qual as ramificações foram observadas. FAEM/UFPEl, 2017.

Os isolados LPS06, LPS08 e LPS12 reuniram-se no mesmo grupo, os dois com 100% de *bootstrap*, sendo que os isolados LPS06 e LPS08 ficaram a uma curta distância genética. Estes dois isolados também foram observados no mesmo grupo na classificação morfológica, formando colônias de coloração branca e com setores. O mesmo ocorreu com os isolados LPS05 e LPS07, classificados como negros e não formadores de setores. O isolado LPS18, mostrou-se geneticamente diferente do conjunto de isolados estudados.

Os resultados desta análise reforçam a hipótese da ocorrência do fluxo gênico neste fitopatógeno, possivelmente devido à troca de material genético entre indivíduos de populações diferentes, gerando novas combinações genéticas e maior diversidade. Apesar de ser considerado um fungo de reprodução predominantemente assexuada, existem exemplos de migração e mudança genética entre fungos clonais e membros recombinantes da mesma espécie em outras localidades geográficas (TAYLOR et al., 1999; ZAFFARANO et al., 2009).

A existência de elementos transponíveis nesta espécie também é um fator que explica esta variação, uma vez que os transposons possam ter um papel importante na estruturação do genoma de *B. oryzae*, permitindo um aumento na adaptação deste fitopatógeno a diferentes regiões. Os transposons já são relatados proporcionando benefícios em espécies do gênero *Bipolaris*, como os teleomorfos de *B. sorokiniana*, *B. maydis* e *B. zeicola* (PANACCIONE et al., 1996; KODAMA et al., 2000; NASCIMENTO, 2004).

Tazick e Tajick-Ghanbary (2013) utilizaram as sequências do gene codificador da GAPDH e conseguiram separar, filogeneticamente, isolados de *B. oryzae* de outras espécies do mesmo gênero, difíceis de serem separadas com base em análise morfológica, como *B. sorghicola*, *B. zea*, *B. australiensis*, entre outras. A variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum* spp. também foi avaliada por meio de alguns marcadores moleculares, entre eles o gene da GAPDH, verificando maior eficácia quando este foi utilizado (MORENO, 2016).

A variabilidade genotípica de *B. oryzae* tem sido abordada em alguns países como a Índia, Filipinas, Iran e China (MOTLAGH; ANVARI, 2010; BURGOS et al., 2013; ARCHANA; KUKANDHURU; HARISHCHANDRA, 2014) e a fonte de variação atribuída às diferentes regiões geográficas e a variedade de cultivares hospedeiras cultivadas. Em sistemas extensos de cultivo, existe uma ampliação de recursos do hospedeiro para o patógeno, proporcionando o aumento de sua população, sendo

que em grandes populações a endogamia é menor e o aumento da diversidade genética, devido ao acúmulo de mutações é maior. Em função disso, o patógeno é capaz de responder rapidamente a medidas de controle, como implantação de fungicidas ou genes de resistência (BRUNNER et al., 2013; HARTMANN; SÁNCHEZ-VALLET; MCDONALD, 2017).

Independente da reduzida amostragem foi possível observar que os dois marcadores moleculares utilizados para inferir sobre a variabilidade genética dos isolados de *B. oryzae* apresentaram diferenças nos perfis de agrupamento, contudo, na análise filogenética onde se fez uso do marcador GAPDH, os agrupamentos foram sustentados por altos valores de *bootstrap*, sugerindo maior confiabilidade na utilização deste marcador.

Ao se confirmar o que os resultados deste estudo sugerem, ou seja, alta variabilidade, poderá se inferir sobre o potencial evolutivo deste patógeno e ainda traçar as melhores estratégias aplicadas a grupos de patógeno com este perfil de estrutura genética.

## **2.4 Conclusão**

O conjunto de isolados de *B. oryzae* estudados apresenta elevada variabilidade morfológica, de velocidade de crescimento micelial e esporulação.

Existe variação morfo-genética nos isolados de *B. oryzae*, entre e dentro das regiões geográficas amostradas.

### **3 Capítulo 2 – Atividade de enzimas extracelulares e virulência de diferentes isolados de *Bipolaris oryzae***

#### **3.1 Introdução**

A mancha parda do arroz, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* tem sido relatada em todos os países produtores de arroz nas Américas, na Ásia e África. A doença prevalece em regiões de planície e está associada à baixa fertilidade do solo (WEBSTER; GUNNELL 1992).

Os sintomas da doença se manifestam na forma de manchas necróticas em folhas e glumas e descoloração dos grãos (PADWICK, 1950; PRABHU; FILIPPI; RIBEIRO, 1999). A mancha parda pode ocorrer em todos os estádios fenológicos da cultura, porém, nas condições do Rio Grande do Sul os estádios iniciais de desenvolvimento e estágio reprodutivo são os mais suscetíveis (BALARDIN, 2003).

Em plântulas, os sintomas são manchas necróticas de coloração marrom, podendo ocorrer também distorção das folhas. Nos coleóptilos, os sintomas são parecidos com os das folhas de plantas adultas, onde as lesões apresentam halo clorótico e centro de cor marrom pardo, tornando-se claro com o envelhecimento da lesão, passando para um tom acinzentado (OU, 1985). O halo clorótico é resultado da ação de toxinas do patógeno formadas durante o processo de colonização dos tecidos da planta (XIAO et al., 1991; MEW; GONZALES, 2002). Nas panículas, as glumas apresentam coloração marrom quando na presença do fungo, contribuindo para o complexo causador da mancha das glumas (WEBSTER; GUNNELL, 1992).

O fungo *B. oryzae* é considerado necrotrófico, pois causa primeiramente a morte da célula hospedeira para então utilizar seus nutrientes (WEBSTER; GUNNELL, 1992). A colonização do fungo nos tecidos da planta está estreitamente relacionada à produção de enzimas extracelulares e toxinas não específicas, formadas logo após o início da germinação do conídio, como as toxinas Ofiobulina A e Ofiobulina B.

As enzimas extracelulares produzidas por fungos fitopatogênicos são indispensáveis no processo de infecção do hospedeiro, na desintegração dos componentes estruturais das células, além de afetarem diretamente o protoplasto (PASCHOLATI, 2011). Por consequência, o patógeno é considerado um invasor passivo, incapaz de desenvolver força para romper as barreiras estruturais do hospedeiro e sendo dependente de enzimas ou outros metabólitos para sua patogenicidade. Dentre as exoenzimas mais estudadas estão às amilases, celulasas, lipases, pectinases, proteases e esterases. Estas enzimas são potencialmente importantes na patogênese, pois destroem o plasmalema, componente da parede celular (GRIFFIN, 1994; POLONI, 2008).

A virulência de um determinado patógeno depende de vários fatores, dentre eles a produção de enzimas, fitotoxinas e hormônios, cujos produtos também são importantes para determinar a patogenicidade e o impedimento da ativação do sistema de defesa da planta (PASCHOLATI, 1993). Por outro lado, pesquisas envolvendo os produtos resultantes da expressão de diferentes genes por parte dos patógenos relatam a importância destes na patogenicidade e virulência de microrganismos fitopatogênicos (MEDEIROS; FERREIRA; DIANESE, 2003).

Genes com ligação direta e comprovada na patogenicidade já foram clonados em alguns fungos fitopatogênicos. Estes genes estão envolvidos em várias fases da infecção, como na funcionalidade do apressório, produção de enzimas, toxinas e reprodução do patógeno (ZHENG et al., 2000; TSUGI et al., 2003).

Park et al. (2002) clonaram e deletaram o gene *MST12* de *Magnaporthe grisea*, responsável pela formação do apressório e crescimento no hospedeiro e verificaram que mutantes nulos (sem o gene) formavam apressório, mas eram incapazes de penetrar as células epidérmicas e quando inoculados por ferimentos, as lesões não apresentaram incremento de tamanho, afetando diretamente a virulência do patógeno através de um defeito no crescimento infeccioso.

A avaliação da virulência em plantas traz dados importantes sobre a variabilidade patogênica em fungos. Assim, estudos da variabilidade fisiológica e patogênica são de grande importância, pois podem fornecer informações valiosas de como o patógeno interage com a planta hospedeira, permitindo a identificação de

isolados hipoavirulentos ou avirulentos, as quais poderiam contribuir para estratégias de controle de doenças (KAMAL; MIA, 2009; BURGOS et al., 2013).

Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade *in vitro* de enzimas extracelulares e a severidade de diferentes isolados de *B. oryzae* em sementes e plântulas de arroz.

### 3.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF), pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Os isolados fúngicos de *B. oryzae* foram provenientes da coleção do LPSFF e estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Isolados de *Bipolaris oryzae* presentes no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Pelotas. FAEM/UFPEl, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Cidade	Região
LPS05	Dom Pedrito	Campanha
LPS06	Pelotas	Zona Sul
LPS07	Camaquã	Zona Sul
LPS08	Cachoeira do Sul	Depressão Central
LPS09	Santo Antônio da Patrulha	Costa Externa
LPS10	Tapes	Planície Costeira Interna
LPS11	Pedro Osório	Zona Sul
LPS12	Tapes	Planície Costeira Interna
LPS13	Mostardas	Planície Costeira Externa
LPS14	Pelotas	Zona Sul
LPS15	São Lourenço	Zona Sul
LPS16	Pelotas	Zona Sul
LPS17	São Lourenço	Zona Sul
LPS18	Rio Grande	Zona Sul
LPS19	Jaguarão	Zona Sul

#### 3.2.1 Atividade de enzimas extracelulares

A variabilidade fisiológica dos isolados foi avaliada através do método semiquantitativo de Cup Plate, onde se observa a produção de enzimas extracelulares em meios específicos (TEIXEIRA, 1996). Para isso, discos de micélio de cada isolado foram transferidos individualmente para placas de Petri contendo

meio mínimo (Anexo III) acrescido do substrato da enzima a ser avaliada. As placas foram mantidas em sala de crescimento por cinco dias a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições, em esquema unifatorial, sendo o fator de tratamento constituído por cada isolado fúngico.

### **3.2.1.1 Amilases**

Para avaliar a produção de amilases foi utilizado meio mínimo (MM) acrescido de 1% de amido solúvel ao meio de cultura. Após o crescimento do fungo, foi adicionado lugol a placa de Petri. Foi observada a formação de um halo ao redor da colônia, em contraste ao meio escurecido, indicando a atividade amilolítica.

### **3.2.1.2 Celulases**

A avaliação da atividade de celulases foi realizada através da adição de 1% de carboximetilcelulose (CMC) ao MM. Após o crescimento fúngico, a produção de celulase extracelular foi detectada adicionando-se na placa solução de vermelho-congo por 15 minutos. Em seguida o corante foi removido utilizando-se uma solução de NaCl 4N (Anexo III). A produção de celulases foi detectada pela formação de um halo alaranjado em contraste com o meio avermelhado.

### **3.2.1.3 Proteases**

A produção de proteases foi observada acrescentando 4% de gelatina ao MM. Após o período de incubação foi adicionada solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Anexo III), cujo precipitado tornou o ágar mais opaco, revelando as zonas claras ao redor das colônias, onde ocorreu a degradação da gelatina.

### **3.2.1.4 Pectinases**

Para análise de pectinases foi utilizado meio MM modificado (Anexo III) para atividade pectinolítica e acrescido de 1% de pectina cítrica. Após o crescimento do fungo, foi adicionado solução de brometo de hexadeciltrimetilamônia a 1% (Anexo

III). O halo transparente formado ao redor da colônia, em contraste com meio esbranquiçado, indicou a atividade peptonolítica.

### **3.2.1.5 Esterases**

Para detectar a atividade de esterases foi acrescido ao MM 1% de Tween 20, este autoclavado separadamente, e posteriormente adicionado ao meio antes de vertê-lo. Após o crescimento fúngico, as placas foram refrigeradas a 4°C por 48 h. 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 todos os testes a atividade enzimática foi quantificada por meio da análise da relação H/C, obtida pela divisão da média do diâmetro do halo (H) nas três repetições pela média do diâmetro da colônia (C).

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ( $p \leq 0,05$ ). Constatando-se significância estatística, as relações H/C de cada isolado foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.2.2 Avaliação da virulência**

A avaliação da virulência dos isolados foi realizada através da inoculação de sementes e plântulas de arroz das cultivares BRS Sinuelo CL (EMBRAPA) e Puitá Inta-CL (BASF S/A), fornecidas pela Embrapa Clima Temperado e pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, classificadas como moderadamente resistente e moderadamente suscetível, respectivamente, à mancha parda.

#### **3.2.2.1 Inoculação em sementes**

Para a avaliação da transmissão semente-plântula, sementes das duas cultivares foram inoculadas artificialmente e separadamente pelo método de condicionamento osmótico descrito por Coutinho (2001). Para isso, discos de micélio

de cada isolado foram transferidos às placas com meio BDA modificado osmoticamente com sacarose a -0,6 Mpa e incubados a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas luz, expostas a luz fluorescente branca, por 72 horas. Passado o tempo de incubação do fungo, as sementes de arroz das cultivares mencionadas foram depositadas sobre as colônias do patógeno, separadamente e em camada única, e incubadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em fotoperíodo de 12 horas luz por 48 horas. O controle foi constituído por sementes depositadas sobre o meio BDA modificado osmoticamente sem o fungo. Após a inoculação, em condições de assepsia, as sementes foram retiradas do meio BDA restritor, desinfestadas com hipoclorito de sódio por um minuto e secas em estufa com circulação de ar ( $30^\circ\text{C}$  por três horas).

Após secas, as sementes foram submetidas ao teste de qualidade sanitária conforme descrito nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Com auxílio de microscópio estereoscópio as sementes foram examinadas individualmente, sendo analisada a intensidade de colonização de *B. oryzae* sobre as sementes.

