UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS - CCR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Cássio Alberto Vielmo Ben

VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia oryzae* cav. DO ARROZ EM POACEAS

Santa Maria, RS
2019

Cássio Alberto Vielmo Ben

VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia oryzae* cav. DO ARROZ EM POACEAS

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, SM), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Agronomia.**

Orientador: Prof. Dr. Ivan Francisco Dressler Costa

Santa Maria, RS

2019

Ben, Cássio Alberto Vielmo
VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE Pyricularia oryzae cav. DO ARROZ EM POACEAS / Cássio Alberto Vielmo Ben.- 2019.
76 f.; 30 cm

Orientador: Ivan Francisco Dressler da Costa
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Agronomia, RS, 2019

1. Pyricularia oryzae 2. Oryza sativa 3. Fitopatologia 4. Brusone I. Dressler da Costa, Ivan Francisco II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Cássio Alberto Vielmo Ben

VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia oryzae* cav. DO ARROZ EM POACEAS

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, SM), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Agronomia.**

Aprovado em 27 de fevereiro de 2019:

Ivan Francisco Dressler Costa, Dr. (UFSM)
(Orientador)

Sylvio Henrique Bidel Dornelles, Dr. (UFSM)

Jose Domingos Jacques Leão, Dr. (UFSM)

Danie Martini Sanchotene, Dr. (URI)

Caroline Almeida Gulart, Dra. (Instituto Phytus)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico os meus pais Arnaldo e Madalena, exemplos de amor, incentivo, fé e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade, pela força e coragem para sempre seguir em frente e realizar meus sonhos.

A minha família, em especial aos meus pais, Arnaldo Ben e Madalena Vielmo Ben, pela compreensão da minha ausência, pelo carinho a cada reencontro, pelas palavras de incentivo e pelo apoio nos momentos difíceis durante essa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Dressler da Costa, pelo suporte, ensinamentos, amizade, incentivos e orientação no decorrer de todo o doutorado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Sylvio Henrique Bidel Dornelles, pela amizade, ensinamentos e incentivos.

A UFSM e ao corpo docente do PPGA, pelos ensinamentos passados, e a Capes, pelo suporte e apoio financeiro para a realização desse trabalho.

A Drª Caroline Gularte, pela amizade, auxílio e ensinamentos, que foram primordiais para a execução e conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Danie Martini Sanchotene, pelos incentivos, amizade de longa data e pela disponibilidade de participar como membro da banca avaliadora.

Ao Prof. Dr. Jacques Leão, pelas valiosas sugestões fornecidas durante o processo de qualificação.

Ao Fernando Saccol, pela disposição e auxílio nas atividades realizadas no laboratório de Fitopatologia.

As amigas Angélica Marian, pela amizade e companheirismo durante toda essa jornada, e a Camila Farencena, pela amizade e palavras de incentivo e motivação.

Ao Lucas Bruning, pela amizade, apoio e auxílio nas atividades realizadas em casa de vegetação.

A todos que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigado.

“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje.
Mas nunca pare de avançar.”

(Martin Luther King Jr.)

RESUMO

VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Pyricularia oryzae* cav. DO ARROZ EM POACEAS

AUTOR: Cássio A. Vielmo Ben
ORIENTADOR: Ivan Francisco Dressler Costa

O arroz é um dos mais importantes cereais cultivados no Rio Grande do Sul e, por ser o maior produtor brasileiro, possui importância econômica e social para o Estado. A brusone, causada pelo fungo Pyricularia oryzae, está entre os principais fatores limitantes à produtividade dessa cultura, podendo causar perda total da lavoura. Essa doença incide sobre várias culturas, mas pouco se sabe sobre as fontes de inóculo virulento dessa doença ao arroz. Assim, visando conhecer mais sobre o patossistema arroz-brusone, este trabalho teve como objetivo estudar essa interação de patogenicidade entre isolados e espécies, e da infecção dos isolados obtidos dessas espécies após sua inoculação. Para isso dois experimentos foram realizados. No primeiro, em casa de vegetação,15 hospedeiros foram inoculados com dois isolados desse patógenos, sendo um proveniente do Tocantins (Isolado 1) e outro do Rio Grande do Sul (Isolado 2). Aos 2, 5, 7, 14, 18, 21 e 28 dias avaliou-se a severidade da doença e classificou-se como suscetível ou resistente conforme escala IRRI (2013). Também foram avaliados o número e comprimento de lesões. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, em esquema fatorial 15 x 2, sendo o fator A= hospedeiros e fator B= isolados. Amostras de tecido foliar lesionado foram coletados e utilizados para o experimento 2, onde procedeu-se o reisolamento do patógeno e identificação dele conforme o hospedeiro e isolado de origem, e após foram novamente reinoculados sobre novos hospedeiros e avaliada a incidência da doença, comprovando os hospedeiros viáveis. Como resultados do primeiro experimento, cinco hospedeiros foram suscetíveis ao Isolado 1, sendo elas as cultivares de arroz ‘IRGA 424’, ‘IRGA 424 RI’, ‘IRGA 425’, azevém e trigo, e seis para o Isolado 2 sendo ‘IRGA 424’, ‘IRGA 425’, ‘Guri INTA CL’, ‘Puita INTA CL”, azevém e trigo. Ainda, o maior número de lesões foi obtido para a cultivar ‘IRGA 424 RI’ para o isolado 1 e cultivar ‘Guri INTA CL’ para o isolado 2. Já a variável tamanho de lesão, os maiores valores foram encontrados no azevém inoculado com o Isolado 1 e na cultivar ‘Guri INTA Cl’ com o Isolado 2. No segundo experimento, com exceção do isolado obtidos de plantas de trigo, todos os demais foram virulentos para a espécie Oryza sativa. Esses resultados demonstraram que a cultura do trigo parece não ser um hospedeiro de P. oryzae virulenta ao arroz. Por outro lado, preocupam devido aos isolados obtidos de plantas de azevém e de aveia preta terem sido altamente virulentos para as cultivares de arroz, pois no RS, ambas espécies são amplamente cultivadas em períodos de entre safra, na forma de pastagens e formação de palhada e demonstraram ser ótimos hospedeiros para o patógeno.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Brusone. Hospedeiros.