A partir do teste de qualidade sanitária 25 sementes, correspondentes a uma colonização moderada (25-50% da semente), foram retiradas das caixas plásticas e semeadas em copos plásticos (50 mL) com vermiculita estéril. Os copos foram acondicionados em câmara de incubação a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas, luz branca fluorescente e irrigação diária. Após sete dias da semeadura foi realizada a coleta das plântulas para avaliação de sintomas e/ou sinais ocasionados pelo fungo, sendo esses classificados de acordo a escala desenvolvida por Cardoso (2012) (Anexo), atribuindo-se: E0 = plântulas sem sintoma, E1 = plântulas com lesões típicas nas folhas, E2 = plântulas com lesões típicas no coleóptilo, E3 = plântulas com lesões típicas no coleóptilo e folhas, E4 = morte pós-emergência, E5 = morte de pré-emergência.

Os valores obtidos das plântulas infectadas foram utilizados para calcular o índice de doença - ID (%) e a taxa de transmissão - TT (%).

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

$$\text{ID (\%)} = \left\{ \frac{\sum (\text{Valor da escala} \times \text{número de plântulas com esta nota})}{(\text{Número de plântulas} \times \text{valor máximo da escala de notas})} \right\} \times 100$$

A taxa de transmissão TT (%) foi calculada pela seguinte fórmula, descrita anteriormente por Malavolta et al. (2002):

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

Para confirmar a presença do fungo, foram escolhidas ao acaso plântulas com lesões típicas de mancha parda e submetidas à câmara úmida em caixas plásticas previamente desinfestadas, contendo duas folhas de papel filtro umedecido, para induzir a esporulação. Depois de incubadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas por sete dias, as plântulas foram analisadas em microscópio estereoscópio para confirmar o agente causal dos sintomas.

A verificação de diferenças na virulência entre os isolados baseou-se na análise descritiva dos dados de índice da doença, incidência e da taxa de transmissão.

### 3.2.2.2 Inoculação em plântulas

A virulência em plântulas foi avaliada a partir da observação de sintomas provocados pelos diferentes isolados. Para isso, sementes de arroz das duas cultivares foram semeadas em caixas plásticas, contendo vermiculita e substrato comercial na proporção 1:1, e posteriormente acondicionadas em sala de incubação, sob  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo 12 horas de luz.

As plântulas ao atingirem ao estágio de desenvolvimento V2, segundo escala de Counce, Keisling e Mitchell (2000), foram desbastadas, deixando-se 10 plântulas por caixa, e inoculadas numa concentração de  $10^4$  conídios/mL, padronizada com auxílio de câmara de Neubauer. A inoculação foi realizada com aspersor manual e as plântulas mantidas em câmara úmida 24 horas antes e 24 horas após a inoculação. O controle consistiu na aspersão de água sobre as plântulas. Observações diárias foram realizadas para o registro dos primeiros sintomas.

Foi avaliada a incidência e a severidade das manchas nas folhas com auxílio de escala diagramática adaptada de Schwanck (2012) (Anexo VI), a partir da visualização dos primeiros sintomas e, posteriormente ao terceiro, sexto e nono dias.

Os valores obtidos foram utilizados para calcular o índice de doença (ID), de acordo com a fórmula estabelecida por Mickinney (1923) e as diferenças na virulência dos isolados verificadas a partir destes dados.

As folhas com lesões características de mancha parda foram cortadas, colocadas em câmara úmida e levadas a sala de incubação por sete dias e no término desse período foram realizadas preparações microscópicas para confirmar se as espécies fúngicas que estavam associadas às lesões eram as mesmas anteriormente inoculadas.

### 3.3 Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Atividade de enzimas extracelulares

A variabilidade fisiológica dos isolados de *B. oryzae* foi determinada a partir da capacidade de produzirem enzimas extracelulares por meio da quantificação de halos de degradação formados em meios específicos (Figura 6). A análise da produção enzimática tem sido bastante utilizada em estudos de variabilidade fisiológica de fitopatógeno por ser um método fácil e rápido para diferenciar isolados de uma mesma espécie, ademais Hancock e Millar (1965) relacionaram a atividade patogênica de alguns fungos fitopatogênicos com a produção de enzimas degradadoras da parede celular.

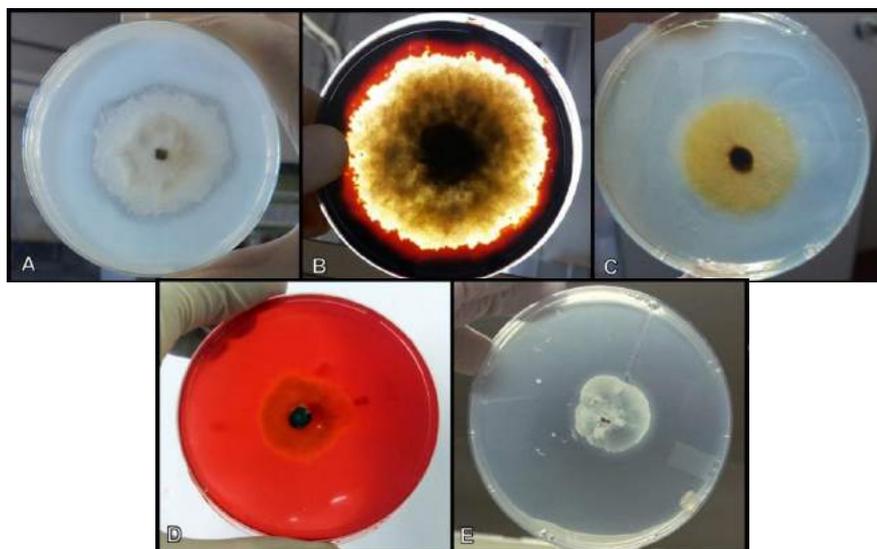


Figura 6. Halos produzidos pela degradação do substrato pelas enzimas: A) protease; B) amilase; C) pectinase; D) celulase; E) esterase. FAEM/UFPel, 2017.

A enzima amilase mostrou-se evidente entre 14 dos 15 isolados testados. Somente o isolado LPS05 não foi capaz de degradar o amido presente no meio. A maior atividade enzimática, expressa pela reação halo/colônia, foi observada pelo isolado LPS13 (H/C = 1,34) (Figura 7).

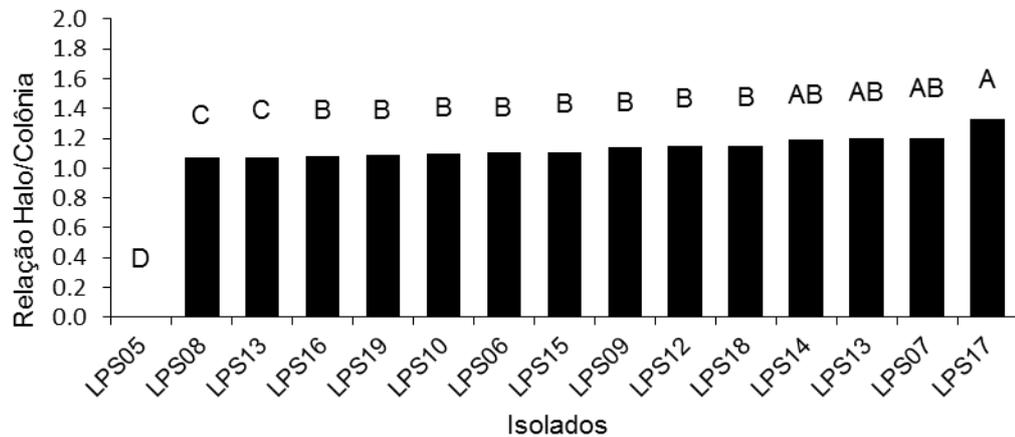


Figura 7. Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de amilases. FAEM/UFPel, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O amido, um polímero de glicose é o principal constituinte de reserva das células vegetais. A maioria dos fungos fitopatogênicos é capaz de produzir amilases, as quais são responsáveis pela degradação desse polissacarídeo em moléculas de glicose diretamente utilizáveis em atividades metabólicas desses microrganismos (PASCHOLATI, 2011).

Bertonha et al. (2016) avaliando a atividade enzimática de várias espécies de fungos, a fim de utilizá-los como fontes de enzimas úteis para a hidrólise de polissacarídeos da biomassa vegetal, observou halos de degradação de 3,3 cm para *Bipolaris* sp., 3,0 cm para *Curvularia* sp. e de 2,6 cm para *Fusarium* sp. também pela técnica de *cup plate*. Orlandelli et al. (2016) relatou um aumento na produção de amilases por *Bipolaris* sp. isolados de plantas de *Piper hispidum* e cultivados em meio de cultura contendo casca de abacaxi. Neste estudo foi utilizado meio mínimo contendo sais inorgânicos e amido solúvel como substrato à produção da enzima amilase, no qual foi possível identificar sua produção em 14 dos 15 isolados, sugerindo que, além da espécie e do isolado fúngico, a atividade amilolítica depende do meio de cultura e do método de detecção utilizado.

Em relação à atividade proteolítica, 13 isolados apresentaram atividade para esta enzima. Os isolados LPS06 e LPS19 não formaram halo de degradação do substrato em meio sólido. A atividade desta enzima foi baixa para todos os isolados que a formaram, sendo que as produções enzimáticas dos isolados LPS05, LPS08, LPS09, LPS10, LPS11, LPS12, LPS14, LPS16 e LPS17 não foram estatisticamente diferentes (Figura 8).

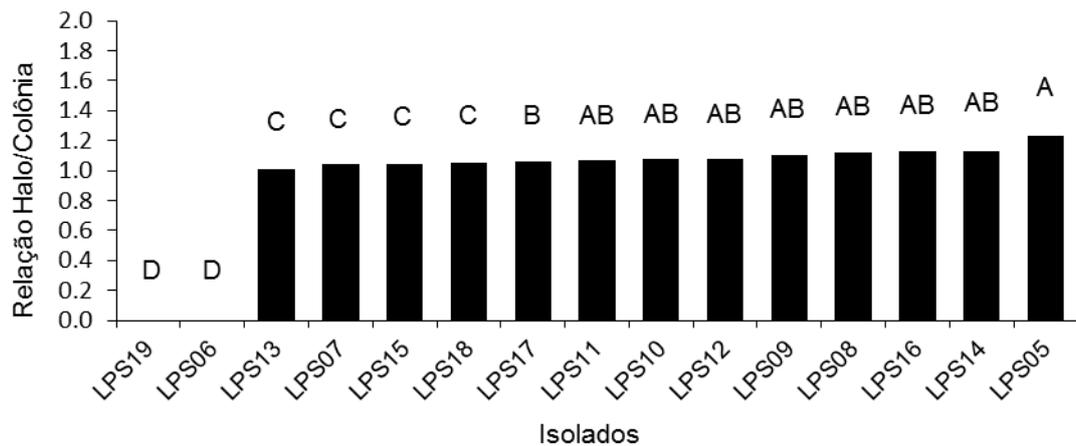


Figura 8. Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de proteases. FAEM/UFPEL, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados deste estudo opõem-se aos de Wenzel et al. (2013), onde não foi observada atividade de enzimas proteases em algumas espécies fúngicas, dentre elas *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Fusarium* sp e *Phoma* sp. No entanto, Mythili et al. (2014) relataram a formação de halos de degradação correspondentes a atividade proteolítica em 83,0% dos isolados de *Bipolaris* sp. e em 100% dos isolados de *Exserohilium* sp. utilizando a mesma técnica deste estudo. Orlandelli et al. (2015) avaliaram a atividade proteolítica de algumas espécies de fungos fitopatogênicos e endofíticos por meio da técnica de cup plate e observaram a formação halos com médias em torno de 4,8 cm.

A parede celular das plantas pode apresentar proteínas, porém seu conteúdo (em geral <10%) está diretamente relacionado às condições ambientais. Algumas dessas proteínas são facilmente degradadas por proteases graças a clivagem hidrolítica da ligação amida entre os grupos carboxila e amina dos aminoácidos formadores de ligação peptídica, em contrapartida existem proteínas difíceis de

serem degradadas por estas enzimas devido ao baixo número de ligações suscetíveis à ação enzimática (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; PASCHOLATI, 2011).

A atividade da enzima esterase foi observada em dez isolados. Os isolados LPS07, LPS13, LPS15, LPS16 e LPS19 não formaram halo de degradação do substrato pela enzima (Figura 9).

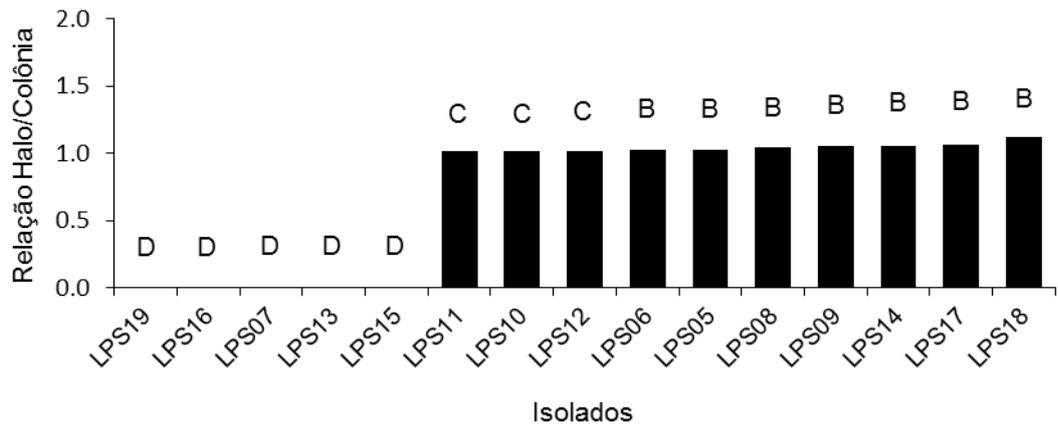


Figura 9. Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de esterases. FAEM/UFPel, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Segundo Gillespie e Langley (1974) as esterases se encontram em um grupo de enzimas que utilizam substratos múltiplos, frequentemente de origem externa e que respondem diretamente às diversidades ambientais.