ABSTRACT

VIRULENCE OF ISOLATES OF *Pyricularia oryzae* cav. OF RICE IN POACEAS

AUTHOR: Cássio A. Vielmo Ben
ADVISER: Ivan Francisco Dressler Costa

Rice is one of the most important cereals grown in Rio Grande do Sul and, being the largest Brazilian producer, has economic and social importance for the State. The blast, caused by the fungus Pyricularia oryzae, is among the main factors limiting the productivity of this crop, which can cause total loss of the crop. This disease affects several crops, but little is known about the sources of virulent inoculum of this disease to rice. Thus, in order to know more about the rice-blast method, the objective of this work was to study the interaction of pathogenicity between isolates and species and the infection of the isolates obtained from these species after inoculation. For this, two experiments were performed. In the first, in a greenhouse, 15 hosts were inoculated with two isolates of this pathogen, one from Tocantins (Isolated 1) and another from Rio Grande do Sul (Isolated 2). At 2, 5, 7, 14, 18, 21 and 28 days disease severity was assessed and classified as susceptible or resistant according to IRRI scale (2013). The number and length of lesions were also evaluated. A completely randomized design was used, with five replications, in factorial scheme 15 x 2, with factor A = hosts and factor B = isolates. Samples of injured leaf tissue were collected and used for experiment 2, where the pathogen was reisolated and identified according to the host and isolated from the source, and after reinoculation on new hosts and the incidence of the disease was evaluated, proving the viable hosts. As a result of the first experiment, five hosts were susceptible to Isolate 1, being the rice cultivars 'IRGA 424', 'IRGA 424 IR', 'IRGA 425', ryegrass and wheat, and six for Isolate 2 being IRGA 424 ',' IRGA 425 ',' Guri INTA CL ',' Puita INTA CL ', ryegrass and wheat. Also, the highest number of lesions was obtained for the cultivar 'IRGA 424 RI' for isolate 1 and 'Guri INTA CL' cultivar for isolate 2. Regarding the lesion size variable, the highest values were found in ryegrass inoculated with Isolate 1 and in the 'Guri INTA CI' cultivar with Isolate 2. In the second experiment, except for the isolate obtained from wheat plants, all the others were virulent for the Oryza sativa species. These results demonstrated that the wheat crop does not appear to be a host of virulent P. oryzae to rice. On the other hand, they are worried because the isolates obtained from ryegrass and black oat plants have been highly virulent for rice cultivars, because in RS, both species are widely cultivated in inter-harvest periods, in the form of pastures and straw formation and demonstrated to be great hosts for the pathogen.

Keywords: *Oryza sativa.* Blast. Hosts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura de conídios de *P. oryzae*, que iniciam a infecção. Fonte: Wilson; Talbot, 2009. 18

Figura 2. Ciclo de vida de *Pyricularia oryzae*. (a) os conídios simpodiais são observados nos conidióforos. (b) conídios aderem na superfície do hospedeiro com auxílio da mucilagem da ponta do esporo. (c) conídios germinam e produzem hifas. (d) O apressório melanizado é formado e, (e) um pino de penetração dá origem a hifas de infecção que tem aparência bulbosa. Fonte: Adaptado de Ebbole, D.J., 2007.....19

Figura 3. Câmara úmida montada com folhas de arroz cultivar Guri INTA CL contendo lesões típicas de brusone (A); Lesão esporulativa típica de brusone em folha de arroz (B); Lesões de brusone em folhas de arroz com a presença de conidióforos de *P. oryzae* originados após 48h em câmara úmida observadas em microscópio estereoscópico marca Olympus SZ-40 (C e D). Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.....35

Figura 4. Placa de Petri com linhas amarelas para auxiliar na inoculação da suspensão de conídios sobre meio de cultura ágar-água, com auxílio de micropipeta marca Kacil (A); Conídios iniciando a emissão do tubo germinativo após 6 horas de incubação (B); Conídio após 12 horas de incubação (C). Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019. 36

Figura 5. Micélio de *P. oryzae* crescido em grãos de trigo em frasco Erlenmeyer após 10 dias de incubação em B.O.D (A e B). Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019. 37

Figura 6. Demonstração do método de semeadura realizada no experimento. Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.....38

Figura 7. (A) Semeadura dos copos e alocação em bandejas de polipropileno; (B) Registro realizado seis dias após a emergência; (C) registro realizado aos 20 dias após a emergência. Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.....39

Figura 8. Verificação da temperatura interna da câmera com auxílio de termômetro digital (A); Vista externa da câmera de crescimento montada no laboratório de fitopatologia (B); Condição de alta umidade no interior da câmara de crescimento (C); e Momento da inoculação da suspensão de conídios sobre as plantas hospedeiras (D); Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019. 40

Figura 9. Placas com isolados obtidos de hospedeiros suscetíveis aos Isolados 1 e 2. Fonte: do Autor. Santa Maria, RS. 2019. 50

Figura 10. Isolamento de *P. oryzae* obtidos de plantas de arroz (A); Inoculação dos isolados sobre hospedeiros para avaliação quanto à doença e diferença de virulência entre isolados (B) e; Isolamento de *P. oryzae* obtida das lesões manifestadas em hospedeiros e posterior reinoculação em cultivares de arroz, com o objetivo de avaliar a potencialidade do hospedeiro em manter a viabilidade do patógeno (C). Santa Maria, RS, 2019. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de notas proposta pelo IRRI (2013) para avaliação da severidade de brusone. Santa Maria, 2019. 41

Tabela 2. Resultados da avaliação de suscetibilidade dos hospedeiros inoculados com o Isolado 1 conforme a escala de notas proposta pelo IRRI. Santa Maria-RS, 2019. 42

Tabela 3. Resultados da avaliação de suscetibilidade dos hospedeiros inoculados com o Isolado 2 conforme escala de notas proposta pelo IRRI. Santa Maria-RS, 2019. 43

Tabela 4. Médias das notas da avaliação do número de lesões causadas por isolados de *Pyricularia oryzae* inoculados sobre 15 hospedeiros pertencentes à família *Poaceae*. Santa Maria, RS, 2019. 44

Tabela 5. Médias das notas da avaliação do tamanho de lesões causadas por isolados de *Pyricularia oryzae* inoculados sobre 15 hospedeiros pertencente à família *Poaceae*. Santa Maria, RS, 2019. 46

Tabela 6. Nomenclatura dos novos isolados obtidos de diferentes hospedeiros, conforme isolado de origem. Santa Maria, RS, 2019. 53

Tabela 7. Resultados da incidência de brusone causada por novos isolados originários do Isolado 1, sobre hospedeiros pertencentes a família *Poaceae*. Santa Maria, RS, 2019. 54

Tabela 8. Resultados da incidência de brusone causada por novos isolados originários do Isolado 2, sobre hospedeiros pertencentes a família *Poaceae*. Santa Maria, RS, 2019. 55

Tabela 9. Período latente até serem observados sintomas causados por isolados originados do **Isolado 1** sobre poaceas. Santa Maria, RS, 2019. 57

Tabela 10. Período latente até serem observados sintomas causados por isolados originados do **Isolado 2** sobre poaceas. Santa Maria, RS, 2019. 57

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Resumo da análise de variância referente ao número de lesões submetidos ao teste médias Skott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2019. 73

Apêndice 2. Resumo da análise de variância sobre médias do tamanho de lesões submetidos ao teste médias Skott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2019. 73

Apêndice 3. Discos de micélio de isolados, armazenados em micro tubos Eppendorf contendo água destilada conforme método de Castellani. Santa Maria, RS, 2019. 73

Apêndice 4. Folhas de arroz, cultivar 'IRGA 424' com lesões características de brusone aos 40 DAI. Santa Maria, RS, 2019. 74

Apêndice 5. Folhas de arroz, cultivar 'IRGA 424 RI' com lesões características de brusone aos 40 DAI. Santa Maria, RS, 2019. 75