As paredes das células epidérmicas dos vegetais em contato com o meio exterior, mostram-se recobertas por uma camada lipídica conhecida como cutícula. A cutícula por sua vez pode ser separada da parede celular em dois componentes: as ceras e a cutina. A cutina é um poliéster composto por ácidos graxos, cuja degradação por microrganismos patogênicos se dá através de enzimas cutinases, um tipo de esterase com um resíduo de serina no sítio catalítico que rompem as ligações ésteres entre as moléculas presentes na cutina.

O primeiro relato de purificação de esterases foi em *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, a partir de fluído extracelular, e desde então estudada em outros fungos fitopatogênicos, entomopatogênicos e endofíticos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *B. maydis*, *B. sorokiniana*, *Sclerotium rolfsii*, entre outros (PASCHOLATI et al., 1993). Fernandes et al. (2012) verificou baixa formação de

esterases nos fungos entomatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paelomyces* sp, com média de relação H/C de 1,0, independente da adição de glicose ao meio mínimo.

Para a atividade de celulases, três isolados não apresentaram atividade enzimática, LPS06, LPS14 e LPS19. O isolado LPS15 destacou-se com a maior atividade desta enzima (H/C = 2,0). Entre os demais isolados houve diferenças significativas nas relações halo/colônia (Figura 10).

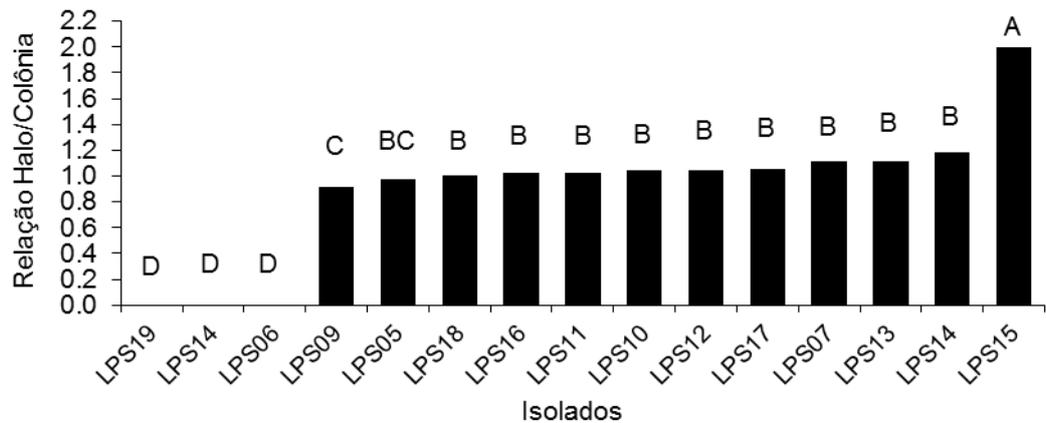


Figura 10. Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de celulases. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A celulose é um polissacarídeo de cadeias longas, formada por moléculas de glicose e constitui-se no principal componente estrutural das paredes celulares dos vegetais (20-30% nas paredes primárias e 40% em paredes secundárias). A degradação da celulose, com produto final em glicose, é realizada pela ação de diferentes celulases, resultado da ação de fitopatógenos.

Bansal et al. (2012) obtiveram alta produtividade de enzimas degradadoras de celulose, por fermentação sólida empregando farelo de trigo como fonte de carbono, utilizando o fungo *Aspergillus niger*. Mythili et al. (2014) mencionam a formação de halos de degradação de celulose em 83,0% dos isolados de *Fusarium* sp. e em 66% dos isolados de *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp., utilizados em seu estudo.

Na figura 11 encontram-se as relações halo/colônia para a atividade de pectinases. Dentre os 15 isolados, apenas oito ( LPS07, LPS09, LPS11, LPS12, LPS15, LPS16, LPS17 e LPS18) foram capazes de degradar o substrato através da produção de pectinases.

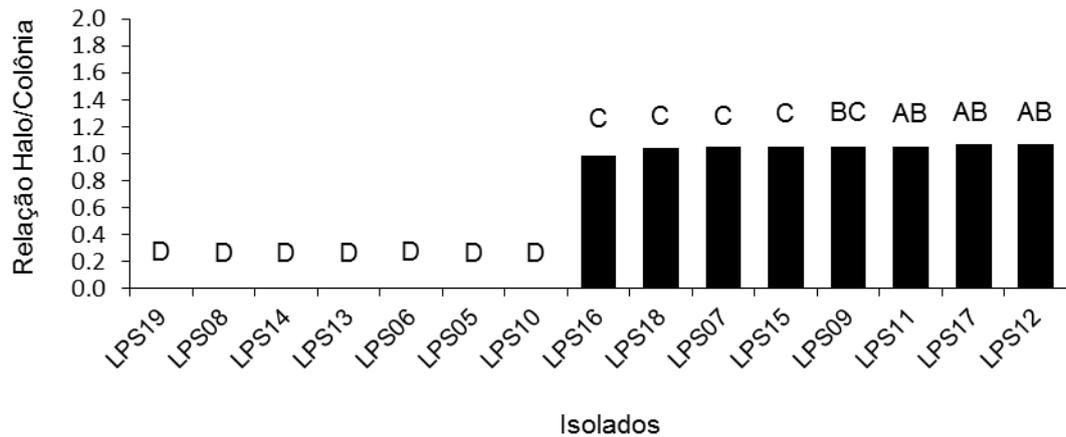


Figura 11. Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *Bipolaris oryzae* para a atividade de pectinases. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Estas enzimas atuam na degradação de substâncias pécicas (ácido poligalacturônico, ácido pécico e ramnogalacturonama) presentes na lamela média dos tecidos vegetais. As pectinases estão entre as mais estudadas entre as enzimas degradadoras de parede (EDP) em relação ao seu papel na patogenicidade. A razão desse interesse deve-se ao constante tratamento de tecidos vegetais com pectinases purificadas que ocasionam a separação e morte das células.

Trabalho realizado por Bertonha et al. (2016) corroboram os resultados encontrados neste estudo, pois não houve formação de pectinases em isolados de *Bipolaris* sp. Entretanto, Chand et al. (2014) quantificaram a atividade pectinolítica de 18 isolados de *B. sorokiniana* pertencentes a subpopulações selvagens e clonais e observaram concentrações médias que variaram de 0,76 a 17,87 U.mg<sup>-1</sup> proteína.

Considerando os resultados de cada teste, nenhuma enzima foi produzida por todos os isolados, porém para o teste da atividade aminolítica, quatorze dos quinze isolados produziram esta enzima. As médias das relações H/C de todos os isolados variaram de 0,56 para pectinases a 1,1 para amilases. A DMS do teste de Tukey para um nível de significância de 0,05 mostrou que apenas houve diferenças significativas entre as atividades das enzimas pectinases e amilases (Figura 12).

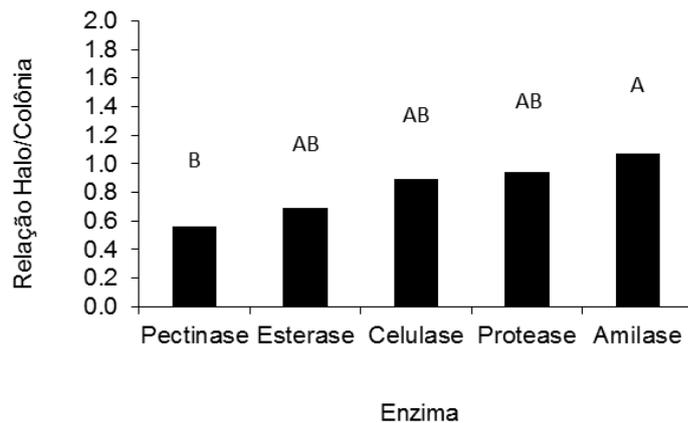


Figura 12. Médias da relação halo/colônia (H/C) de todos os isolados para atividade enzimática de cada teste. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017. Barras verticais seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.3.2 Virulência dos isolados em sementes de arroz

A partir das sementes inoculadas com *B. oryzae*, foram observadas plântulas sem sintomas, correspondentes ao grau E0 e plântulas com sintomas correspondentes as demais escalas: E1, E2, E3, E4 e E5. De acordo com o isolado inoculado foi possível observar diferentes respostas sobre a incidência, índice da doença e na taxa de transmissão em sementes e plântulas das cultivares Puitá Inta CL e BRS Sinuelo CL (Figura 13).

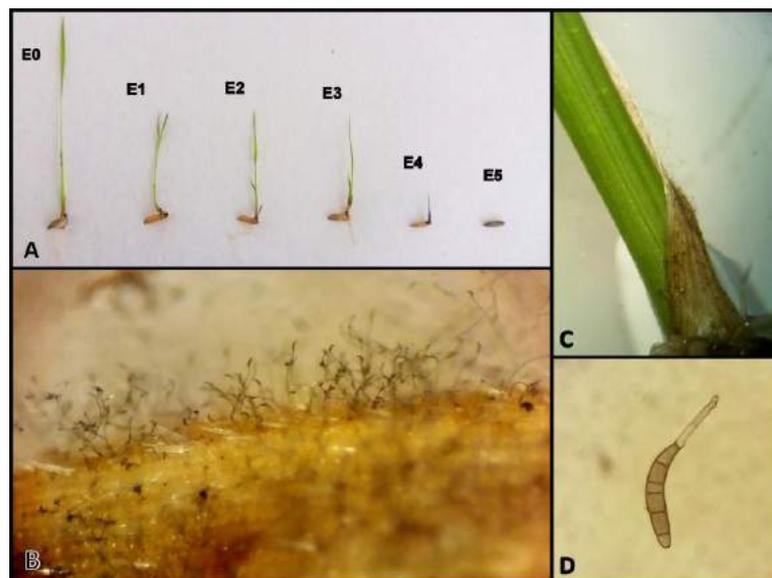


Figura 13. Plântulas de arroz infectadas por *Bipolaris oryzae*. A) classificação de acordo com o grau da lesão; B) semente colonizada C) colonização coleóptilo; D) conídio de *B. oryzae*. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Os sintomas foram classificados como mancha foliar na parte aérea, mancha no colo e “damping-off” em pré e pós emergência, sendo que durante as avaliações foi observado um grande número de sementes com morte pré e pós-emergência. Segundo Malavolta et al. (2002) e Farias (2007) o patógeno quando presente na semente reduz a sua germinação e, conseqüentemente a densidade populacional devido à morte de plântulas, fato que explica o elevado número de morte de plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento.

Por meio do ID, pôde-se constatar que os isolados LPS15 e LPS17 provenientes da cidade de São Lourenço do Sul apresentaram os maiores ID quando inoculados na cultivar Puitá Inta CL, 80,8 e 80,4%, respectivamente, sendo a maioria dos sintomas classificados na escala 4 (morte pré emergência). Já na cultivar BRS Sinuelo CL os isolados mais virulentos foram LPS12 da cidade de Tapes e novamente o isolado LPS17, com índices de 59,2 e 62,6%, respectivamente (Tabelas 8 e 9). Estudos realizados por Cardoso (2012) e Farias (2007) indicaram valores elevados para o ID de plântulas infectadas por *B. oryzae*, chegando a alcançar 100%.

Foi confirmado que o fungo *B. oryzae* pode ocasionar diferentes danos no desenvolvimento inicial das plântulas de arroz. Os isolados LPS12, LPS14, LPS15, LPS16, LPS17, LPS18 e LPS19 tiveram a maioria dos sintomas classificados na escala 4 quando inoculados na cultivar BRS Sinuelo CL. Por outro lado, as sementes inoculadas com os isolados LPS05, LPS06, LPS08 e LPS11, em sua maioria, não apresentaram sintomas, sendo classificadas na escala 0 (plântulas sem sintomas) (Tabela 8). Os isolados LPS06, LPS08, LPS11, LPS12, LPS13, LPS14, LPS15, LPS16, LPS17, LPS18 e LPS19 tiveram maior capacidade de causar morte em pré-emergência (escala 4) e as sementes da cultivar Puitá Inta CL inoculadas com os isolados LPS05, LPS07, LPS09 e LPS10 originaram plântulas predominantemente sem sintomas. As escalas 1 e 3, onde foram classificadas as plântulas com lesões em folhas e lesões em folhas e coleóptilo, foram as que apresentaram menores percentagens para todos os isolados, nas duas cultivares.

A cultivar Puitá Inta CL é considerada medianamente suscetível à brusone, causada por *Pyricularia oryzae* e a mancha parda, causada por *B. oryzae*. Em contrapartida, a cultivar BRS Sinuelo CL é considerada medianamente resistente à estas mesmas doenças, o que explica as diferenças encontradas entre as cultivares. É importante ressaltar que a prevalência e severidade de determinada doença

depende da presença de um patógeno virulento, de ambiente favorável e da suscetibilidade da cultivar (BERGAMIN FILHO, 1995). Levando em consideração essa afirmação, nota-se que os elevados ID de uma cultivar em comparação a outra são condizentes em relação a suscetibilidade das cultivares utilizadas neste estudo.

As taxas de transmissão dos isolados LPS12, LPS14, LPS15, LPS16, LPS17 e LPS19 foram as maiores na cultivar Puitá Inta CL, sendo que os isolados LPS14, LPS16 e LPS17 tiveram um percentual de 100% de transmissão semente-plântula. O isolado LPS05, proveniente da cidade de Dom Pedrito, apresentou a menor taxa de transmissão para esta mesma cultivar, 44%. Para a cultivar BRS Sinuelo CL, os isolados LPS14 e LPS17 tiveram percentuais de 82,0 e 80,0% de TT. A menor TT semente-plântula foi observada nos isolados LPS05 e LPS10, com percentuais de 34,0 e 38,0%, respectivamente (Tabela 8).

Taxas de transmissão de 100% também foram observadas por outros autores neste mesmo patossistema, com outras cultivares (MALAVOLTA et al., 2002; CARDOSO, 2012), porém não há na literatura estudos verificando a variabilidade de diferentes isolados no tocante a transmissão semente-planta. Relatos de altas taxas de transmissão em patossistemas envolvendo patógenos com sintomas similares aos de *B. oryzae* em sementes, como *B. sorokiniana*, *Exserohilium* sp., *Curvularia lunata*, *Drechslera teres*, entre outros, são concordantes com este estudo (AGOSTINETTO, 2014; SILVA, 2015; GAVIRIA-HERNADEZ, 2016).

Trabalhos realizados com patógenos associados a sementes, entre eles *B. oryzae*, *B. cynodontis*, *B. sacchari*, *B. sorokiniana*, *E. rostratum* e *Drechslera* sp., demonstraram que fatores como o potencial de inóculo e o tempo de exposição das sementes ao patógeno diminuem a germinação de sementes de arroz e provocam um aumento de morte em pré e pós-emergência (FERRARI; POSSAMAI, 2010; FARIAS et al., 2005; GAVIRIA-HERNÁNDEZ, 2016). Opondo-se a estes trabalhos, Galli et al. (2005) e Cardoso (2012) relataram que a germinação e o número de sementes mortas independeu do tempo de contato do fungo com as sementes, mas que o tempo era diretamente proporcional a incidência do patógeno nas sementes. Neste estudo foi utilizado um potencial de inóculo considerado por outros autores como médio e período de inoculação de 48 horas para garantir a presença do patógeno em todas as sementes.

Tabela 7. Percentual de infecção por *Bipolaris oryzae* nas classes da escala de transmissão semente-plântula, índice da doença (ID) e taxa de transmissão (TT) em sementes de arroz da cultivar BRS Sinuelo CL. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Escala da lesão						Índice da Doença (%)	Taxa de Transmissão (%)
	0	1	2	3	4	5		
LPS05	40,0	4,0	8,0	24,0	24,0	0,0	16,2	34,0
LPS06	36,0	0,0	24,0	8,0	20,0	12,0	42,4	64,0
LPS07	28,0	8,0	44,0	0,0	20,0	12,0	34,8	52,0
LPS08	32,0	4,0	28,0	16,0	12,0	8,0	46,4	58,0
LPS09	32,0	4,0	36,0	16,0	16,0	0,0	38,4	68,0
LPS10	27,0	0,0	29,0	12,0	16,0	16,0	36,4	38,0
LPS11	44,0	4,0	12,0	16,0	20,0	4,0	38,4	56,0
LPS12	4,0	12,0	16,0	8,0	60,0	20,0	59,2	76,0
LPS13	24,0	12,0	44,0	4,0	16,0	0,0	44,2	66,0
LPS14	4,0	0,0	0,0	16,0	60,0	24,0	54,1	82,0
LPS15	15,0	8,0	24,0	12,0	24,0	18,0	45,6	64,0
LPS16	0,0	0,0	0,0	0,0	76,0	24,0	54,8	74,0
LPS17	10,0	0,0	10,0	0,0	56,0	24,0	62,6	80,0
LPS18	8,0	0,0	8,0	12,0	44,0	28,0	33,6	52,0
LPS19	24,0	4,0	24,0	0,0	28,0	20,0	55,2	76,0

Tabela 8. Percentual de infecção por *Bipolaris oryzae* nas classes da escala de transmissão semente-plântula, índice da doença (ID%) e taxa de transmissão (TT%) em sementes de arroz da cultivar Puitá Inta CL. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Escala da lesão						Índice da Doença (%)	Taxa de Transmissão (%)
	0	1	2	3	4	5		
LPS05	48,0	0,0	20,0	0,0	24,0	8,0	27,7	44,0
LPS06	20,0	0,0	16,0	0,0	44,0	20,0	61,6	80,0
LPS07	36,0	4,0	16,0	8,0	16,0	20,0	51,2	64,0
LPS08	12,0	8,0	20,0	0,0	28,0	32,0	65,4	88,0
LPS09	28,0	4,0	24,0	20,0	24,0	0,0	48,8	72,0
LPS10	32,0	0,0	12,0	24,0	24,0	8,0	46,4	68,0
LPS11	28,0	0,0	12,0	12,0	32,0	16,0	53,6	72,0
LPS12	4,0	0,0	12,0	24,0	44,0	16,0	70,4	96,0
LPS13	20,0	12,0	20,0	4,0	24,0	20,0	58,4	80,0
LPS14	8,0	0,0	12,0	12,0	56,0	24,0	68,8	100,0
LPS15	4,0	8,0	4,0	8,0	48,0	28,0	80,8	96,0
LPS16	12,0	0,0	12,0	0,0	56,0	20,0	70,4	100,0
LPS17	0,0	0,0	16,0	0,0	52,0	32,0	80,4	100,0
LPS18	28,0	8,0	12,0	8,0	40,0	4,0	47,2	68,0
LPS19	10,0	4,0	16,0	18,0	27,0	25,0	75,2	92,0

### 3.3.3 Virulência dos isolados em plântulas de arroz

Os sintomas resultantes da inoculação em plântulas em estágio V2 foram classificados em manchas necróticas de cor marrom em folhas e no coleóptilo (Figura 14). Os isolados mostraram-se mais virulentos na cultivar Puitá Inta CL, com ID variando de 12,0 a 29,0%. Na cultivar BRS Sinuelo CL o ID variou de 8,0 a 19,0%. Os isolados mais virulentos foram LPS10, LPS13 e LPS15 quando inoculados na cultivar Puitá Inta CL e quando inoculados na cultivar BRS Sinuelo CL os isolados mais virulentos foram LPS10, LPS15 e LPS17 (Tabela 10).

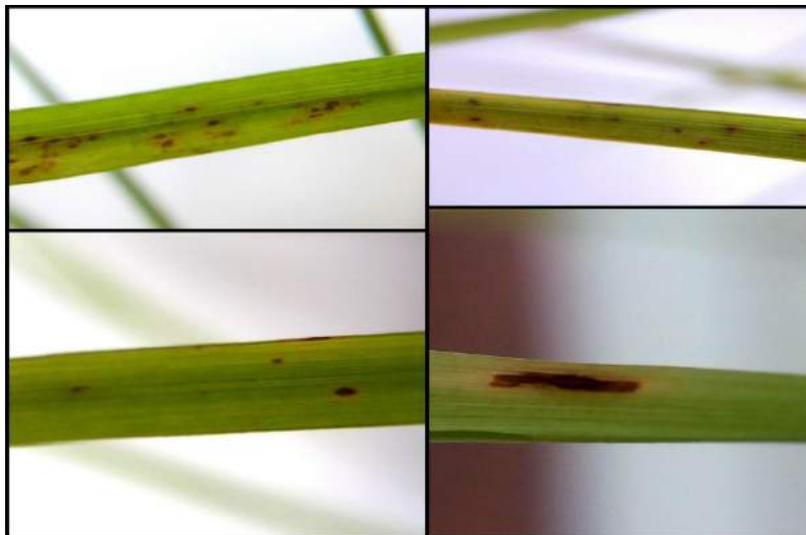


Figura 14. Plântulas de arroz com sintomas de mancha parda em folhas. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017.

Os isolados LPS15 e LPS17, assim como em sementes, também apresentaram os maiores ID quando inoculados em plântulas, demonstrando a alta virulência nas cultivares em que foram inoculados (Tabela 10). Observa-se que houve uma relação entre a virulência e a atividade de enzimas extracelulares, pois os dois isolados mais virulentos foram capazes de produzir enzimas em todos os testes (ver Figuras 7, 8, 9, 10 e 11), estas essenciais para a desintegração dos componentes estruturais e degradação de substâncias presentes nas camadas superficiais das células do hospedeiro. Esta relação assemelha-se aos resultados de Chand et al. (2014), quando observaram correlação positiva entre a produção enzimática e o desenvolvimento de lesões provocadas por *B. sorokiniana* em cevada.

Os menores índices da doença foram observados através da inoculação dos isolados LPS08, LPS13 e LPS19, provenientes das cidades de Cachoeira do Sul, Mostardas e Jaguarão, respectivamente, sendo que o isolado LPS08 também apresentou o menor ID nas duas cultivares. Bettiol e Ghini (2002) destacam a importância de isolados avirulentos ou hipovirulentos em populações de patógenos para serem utilizados na indução de resistência sistêmica, pois estes possuem a capacidade de colonizar o hospedeiro sem causar doença, porém sendo reconhecido pela planta e ativando seu sistema de defesa.

A incidência da doença variou de 45,0 a 75,0% em plântulas da cultivar Puitá Inta CL e de 25,0 a 50,0% na cultivar BRS Sinuelo CL. Novamente o isolado LPS17 destacou-se, neste caso nas duas cultivares, com valores de 75,0% para a cultivar Puitá Inta CL e 50,0% para a cultivar BRS Sinuelo CL. Os isolados com menor incidência em plântulas foram LPS06, LPS18 e LPS19.

Tabela 9. Percentual do índice da doença (ID%) e incidência (%) de *Bipolaris oryzae* em plântulas de arroz das cultivares Puitá Inta-CL e BRS Sinuelo CL. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Índice da doença (%)		Incidência (%)	
	Puitá Inta CL	BRS Sinuelo CL	Puitá Inta CL	BRS Sinuelo CL
LPS05	20,0	14,0	50,0	40,0
LPS06	15,0	11,0	45,0	25,0
LPS07	15,0	12,0	55,0	30,0
LPS08	12,0	8,0	50,0	35,0
LPS09	12,0	10,0	60,0	40,0
LPS10	23,0	17,0	60,0	45,0
LPS11	21,0	14,0	65,0	45,0
LPS12	15,0	11,0	55,0	45,0
LPS13	25,0	9,0	55,0	45,0
LPS14	17,0	14,0	50,0	45,0
LPS15	28,0	23,0	65,0	40,0
LPS16	19,0	12,0	60,0	45,0
LPS17	25,0	18,0	75,0	50,0
LPS18	20,0	11,0	65,0	25,0
LPS19	19,0	9,0	60,0	25,0

A variação na virulência dos isolados estudados pode ser atribuída às interações genotípicas e, provavelmente, aos diferentes genes de virulência operando nessa espécie. Ainda que o fungo *B. oryzae* se reproduza principalmente de forma assexuada, essa variação sugere que ocorre uma intensa troca genética

dentro das populações, justificando-se devido à expressão de algumas características oriundas da informação genética presente nos núcleos, contidos em cada célula heterocariótica do patógeno e interagindo com o genótipo do hospedeiro.

Sobretudo, os resultados deste estudo indicam que existe variação da virulência dos isolados em relação às diferentes regiões em que foram coletados. Este fato pode ser explicado por meio de fatores externos, como as diferenças edafoclimáticas das regiões de onde os isolados procederam, ou por fatores internos, onde um isolado pertencente à mesma espécie difere de outro devido à sua composição genética. Segundo Poloni (2008), o fato de um isolado de um determinado hospedeiro mostrar-se pouco agressivo para o mesmo hospedeiro pode ser explicado pela variação da cultivar, pelo local de origem do isolado em relação ao hospedeiro testado e da variabilidade genética entre isolados da mesma espécie e do mesmo hospedeiro. Além disso, alguns fungos possuem cromossomos supranumerários que contribuem para a variação na patogenicidade, pois carregam genes de virulência. Também foram observados elementos transponíveis, que podem ser transmitidos entre núcleos de um heterocário e fatores genéticos citoplasmáticos e RNAs citoplasmáticos que podem ser transferidos para diferentes linhagens por mecanismos não mendelianos (KLISTER; MIAO, 1992).

### **3.4 Conclusão**

Os isolados estudados apresentam distintas atividades enzimáticas, evidenciando variabilidade fisiológica entre estes.

A atividade enzimática dos isolados utilizados neste estudo pode ser relacionada à virulência.

Os isolados de *B. oryzae* analisados apresentam variações em sua virulência, com destaque para os isolados LPS15 e LPS17 que apresentam alta virulência em sementes e plântulas das cultivares testadas.

## 4 Capítulo 3 – Compatibilidade sexual e detecção dos genes de compatibilidade sexual em *Bipolaris oryzae*

### 4.1 Introdução

A existência da fase sexuada em fungos fitopatogênicos é considerada de grande importância, pois é responsável pelo aumento da variabilidade devido à troca de material genético entre os microrganismos, gerando grande impacto nas estratégias de manejo da doença (GALBIERI; URASHIMA, 2008).

A reprodução sexual em fungos pode ocorrer tanto entre isolados heterotáticos como em isolados homotáticos, sendo os grupos sexuais definidos por genes de compatibilidade (*mating type* ou *MAT*). Dentro do sistema heterotático existem os chamados grupos de compatibilidade sexual, onde cruzamentos só ocorrem entre indivíduos pertencentes a grupos geneticamente diferentes. Já no sistema homotático, não existem os grupos sexuais definidos e a reprodução sexuada pode ocorrer por autofecundação (ALEXOPOULOS et al., 1996; GLASS et al., 2000; SAUPE, 2000; HICKEY et al., 2002).

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem. [syn. *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subr. & Jain e *Helminthosporium oryzae* (Breda de Haan)] teleomorfo *Cochliobolus miyabeanus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler x Dastur, pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes (Dothideomycetes), ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (WEBSTER; GUNNEL, 1992). A fase teleomórfica se caracteriza por apresentar pseudotécio marrom escuro, globoso com 370-760 x 360-780 µm, presença de ostíolo. As ascas medem de 140-235 x 21-26 µm, clavadas, cilíndricas, levemente curvadas. Com pedicelos curtos, bitunicadas, contendo em média 1-8 ascósporos por asca, em média três. Os ascósporos medem de 235-648 x 4-9 µm com 8-12 septos, em média, hialinos e filiformes (SIVANESAN, 1987).

A fase perfeita dá-se devido ao cruzamento entre dois indivíduos de tipos sexualmente compatíveis e férteis. Isso ocorre quando a estrutura receptora,

chamada de ascogônio está apta a receber o(s) núcleo(s) do indivíduo compatível doador, por meio de conídios ou hifas (ZHANG, 2014).

Os genes do locus *MAT* determinam o tipo sexual dos fungos. As sequências que se encontram dentro do locus *MAT* são denominadas de idiomorfos e não alelos, por se tratarem de sequências muito diferentes que, no entanto, ocupam o mesmo locus no genoma. Estes genes possuem certas regiões conservadas entre as espécies, que se denominam HMG-box (para o idiomorfo *MAT-2*) e  $\alpha$ -box (para o idiomorfo *MAT-1*). Estas regiões são motivos de ligação do DNA e garantem que apenas os núcleos geneticamente distintos irão se fundir e passar por meiose antes da formação dos esporos sexuais (CONDE-FERRÁEZ, 2007).

Embora no Brasil, em condições de campo, a ocorrência da fase sexuada não tenha sido relatada, a sua existência não é descartada. Trabalhos conduzidos por Farias et al. (2011) e Coila (2008) reforçam essa hipótese ao obterem o teleomorfo *C. miyabeanus* em condições controladas. A obtenção dessa fase em laboratório tem sido conduzida a partir de pareamentos entre indivíduos de mesma espécie, sendo bastante trabalhosa quando se trata principalmente de indivíduos heterotáticos, sendo necessários numerosos pareamentos e tempo para formação das estruturas reprodutivas (VIÉGAS, 1989; FARIAS, 2011).

Apesar do fungo *B. oryzae* ser considerado heterotático, existem hipóteses que, durante a indução da fase sexuada em laboratório, possa ocorrer formação de pseudotécios se isolados forem cruzados entre si e, dessa forma, considerados seriam heterotáticos secundários (SHASMI et al., 2010). Essa hipótese é sustentada por uma possível presença dos dois tipos de compatibilidade, *MAT-1* e *MAT-2* no mesmo conídio, uma vez que é característica do gênero *Bipolaris* apresentar mais de um núcleo por célula dos conídios (AZEVEDO, 1976; GLASS et al., 2000; MCDONALD; LINDE, 2002).

Para facilitar a identificação dos genes de compatibilidade sexual, têm-se utilizado variações da técnica de PCR, a fim de evitar o intenso trabalho de fazer um grande número de cruzamentos em laboratório (STEENKAMP et al., 2000).

Diante do exposto o objetivo do trabalho foi conhecer o tipo compatível e a fertilidade por meio do pareamento entre isolados monospóricos, assim como determinar os genes de compatibilidade sexual através de primers específicos em isolados de *B. oryzae* de diferentes regiões orizícolas do Rio Grande do Sul.

## 4.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Os isolados fúngicos de *B. oryzae* utilizados foram provenientes da coleção do LPSFF, obtidos a partir de sementes de diferentes cultivares de arroz e regiões do estado do Rio Grande do Sul (Anexo I), descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Isolados de *Bipolaris oryzae* presentes no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos da Universidade Federal de Pelotas FAEM/UFPeL, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Cidade	Região
LPS05	Dom Pedrito	Campanha
LPS06	Pelotas	Zona Sul
LPS07	Camaquã	Zona Sul
LPS08	Cachoeira do Sul	Depressão Central
LPS09	Santo Antônio da Patrulha	Planície Costeira Externa
LPS10	Tapes	Planície Costeira Interna
LPS11	Pedro Osório	Zona Sul
LPS12	Tapes	Planície Costeira Interna
LPS13	Mostardas	Planície Costeira Externa

A verificação da compatibilidade entre os isolados de *B. oryzae* consistiu-se na obtenção da fase teleomórfica destes. Para isso foi realizado o cultivo monospórico dos isolados massais, sendo realizadas cinco culturas monospóricas/isolado. Discos de micélio das bordas das colônias isoladas foram mergulhados em tubos de ensaio com água destilada esterilizada formando suspensões de esporos, da qual 50  $\mu$ L foram transferidos e espalhados sobre a superfície de meio de cultura ágar-água (AA), em placas de Petri. Com auxílio de um anel de platina acoplado a lente de um microscópio óptico foram retirados blocos de meio de cultura contendo um único esporo, sendo esses transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em sala de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Posteriormente foi realizado pareamento entre os isolados, sendo utilizadas suspensões de esporos contendo discos de micélio de dois isolados monospóricos,

tentando todas as combinações possíveis. Também foram utilizadas suspensões de esporos contendo um único isolado.

Em seguida a suspensão foi vertida em placas de Petri contendo papel mata-borrão e sobre esse, folhas de *Typha* sp. e papel filtro, esterilizados (FARIAS et al., 2007; FARIAS et al., 2011). Foram utilizadas cinco placas por tratamento, sendo estas foram incubadas em sala crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas luz por um período superior a 30 dias, ou até o aparecimento dos pseudotécios.

Após o período de incubação as placas foram cuidadosamente examinadas em microscópio estereoscópico, sendo a fertilidade dos isolados determinada a partir da presença de pseudotécios.

Pseudotécios quando presentes foram retirados do papel com auxílio de estilete e transferidos para lâminas, contendo azul de Amman e, macerados para liberação das ascas e ascósporos, observando a capacidade de formação completa dos órgãos sexuais. Também foi realizada a viabilidade dos ascósporos, através da germinação destes em meio BDA.

Os isolados férteis foram classificados quanto à sexualidade em heterotático, heterotático secundário ou homotático. Isolados heterotáticos foram aqueles que formaram pseudotécios quando crescidos aos pares; heterotático secundário aqueles formaram pseudotécios a partir de uma única colônia monospórica ou aos pares; e homotático aqueles que apresentaram capacidade de produzir pseudotécios somente a partir de uma única colônia monospórica.

O tipo compatível também foi determinado após o período de incubação entre os isolados compatíveis sexualmente, caracterizado pela formação de pseudotécios. No momento em que foram visualizadas as estruturas reprodutivas sexuadas, os grupos sexuais foram definidos, sendo que em um primeiro momento foram designados os *MAT-1* e *MAT-2* e posteriormente todos os indivíduos que cruzaram com o *MAT-1* foram considerados *MAT-2* e vice versa. Isolados que não cruzaram com nenhum dos parentais foram denominados como N.D. (não determinado).

A partir da verificação e identificação dos genes de compatibilidade (*MAT-1* e *MAT-2*) a confirmação da presença destes genes foi feita por meio de PCR. Para isso foi realizada a extração de DNA total dos isolados, conforme descrito por Doyle & Doyle (1991). O DNA dos isolados foi utilizado em uma reação de PCR com

volume final de 15  $\mu\text{L}$  contendo 7,55  $\mu\text{L}$  de água DEPC, 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão PCR Buffer 10X(Tris HCl 0,2 M pH 8,4, KCl 0,5 M), 0,45  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0,3  $\mu\text{L}$  de dNTP 10  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA Polimerase 5 U/ $\mu\text{L}$ , 3,0  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA genômico e 0,5  $\mu\text{L}$  dos primers ChHMG1 (5-AAGGCNCCN CGYCCNATGAAC-3) e ChHMG2 (5-CTNGGNGTGTAYTTGTAATTNGG-3), descritos por Arie et al., (1997) e que são utilizados na amplificação da região HMG-box responsável pela transcrição do gene *MAT-2*. A reação de PCR seguiu as seguintes condições de amplificação: desnaturação 95 °C durante 2 min foi seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 1 min; 47 ° C durante 30 s; 72 °C durante 1 min, com uma extensão final a 72 °C durante 10 min. As reações foram mantidas a 4 °C (ARIE et al., 1997). O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X a 80V  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando-se 5,0  $\mu\text{L}$  de reação.

### 4.3 Resultados e Discussão

A fase sexuada foi confirmada entre alguns dos cruzamentos testados, sob condições de laboratório através da observação de pseudotécios de coloração marrom escuro, globosos e com presença de ostíolo, típicos de *C. miyabeanus* (SIVANESA, 1987), após 30 dias de incubação (Figura 15A e 15B). Num total de 225 combinações, 15 (menos de 10%) formaram pseudotécios. Foi possível identificar a sexualidade de sete dos nove isolados utilizados no estudo, pois dois deles não foram compatíveis com nenhum isolado com o qual foi pareado (Tabela 11).

A baixa formação da fase sexuada entre os cruzamentos pode estar ligada à perda da capacidade de reproduzir-se sexualmente, pois segundo Zeigler (1998) esta é perdida imediatamente se os loci responsáveis pela especialização patogênica num hospedeiro estiverem ligados ao locus *MAT* e à medida que a especialização progride, a degeneração sexual prossegue. Para Farman et al. (1996), esta perda pode ocorrer também devido a um aumento de elementos transponíveis (transposons) no genoma de populações sexualmente compatíveis através da recombinação, uma vez que os transposons estão espalhados por toda a população e sua acumulação leva a um aumento gradual de anomalias cromossômicas em linhagens clonais.

Entre os isolados cruzados, com exceção dos isolados LPS11 e LPS12, todos os demais apresentaram característica de heterotalismo, necessitando do gene de compatibilidade sexual oposto para formação da fase sexuada. Nenhum isolado foi classificado como homotático ou heterotático secundário (Tabela 11).

Tabela 11. Sexualidade e tipo compatível de isolados de *Bipolaris oryzae* de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Isolado	Sexualidade	Tipo Compatível
LPS05	Heterotático	<i>MAT-1</i>
LPS06	Heterotático	<i>MAT-1</i>
LPS07	Heterotático	<i>MAT-2</i>
LPS08	Heterotático	<i>MAT-2</i>
LPS09	Heterotático	<i>MAT-1</i>
LPS10	Heterotático	<i>MAT-1</i>
LPS11	NI	NI
LPS12	NI	NI
LPS13	Heterotático	<i>MAT-2</i>

Quanto à fertilidade, somente foi observada a produção de pseudotécios quando os isolados foram cruzados aos pares. Nos demais cruzamentos férteis foi possível observar ascas bitunicadas contendo ascósporos típicos de *C. miyabeanus* distribuídos de forma helicoidal e completamente desenvolvidos. Todos os ascósporos testados quanto a germinação foram viáveis (dados não apresentados).

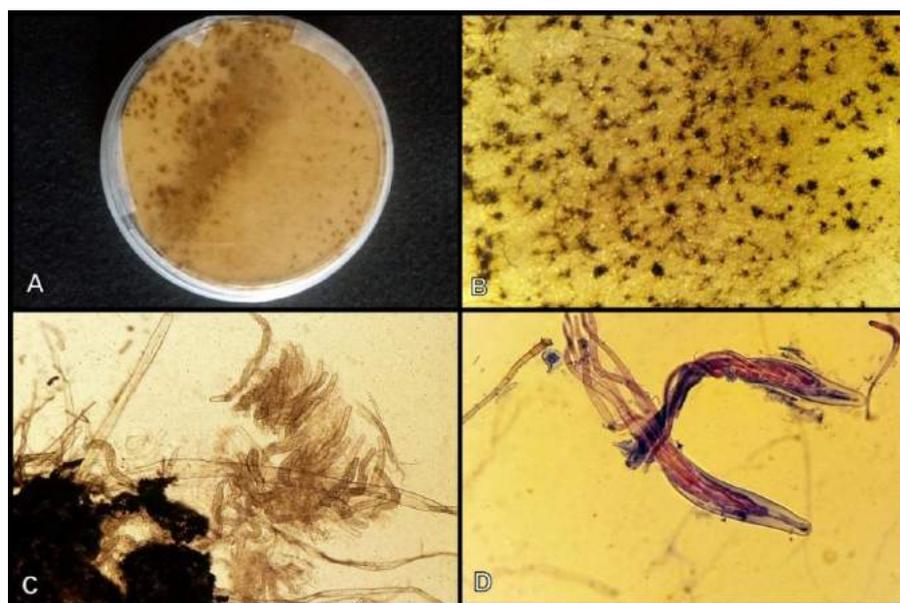


Figura 15. A) Formação da fase sexuada de *Bipolaris oryzae* *in vitro*; B) Pseudotécios sobre papel filtro; C) Ascas e ascósporos de *Cochliobolus miyabeanus*; D) Ascas bitunicadas e ascósporos em forma helicoidal. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

O isolado LPS08 apesar de ser fértil quando cruzado com os isolados LPS05, LPS06 e LPS10, não desenvolveu órgãos sexuais (ascas e ascósporos), observando-se pseudotécios estéreis. Zeigler (1998) relatou que o atraso na formação de cromossomos durante as divisões nucleares no momento da formação do asco pode explicar a ocorrência de pseudotécios estéreis.

Apesar da baixa fertilidade dos isolados, foi determinado o tipo compatível de sete isolados, sendo três *MAT-2* e quatro *MAT-1*. Foi observado que nem todos os isolados *MAT-1* cruzaram com os *MAT-2*. Este fato demonstra que, além dos genes de compatibilidade, existem outros fatores intrínsecos ao fungo ou ambiente, necessários para a formação da fase sexuada. Resultado semelhante foi relatado por Moreira et al. (2015), concluindo que várias questões podem estar relacionadas ao ciclo sexual, como distribuição de idiomorfos em diversas populações, o evento de fertilização, as funções específicas dos genes *MAT*, feromônios no reconhecimento dos indivíduos, na morfogênese e na fertilidade, ocorrência da fase sexuada em tecidos vegetais e diferentes condições de indução *in vitro*. Segundo Schoustra et al. (2010), em condições de campo, a adaptação do genótipo ao meio ambiente e outros fatores biológicos inerentes a cada genótipo podem influenciar a formação da fase sexuada.

Levando em consideração a procedência dos isolados, foi verificada a ocorrência dos dois tipos compatíveis em isolados de uma mesma região (LPS07 e LPS10/ Planície Costeira Interna e LPS09 e LPS13/Planície Costeira Externa), apesar de baixa amostragem. Alguns autores afirmam que a ocorrência dos dois tipos compatíveis em uma mesma região auxiliam o patógeno no ciclo sexual e que esta fase é a responsável pelo incremento de variabilidade genética e formação de novos genótipos, pois permite a troca de material genético resultando numa progênie com melhor adaptação, favorecendo o surgimento de novas variantes que podem conter combinações inéditas de virulência (NOTTEGHEM E SILUÉ, 1992; SAUPE, 2000; BRUNO E URASHIMA, 2001).

Os isolados LPS11 e LPS12 não formaram pseudotécios em nenhum dos cruzamentos testados. Este evento de não formação da fase sexuada pode decorrer da ausência dos idiomorfos *MAT-1* ou *MAT-2* nesses isolados, pois *B. oryzae* possui uma ampla gama de hospedeiros alternativos, responsáveis pela manutenção da fase anamórfica em condições de campo durante todo o ano (VALE et al., 2004), inviabilizando, muitas vezes, a formação da fase sexuada e provavelmente

possibilitando a ocorrência da erosão genética, onde populações perdem os genes que permitem a formação desta fase.

Ahmadpour et al (2017, no prelo) testou 317 cruzamentos entre *B. oryzae* isolado da cultura do arroz e de plantas daninhas e observou que seis dos nove isolados *MAT-1* e cinco dos sete isolados *MAT-2* de plantas daninhas foram capazes de formar pseudotécios férteis e nos cruzamentos onde foram utilizados os demais isolados não houve formação da fase sexuada.

A respeito da obtenção da fase sexuada em laboratório conduzida a partir de pareamentos, embora útil para determinação do tipo compatível e fertilidade é um método bastante laborioso, sendo necessários numerosos pareamentos e tempo para formação das estruturas reprodutivas. Dessa forma, técnicas moleculares vêm auxiliando na detecção dos genes *MAT-1* de forma rápida e confiável.

Em relação à validação do par de primers ChHMG1 e ChHMG2 em *B. oryzae*, foi possível observar a amplificação de um fragmento entre 300 e 400 pares de base (~0,3kb) do motivo HMG-box em quatro isolados (Figura 16), o mesmo fragmento observado por Arie et al. (1997) em *C. heterostrophus*, teleomorfo de *Bipolaris maydis*, confirmando a aplicabilidade deste par de primers e a presença do gene *MAT-2* nestes isolados.

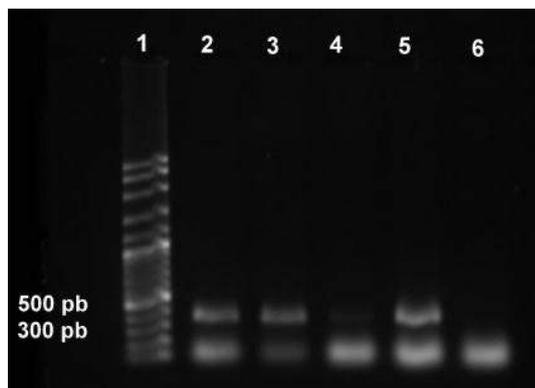


Figura 16. Expressão do gene *MAT-2* em *Bipolaris oryzae*. 1) Marcador molecular 100 pb; 2) LPS07; 3) LPS07; 4) LPS08; 5) LPS13; 6) Branco. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017.

Alguns pares de primers foram utilizados com sucesso em pesquisas com o objetivo de identificar os genes de compatibilidade sexual em numerosas espécies de *Cochliobolus* spp. com anamorfos em *Bipolaris* sp., além de outras espécies como *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* e *Pyricularia grisea* (ARIE et al.,

1997; YUN et al., 1999; ARIE et al., 2000; CASTELL-MILLER E SAMAC, 2012; SIRISATHAWORN et al., 2017).

Para testar a presença de genes de compatibilidade sexual, Krupinsky et al. (2004) utilizaram os primers específicos ho4 e ho5 (sequência não informada pelo autor) para detectar *MAT-1* e BsHMG21 (CTCCTTGGAGCAATGGATTC) e BsHMG22 (CTGGCGGAGGTGTTCTTCTT) para detectar *MAT-2* em *B. oryzae* isolado de pastagens. A amplificação com os primers BsHMG21 e BsHMG22 gerou um fragmento de aproximadamente 600 pares de base, confirmando a presença do gene *MAT-2* em cinco dos seis isolados utilizados no estudo.

Genes de compatibilidade sexual de *B. oryzae* foram amplificados utilizando os primers específicos CmMAT1F1 (5'-GACCAGTTCTTCCGCATTA-3') e CmMAT1R1 (5'-GGTCCGAAAGCAGAGTAGT-3') para o gene *MAT-1* e CmMAT2F1 (5'-GAGGTGTTCTTCTTTGGCA-3') e CmMAT2R1 (5GATGACTGGAATAACGGCA-3') para o gene *MAT-2*, sendo confirmada a presença destes genes após a observação de um fragmento de 523 pares de base (AHMADPOUR, 2017, no prelo). Vale ressaltar que o tamanho do fragmento encontrado neste trabalho difere ao da pesquisa anterior devido às sequências dos primers utilizados na reação de PCR. Kusai et al. (2016) testou os primers NM162SetoMAT1F1 (5'-TCCGCTTGACCACTTCTTC-3' e NM163SetoMAT1R1 (5'-ATGGATTATGCTCGTAGTTA-3') para o gene *MAT-1* e NM164SetoMAT2F1 (5'-TTCTTGGGGTTCTCTGGCGA-3') e NM165SetoMAT2R1 (5'-CCAGCCACGACTACCAAGA-3') para o gene *MAT-2* em 45 isolados de *Setosphaeria rostrata* (anamorfo: *Exserohilum rostratum* (Drechsler) K.J. Leonard & Suggs) e relatou que 42 possuíam o gene *MAT-2* e apenas três *MAT-1*. No presente estudo foi obtida uma relação *MAT-2:MAT-1* de 1:1,33.

Considerando a amplificação da região HMG-box, que confirma a presença do gene *MAT-2*, pelo primer testado é possível inferir que o mesmo pode ser utilizado a fim de evitar o trabalho laborioso de fazer numerosos cruzamentos para determinar o tipo compatível de *B. oryzae*, pois a amplificação coincidiu com os resultados encontrados no pareamento dos isolados.

#### 4.4 Conclusão

É possível identificar o tipo compatível e a fertilidade de *B. oryzae* através do cruzamento entre isolados monospóricos.

O par de primers ChHMG1 e ChHMG2 é eficiente na amplificação da região HMG-box, correspondente ao gene *MAT-2* para *B. oryzae*.

#### 4.5 Considerações finais

O estudo da estrutura genética de isolados de *B. oryzae* é uma abordagem fundamental e que precisa ser investigado em sua totalidade para que sejam elaboradas estratégias de manejo adequadas. Dessa forma, os fitopatologistas devem estar atentos à habilidade deste fitopatógeno evoluir, uma vez que os sistemas agrícolas impõem forte seleção direcional sobre suas populações.

A escolha dos loci utilizados na filogenia pode ter um impacto significativo na análise e interpretação dos dados, pois alguns genes possuem maior poder de inferência filogenética do que outros, portanto, a escolha de genes com alta informalidade filogenética permite a construção de filogenias confiáveis e minimiza erros.

A análise da produção de enzimas extracelulares, além de ser um método rápido e simples, é importante para caracterizar a variabilidade fisiológica deste patógeno e ter conhecimento de sua virulência. Além disso, a virulência de *B. oryzae* em plântulas de arroz mostra-se muito variável quanto a fatores externos, como as diferenças edafoclimáticas dos municípios de onde os isolados procederam, ou internos, em que isolados diferiram um do outro devido às suas composições genéticas.

O reconhecimento de isolados de *B. oryzae* sexualmente compatíveis é importante para verificar a possibilidade de ocorrência de reprodução sexuada nas populações, e os resultados levam a hipótese de que o teleomorfo ocorra em restos culturais, no entanto, as condições para que isso ocorra a campo ainda não estão esclarecidas.

## 5 Referências Bibliográficas

AGOSTINETTO, L. **Inóculo na semente, transmissão de *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera teres* e desenvolvimento de epidemia em cevada**. 2014. 179f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

AHMADPOUR, A.; CASTELL-MILLER, C; JAVAN-NIKKHAH, M.; NAGHAVI, M.R.; DEHKAEI, F.P.; LENG, Y.; PURI, K.; ZHONG, S. Population structure, genetic diversity and sexual state of the rice brown spot pathogen *Bipolaris oryzae* from three Asian countries. **Plant Pathology**. No prelo, 2017.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4<sup>a</sup> ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1996.

ARCHANA, B.; KUKANDHURU, R; HARISHCHANDRA, S.P. Genetic diversity and population structure among isolates of the brown spot fungus, *Bipolaris oryzae*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **Academic Journals**, Karnataka, v. 13, n. 2, p.238-244, 2014.

ARIE, T.; CHRISTIANSEN, S.K.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. Efficient cloning of Ascomycetes mating type genes by PCR amplification of the conserved *MAT* HMG box. **Fungal Genetics and Biology**, v.21, p.118-130, 1997.

ARIE, T; KANEKO, I.; YOSHIDA, T.; NOGUCHI, M.; NOMURA, Y.; YAMAGUCHI, I. Mating type genes from asexual phytopathogenic Ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 12, p.1330-1339, 2000.

ARTIGIANI FILHO, V.H.; BEDENDO, I.P. Variabilidade de *Helminthosporium oryzae* detectada através da ocorrência de setores na colônia, sensibilidade a fungicidas, crescimento em diferentes meio de cultura e temperatura de incubação. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 22, n. 3-4, p. 217-221, 1996.

BARRET, L.G.; THRALL, P.H.; BURDON, J.J.; LINDE, C.C. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. **Trends in the Ecology and Evolution**, v. 23, n. 12, p.678-685, 2008.

BISWAS, S.K.; RATAN, V.; SRIVASTAVA, S.S.L.; SINGH, R. Influence of seed treatment with biocides and foliar spray with fungicides for management of brown leaf spot and sheath blight of paddy. **Indian Phytopathology**, v. 61, p.55-59, 2008.

BRUNNER, P.C.; TORRIANI, S.F.F.; CROLL, D.; STUKENBROCK, E.H.; MCDONALD, B.A. Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n. 6, p.1337-1347, 2013.

BALARDIN, R. S. Doenças do Arroz. Santa Maria: Orium, 2003. 59p.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BERGAMIN FILHO, A. Avaliação de danos e perdas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.672-690.

BERTONHA, L.C.; NETO, M.L.; COELHO-MOREIRA, J.S.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Bioprospecção de fungos filamentosos produtores de enzimas polissacaridases úteis para obtenção de etanol celulósico. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Caxias do Sul. **Anais do XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, 2016. p.401-404.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: KIMATI, M.; PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia & Desenvolvimento**, Brasília, n.29, p.62-76, 2002.

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.; VERA CRUZ, C.M. Genotypic variability and aggressiveness of *Bipolaris oryzae* in the Philippines. **European Journal Plant Pathology**, v.137, p.415-429, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BRUNO, A.C.; URASHIMA, A.S. inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo com a brusone de outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p.21-26, 2001.

CAMARGO, L.E.A. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**, São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.455-469.

CARBONE, I.; KOHN, L. Ribossomal DNA sequences divergence within transcribed spacer 1 of the sclerotinaceae. **Mycological**, v. 85, p.415-427, 1997.

CARDOSO, G. **Efeito do potencial de inóculo de *Bipolaris oryzae* em sementes na transmissão para plântulas de arroz**. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CASTELL-MILLER, C.V.; SAMAC, D.A. Population genetic structure, gene flow and recombination of *Cochliobolus miyabeanus* on cultivated wildrice (*Zizania palustris*). **Plant Pathology**, v. 61, p.48-59, 2012.

CHAND, R.; KUMAR, M.; KUSHWAHA, C.; SHAH, K.; JOSHI, A.K. Role of melanin in release of extracellular enzymes and selection of aggressive isolates of *Bipolaris sorokiniana* in barley. **Current Microbiology**, v.69, p-202-211, 2014.

CHUMKLEY, F.G.; VALENT, B. Genetic analysis of melanin-deficient, non pathogenics mutants of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 3, p. 135-143, 1990.

COILA, V.H.C. **Variabilidade de *Bipolaris* sp., agente causal da mancha parda do arroz**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade)-Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

- CONDE-FERRÁEZ, L. El locus *MAT* (*mating type*) de los ascomicetos: su evolución, estrutura y regulación. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p.95-99, 2007.
- COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A. Uniform, objective and adative system for expressing rice development. **Crop Science**, v.40, p.436-443, 2000.
- 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.
- DE LA PAZ, M.A.G.; GOODWIN, P.H.; RAYMUNDO, A.K.; ARDALES, E.Y.; VERA CRUZ, C.M. Phylogenetic analysis based on ITS sequences and conditions affecting the type of conidial germination of *Bipolaris oryzae*. **Plant Pathology**, v. 55, p.756-765, 2006.
- DE JONG, J.C.; MCCORMACK, B.J.; SMIRNOFF, N.; TALBOT, N.J. Glycerol generates turgor in rice blast. **Nature**, v. 389, p.244-245, 1992.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510p.
- FARIAS, C. R. J. **Espécies de *Bipolaris* associadas à helmintosporiose do arroz (*Oryza sativa* L.) no sul do Brasil**. 2007, 104 f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- FARIAS, C. R. J.; AFONSO, A. P. S.; PIEROBOM, C. R.; DEL PONTE, E. M. Regional survey and identification of *Bipolaris* spp. associated with rice seeds in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 3, p. 369-372, 2011.
- FARMAN, M.L.; TOSA, Y.; NITTA, N.; LEONG, S.A. MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecular and General Genetics**, v.251, n.6, p.665-674, 1996.

FERNANDES, E.G.; VALÉRIO, H.M.; FELTRIN, T.; VAN DER SAND, S.T. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.2, p.827-833, 2012.

FERRARI, J.F.; POSSAMAI, E. Incidência de *Bipolaris sorokiniana* nas sementes e transmissão para plantas de cevada. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, n. 3, p. 320-329, 2010.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.12-16, 2000.

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

GALLI, J.A.; FESSEL, S.A.; PANIZZI, R.C. Effect of *Fusarium graminearum* and infection index on germination and vigor of maize seeds. **Fitopatologia Brasileira**, n. 30, p.470-474, 2005.

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

GAVIRIA-HERNÁNDEZ, V. **Efeito do potencial de inóculo de *Exserohilum rostratum* associado às sementes de arroz quanto aos danos em plântulas, qualidade sanitária e fisiológica**. 2016, 54f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GILLESPIE, J.H.; LANGLEY, C.H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, Pittsburgh, v.76, n.4, p.837-887, 1974.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2.ed. New York: John Willey & Sons, 458p, 1994.

GOSS, E.; TABIMA, J.F.; COOKE, D.E.; RESTREPO, S.; FRY, W.E.; FORBES, G.A.; FIELAND, V.J.; CARDENAS, M.; GRUNWALD, N.J. The Irish potato famine pathogens *Phytophthora infestans* originates in central Mexico rather than the Andes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 24, 2014.

HANCOCK, J.G.; MILLAR, R.L. Association of cellulolytic, proteolytic and xylolytic enzymes with southern anthracnose, spring black stem, and Stemphylium leaf spot of alfalfa. **Phytopathology**, v.55, p.356-360, 1965.

HARTMANN, F.E.; SÁNCHEZ-VALLET, A.; MCDONALD, B.A.; CROLL, D. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. **International Society for Microbial Ecology (The ISME Journal)**, v. 11, p.1189-1204, 2017.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Sistema de Evaluación Stándart para Arroz**. Los Baños. 1975. 64p.

JEON, S.J.; NGHYEN, T.T.T.; LEE, H.B. Phylogenetic status of an unrecorded species of *Curvularia*, *C. spicifera*, bases on current classification system of *Curvularia* and *Bipolaris* group using multi loci. **Mycrobiology**, Gwangju, v. 43, n. 3, p.210-217, 2015.

KAMAL, M. M.; MIA, M. A. T. Diversity and Pathogenicity of the rice brown spot pathogen, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem in Bangladesh assessed by genetic finger print analysis. **Bangladesh Journal of Botanic**, Dhaka, v.38. p.119-125, 2009.

KANDAN, A.; AKHTAR, J.; SINGH, B.; DIXIT, D.; CHAND, D.; ROY, A.; RAJKUMAR, A.S.; AGARWAL, P.C. Molecular diversity of *Bipolaris oryzae* infecting *Oryza sativa* in India. **Phytoparasitica**, New Delhi, v. 43, n. 1, p.5-14, 2015.

KHEMMUK, W.; SHIVAS, R.G.; HENRY, R.J.; GEERING, A.D.W. Fungi associated with foliar diseases of wild and cultivated rice (*Oryza* spp.) in northern Queensland. **Australian Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p.297-308, 2016.

KIHARA, J.; MORIWAKI, A.; UENO, M.; TOKUNAGA, T.; ARASE, S.; HONDA, Y. Cloning, functional analysis and expression of a sytalone dehydratase gene (*SCD1*) involves in melanin biosynthesis of the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. **Current Genetics**, v. 45, p.197-04, 2004.

KIHARA, J.; TANAKA, N.; UENO, M.; ARASE, S. Identification and expression analysis of regulatory genes induced by near-ultraviolet irradiation in *Bipolaris oryzae*. **Advances in Microbiology**, v. 4, n. 5, p.447-456, 2014.

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.

KODAMA, M.; ROSE, M.R.; YANG, G.; YUN, S.H.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. The translocation-associated *TOX1* locus *Cochliobolus heterostrophus* is two genetic elements on two different chromosomes. *Genetics*, v. 151, p. 585-596, 2000.

KRUPINSKY, J.M.; BERDAHL, J.D.; SCHOCH, C.; ROSSMAN, A.Y. Leaf spot on switch grass (*Panicum virgatum*), symptoms of a new disease caused by *Bipolaris oryzae*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 26, p.371-378, 2004.

KUMAR, P.; ANSHU, V.; KUMAR, S. Morpho-pathological and Molecular Characterization of *Bipolaris oryzae* in Rice (*Oryza sativa*). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, 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**, New Delhi, 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 Bihar. **Research Paper**, v.1, n. 5, p.85-87 2015.

KUSAI, N.A.; AZMI M.M.; ZAINUDIN, N.A.; YOSOF, M.T.; RAZAK, A.A. Morphological and molecular characterization, sexual reproduction and pathogenicity of *Setosphaeria rostrata* isolates from rice leaf spot. **Mycologia**, v. 108, n. 5, p.905-914, 2016.

LEAL-JUNIOR, G.A. **Diagnostico de *Crinipellis perniciosa* em tecidos de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e serológica de isolados coletados de vários hospedeiros.** Piracicaba, 2002. 136p. Dissertação (Mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo.

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.

MATOS, K.S. **Identificação de espécies biológicas de *Fusarium solani*-FSSC.** 2011. 48f. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras.

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

MCDONALD, B.A. How can research on pathogen population biology suggest disease management strategies? The example of barley scald (*Rhynchosporium commune*). **Plant Pathology**, v. 64, n. 5, p.1005-1013, 2015.

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.

MEDEIROS, R.B.; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. Brasília: Editora UNB, 2003. 290p.

MEW, T.W.; GONZALES, P. **A handbook of rice seed borne fungi.** Los Baños, Laguna: International Rice Research Institute/Science Publishers, 2002. 83p.

MONEY, N.P. Mechanism linking cellular pigmentation and pathogenicity in rice blast disease. **Fungal Genetic Biology**, v. 22, p.151-200, 1997.

MOTLAGH, M.R.S.; KAVIANI, B. Characterization of new *Bipolaris* spp., the causal agent of brown spot disease in the North of Iran. **International Journal Agriculture Biology**, v. 10, p.638-642, 2008.

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

MUNKACSI, A.B.; STOXEN, S.; MAY, G. *Ustilago maydis* populations tracked maize through domestication and cultivation in the Americas. **Proceedings of the Royal Society**, v. 275, p.1037-1046, 2008.

MYTHILI, A.; SINGH, Y.R.B.; PRIYA, R.; HASSAN, S.; MANIKANDAN, P.; PANNEERSELVAN, K.; NARENDRAN, V.; SHOBANA, C.S. In vitro and comparative study on the extracellular enzyme activity of molds isolated from keratomycosis and soil. **International Journal Ophthalmology**, Beijing, v.7, n.5, p.778-784, 2014.

MOREIRA, S.I.; CERESINI, P.C.; ALVES, E. Reprodução Sexuada em *Pyricularia oryzae*. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.3, p.175-182, 2015.

NASCIMENTO, E.J.M. **Caracterização molecular de *Bipolaris sorokiniana* usando análise de restrição das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal amplificado**. 2004. 115f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NAZARI, S.; MOHAMAD, J-N.; KHALIL-BERDI, F.; VAHID, K; ALIREZA, A. *Bipolaris* species associated with rice plant: pathogenicity and genetic diversity of *Bipolaris oryzae* using rep-PCR in Mazandaran province of Iran. **Journal of Crop Protection**, Karaj, v.4, n.4, p.497-508, 2015.

NOTTEGHEM, J.L.; SILUÉ, D. Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. **Phytopathology**, v. 82, p.421-424, 1992.

OLIVEIRA, J.A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). **Ciência e Prática**, v. 16, n. 1, p.42-47, 1992.

ORLANDELLI, R.C.; ALMEIDA, T.T.; ALBERTO, R.N.; POLONIO, J.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.2, p.359-366, 2015.

ORLANDELLI, R.C.; SANTOS, M.S.; POLONIO, J.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Produção  $\alpha$ -amilase por fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* utilizando casca de abacaxi como substrato. In: II Congresso Paranaense de Microbiologia, Londrina. **Anais do II Congresso Paranaense de Microbiologia**, 2016 p. 312.

OU, S.H. **Rice diseases**. 2 ed. United Kingdom: International Mycological Institute, 1985. 380p.

OUEDRAOGO, I.; CORRELL, J.C.; BOZA, E.J.; CARTWRIGHT, R.D.; LEE, F.N.; SANKARA, P. Pathogenic, molecular and genetic diversity among *Bipolaris*, *Drechslera* an *Exserohilium* species on rice. In: NORMAN, R.J.; MEULLENET, J.F.; MOLDENHAUER, K.A.K. **BR Wells Rice Research Studies**. Fayetteville: Research Series, 2004. p.111-119.

PADWICK, G. W. **Manual of rice diseases**. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 1950. 198p.

PANACCIONE, D.G.; PITKIN, J.W.; WALTON, J.D.; ANNIS, S.L. Transposon-like sequences at the *TOX2* locus the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. **Gene**, v. 176, p. 103-109, 1996.

PARK, G.; XUE, C.; ZENG, L.; LAM, S.; XU, J.R. MTS12 regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 15, p.198-200, 2002.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: passado, presente e futuro. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.53-55, 1993.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2011. p.543-591.

PIANZZOLA, M. J.; MOSCATELLI, M.; VERO, S. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. **Plant Disease**, v. 88, p.23-28, 2004.

POLONI, A. **Estudo da virulência e variabilidade fisiológica e genética do fungo *Bipolaris sorokiniana***, 2008, 101f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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, 1999, p.262-307.

REBELO, J.A. **Mancha reticulada (*Leandria momordicae* RANGEL) em cucurbitáceas**. 2003. 229f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROHLF, F.J. Adaptive hierarchical clustering schemes. **Systematic Zoology**, v. 18, p.58-82, 1970.

SANAHUJA, G.; LOPEZ, P. First report of *Bipolaris oryzae* causing leaf spot on *Strelitzia nicolai* in Florida. **Plant Disease**, v. 102, n. 2, p.384, 2017.

SAUPE, S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous Ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.489-502, 2000.

SCHOUSTRA, S.; RUNDLE, H.D.; DALI, R.; KASSEN, R. Fitness-associated sexual reproduction in a filamentous fungus. **Current Biology**, v. 20, n. 15, p.1350-1355, 2010.

SHASMI, A.; ELAHINIA; S.A.; KHODAAPARAST, S.A.; MOOSAJENAD, S. Fertility status and mating type of *Cochliobolus miyabeanus*, the causal agent of brown spot disease in Giulian province. **Journal Plant Pathology**, Iran, v. 45, p.25-60, 2010.

SILVA, F.J.A. **Caracterização, patogenicidade de *Exserohilum rostratum* e mecanismos de defesas de plantas de arroz**. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

SIRISATHAWORN, T.; SRIRAT, T.; LONGYA, A.; JANTASURIYARAT, C. Evaluation of mating type distribution and genetic diversity of three *Magnaporthe oryzae* avirulence genes, PWL-2, AVR-Pii and Avr-Piz-t, in Thailand rice blast isolates. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, p.7-14, 2017.

SKOUBOE, P.; FRISVD, J.C.; TAYLOR, J.W.; LAURITSEN, D.; BOYSEN, M.; ROSSEN, L. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terveticillate *Penicillium* species. **Mycological Research**, v. 103, p.873-881, 1999.

SOUZA, N.G. RIBEIRO, A.S.; GALLI, J. Identificação de fontes de resistência à mancha parda em arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 393-397, 1994.

STEENKAMP, E.T. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p.4378-4382, 2000.

STUKENBROCK, E.H.; MCDONALD, B.A. The origins of plant pathogens in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p.75-100, 2008.

TAYLOR, J.W.; JACOBSON, D.J.; FISHER, M.C. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 197-246, 1999.

TAZICK, Z.; TAJICK, G.M.A. Taxonomic position of *Bipolaris oryzae* among other *Cochliobolus species* using ribosomal region end some protein coding genes. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 2, p.212-216, 2013.

TEIXEIRA, M. F. S.; FERNANDES, O. C. C.; HERRERA, A. M.; DURÁN, N. Determinação qualitativa de proteases: método de *cup-plate* modificado. **Ciências da Saúde**, v. 4, n.2, p.39-45, 1996.

TSUJI, G.; TSUGE, S.; SHIRAIISHI, T.; KUBO, Y. The *Colletotrichum lagenarium* Ste12-like gene *CST1* is essential for appressorium penetration. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.16, p.315-325, 2003.

VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W.C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 2004. 531p.

VIÉGAS, J. **Variabilidade da morfologia, crescimento e fertilidade de isolados brasileiros de *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib) Drechsler Ex. Dastur**. 1989. 222f. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agronomia "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

WAXMAN, K.; BERGSTROM, C.G. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum caudatum* on indiagrass in New York. **Plant Disease**, v. 95, p.1189, 2011.

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

WEBSTER, R. K.; GUNNELL, P. S. **Compendium of rice diseases**. São Paulo: American Phytopathological Society Press. 1992. 86p. ZEILER, R.S. Recombination in *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.249-275, 1998.

WENZEL, J.B.; MORESCO, A.A.A.; BOAS, E.V.; BURIN, F.A.G.; SOUZA, R.O. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. **Perspectivas Online: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.9, n.3, p.01-15, 2013.

WEIR, B.S.; JOHNSON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.115-180, 2012.

WIBBERG, D.; JELONEK, L.; RUPP, O.; HENNIG, M.; EIKMEYER, F.; GOESMANN, A.; HARTMANN, A.; BORRISS, R.; GROSCHE, R.; PUHLER, A. Establishment and interpretation of the genome sequence of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IB isolate 7/3/14. **Journal Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 142-155, 2013.

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

YUN, S.H.; BERBEE, M.L.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p.5592-5597, 1999.

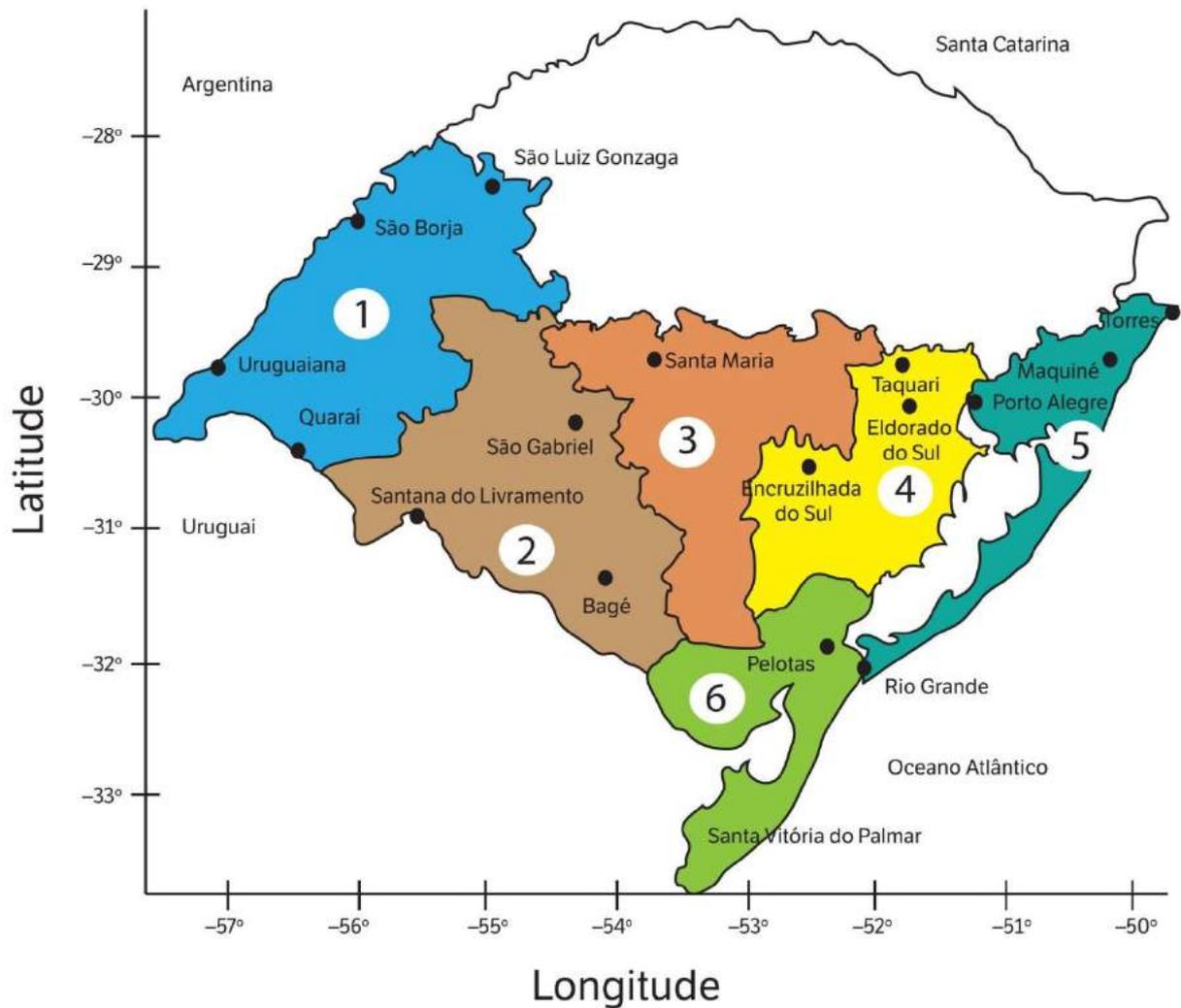
ZAFFARANO, P.L.; MCDONALD, B.A.; LINDE, C.C. Phylogeographical analyses reveal global migration patterns of the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 2, p. 279-293, 2009.

ZHANG, H.; WU, Z.; WANG, C.; LI, Y.; XU, J. Germination and infectivity of microconidia in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Nature communications**, London, v.5, n. 4518, p.1-9, 2014.

ZHENG, L.; CAMPBELL, M.; MURPHY, J.; LAM, S.; XU, J.R. The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.13, p.724-732, 2000.

## 6 Anexos

### Anexo I - Regiões orizícolas do Rio Grande do Sul



- 1- Fronteira Oeste
- 2- Campanha
- 3- Depressão Central
- 4- Planície Costeira Interna
- 5- Planície Costeira Externa
- 6- Zona Sul
- Estações Meteorológicas

Figura 17. Regiões orizícolas do Rio Grande do Sul (Adaptado de KLERING et al., 2016). FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

**Anexo II - Extração de DNA de *Bipolaris oryzae* (Adaptado de Doyle & Doyle, 1991)**

- 1- Raspar a colônia fúngica a fim de retirar somente micélio;
- 2- 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;
- 3- Agitar no vortex por 5 segundos;
- 4- Incubar a 65°C por 30 minutos;
- 5- Esperar esfriar e adicionar 400 µL de clorofórmio e agitar por suaves inversões durante 5 minutos;
- 6- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos;
- 7- Retirar 200 µL da fase aquosa e transferir para outro tubo (sobrenadante – parte superior cuidando para não pegar sólidos);
- 8- Adicionar 200 µL de isopropanol gelado e homogeneizar com suaves inversões por 1 minuto;
- 9- Incubar a -20°C por no mínimo 30 minutos (pode ficar até 1 hora);
- 10- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos;
- 11- Descartar o sobrenadante (parte superior – isopropanol), tendo cuidado de não perder o pellet formado;
- 12- Adicionar 200 µL de etanol 70 %;
- 13- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos;
- 14- 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;
- 15- Ressuspender em 100 µL de TE+RNAse na concentração final de 40 µL;
- 16- Incubar a 37°C por 30 minutos;
- 17- Verificar a qualidade da extração em eletroforese, utilizando 3,0 µL de DNA ressuspendido.

### Anexo III – Meio mínimo e soluções para atividade enzimática

Tabela 12. Meio mínimo para produção de exoenzimas. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

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>2</sub>	0,01 g
Ágar	-	15,0 g
Água Destilada	-	1000 mL

Tabela 13. Meio mínimo para produção de pectinases. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

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

Tabela 14. Listagem e composição das soluções utilizadas. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

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

## Anexo IV - Escala de notas para avaliação da transmissão semente-plântula

Tabela 15. Escala de notas para avaliação dos danos ocasionados por *Bipolaris oryzae* a partir da transmissão semente – plântula de arroz. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Escala	Sintoma
0	Plântulas sem sintoma
1	Plântulas com lesões típicas nas folhas
2	Plântulas com lesões típicas no coleótilo
3	Plântulas com lesões típicas no coleótilo e folhas
4	Morte de pós-emergência
5	Morte de pré-emergência



Figura 18. 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 coleótilo; 3- Plântulas com lesões típicas no coleótilo e folhas; 4- Plântulas com morte de pós-emergência; 5- Plântulas com morte de pré-emergência. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

## Anexo V - Escala de desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado

Tabela 16. Escala de desenvolvimento de plântulas de arroz (COUNCE; KEISLING, 2000). FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

Estádio	Morfologia
V1	Colar formado na primeira folha do ramo principal
V2	Colar formado na segunda folha do ramo principal
V3	Colar formado na terceira folha do ramo principal
V4	Colar formado na quarta folha do ramo principal
V5	Colar formado na quinta folha do ramo principal

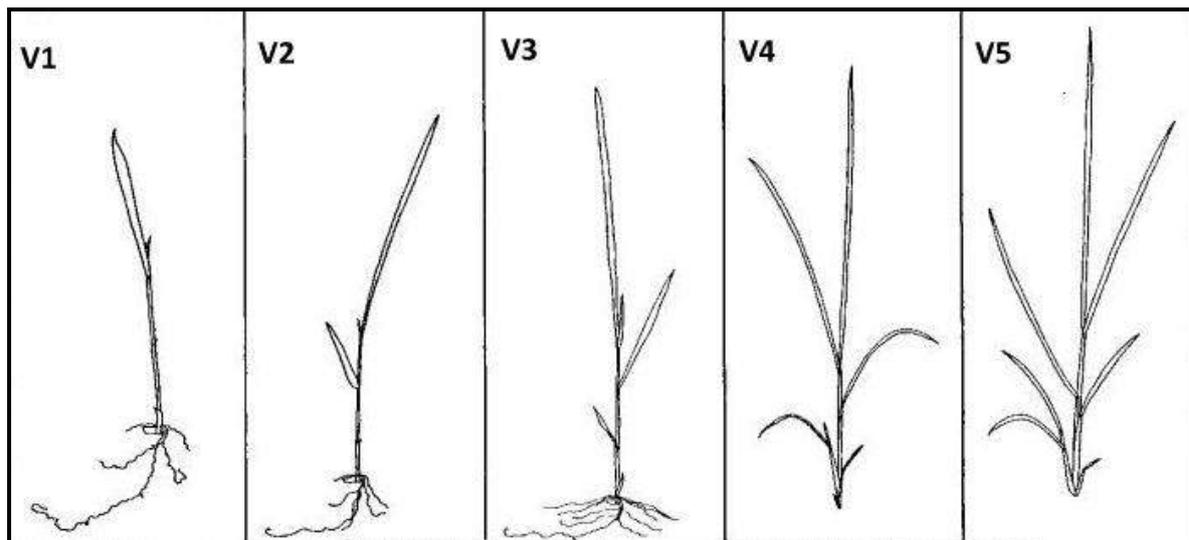


Figura 19. Estádios de crescimento de plântulas de arroz. V1) Colar formado na primeira folha do ramo principal; V2) Colar formado na segunda folha do ramo principal; V3) Colar formado na terceira folha do ramo principal; V4) Colar formado na terceira folha do ramo principal; V5) Colar formado na quinta folha do ramo principal. FAEM/UFPel, Pelotas/RS, 2017.

## Anexo V - Escala de avaliação da severidade de *Bipolaris oryzae* em arroz

Tabela 17. Escala de avaliação da severidade de *Bipolaris oryzae* em folhas de plântulas de arroz (Adaptado de SCHWANCK, 2012). FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017.

Escala	Sintoma
0	Plântulas sem sintoma
1	Plântulas com 1-5% de manchas
2	Plântulas com 6-25% de manchas
3	Plântulas com 26-50% de manchas
4	Plântulas com >50% de manchas

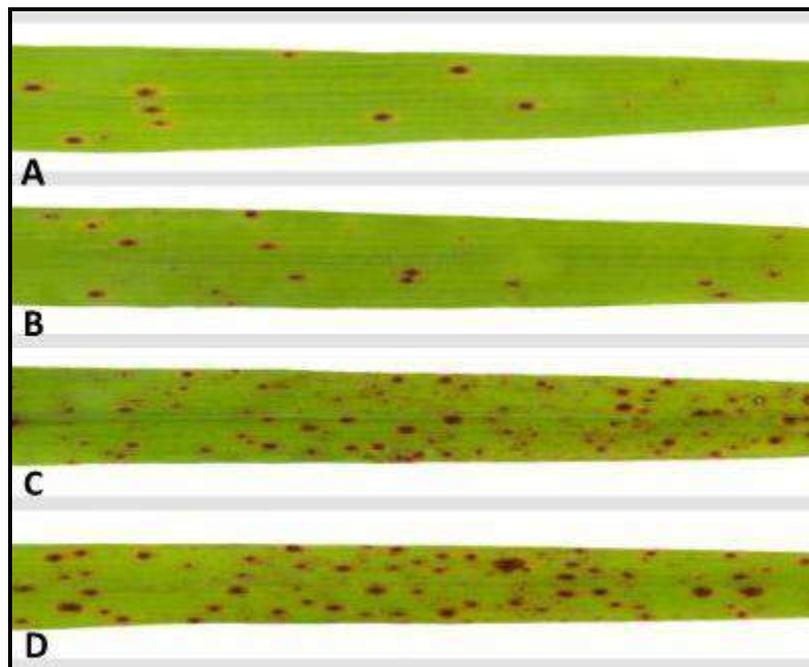


Figura 20. Folhas de arroz com lesões de mancha parda e severidades de: A) 1-5%; B) 6-25%; C) 26-50%; e D) >50%. FAEM/UFPeI, Pelotas/RS, 2017.