Apêndice 6. Folhas de arroz, cultivar 'IRGA 425' com lesões características de brusone aos 40 DAI. Santa Maria, RS, 2019. 76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 14
2 REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1 A CULTURA DO ARROZ 16
2.2 BRUSONE DO ARROZ 17
2.3 O CICLO DE VIDA DE *P. oryzae* 18
2.4 BIOLOGIA DO PATÓGENO 21
2.5 CONTROLE DA DOENÇA 22
2.6 SISTEMA DE CULTIVO DO ARROZ X SOBREVIVÊNCIA DO PATÓGENO 24
2.7 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PATÓGENOS 27
2.8 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ESPÉCIES VEGETAIS 28
2.9 CONDIÇÕES AMBIENTAIS X METABÓLITOS 30
3 MATERIAL E MÉTODOS 34
3.1 EXPERIMENTO 1: Virulência de isolados de *P. oryzae* sobre espécies da família *Poaceae* 34
3.1.1 Isolados 34
3.1.2 Preparo da suspensão de conídios 37
3.1.3 Cultivo de plantas hospedeiras 38
3.1.4 Inoculação dos isolados 39
3.1.5 Avaliações 40
3.1.6 Resultados e discussões 42
3.2 EXPERIMENTO 2: Avaliação de potenciais hospedeiros de Pyricularia oryzae virulentos para a cultura do arroz. 49
3.2.1 Etapa 1: Origem dos isolados 49
3.2.2 Etapa 2: Cultivo das plantas hospedeiras 50
3.2.3 Etapa 3: Inoculação dos isolados 50
3.2.4 Etapa 4: Avaliações 51
3.2.5 Resultados e discussões 52
4 CONCLUSÃO GERAL 59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60
APÊNDICES 72

1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa L*.), é essencial para a segurança alimentar e nutricional, sendo um dos principais alimentos consumidos pela população brasileira, assim como para mais da metade da população mundial (CONAB, 2019). Também, por ser cultivado em todos os continentes, demonstra ter grande importância econômica e social (BORTOLOTTO et al., 2008).

No Brasil, a área estimada dessa cultura na safra 2018/19 foi de 1,76 milhões de hectares e a expectativa de produção é de aproximadamente 10,7 milhões de toneladas do grão, sendo o estado do Rio Grande do Sul (RS) responsável por 70% dessa produção (CONAB, 2019).

Mesmo apresentando bons índices de produtividade, alguns pontos ainda surgem como barreiras que impedem que o arroz atinja seu potencial produtivo. Em destaque, a brusone, doença causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* Cavara (teleomorfo *Magnaporthe oryzae* ((Hebert) Barr, 1977) é a que causa maiores danos, além de ser considerada uma ameaça à segurança alimentar no mundo, pois ocorre em quase todos os continentes (SCHEUERMANN; EBERHARDT, 2011).

Diante disso, medidas de controle devem ser tomadas para controlar essa doença antes mesmo da implantação da cultura, como a eliminação de plantas hospedeiras, principais responsáveis por manter o patógeno viável na ausência da cultura do arroz (CHAVEZ; KOHLI, 2015).

Na literatura não são encontrados muitos dados sobre as fontes do patógeno virulento ao arroz e a intervenção de hospedeiros potenciais sobre o inóculo de brusone, tão pouco as alterações que eles podem causar ao patógeno. Exemplo disso é que uma das poucas informações é que a brusone incidente sobre o arroz é virulenta ao trigo, porém o contrário não ocorre e isso não é conhecido para as demais culturas hospedeiras. Esse dado foi relatado por Maciel em 2011, porém, por ser um patógeno com alta capacidade de adaptação e mutação, cabe realizar novas pesquisas e verificar se isso ainda acontece com o trigo, e com outras culturas da família *Poaceae*.

Além disso, o estado atual da arte não relata estudos sobre as interações existentes entre a *P. oryzae* presente em outras espécies e quais são hospedeiros viáveis para os patótipos que causam doença no arroz.

Mediante ao exposto acima, buscou-se encontrar os possíveis hospedeiros que contribuem como fonte de inóculo virulento à cultura do arroz, tendo como critério a

seleção das principais plantas daninhas, comumente encontradas em áreas de cultivo de arroz, assim como as culturas utilizadas em períodos de entre safra, totalizando 15 hospedeiros pertencentes à seis espécies.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CULTURA DO ARROZ

Esse cereal pertence à divisão *Magnoliophyta*, tribo *Oryzeae*, família *Poaceae*, subfamília *Oryzoideae* e ao gênero *Oryza* (VAUGHAN et al., 2003).

O arroz é o segundo cereal mais produzido no mundo, perdendo apenas para o milho (FAO, 2014), e é a principal fonte energética e proteica para mais da metade da população mundial (CONAB, 2019), além de desempenhar importante papel econômico e social (SOSBAI, 2016), pois além de atuar como fonte alimentar, ainda é relevante quanto a geração de emprego e renda para a população (MONACO; SALI, 2018).

Mundialmente, o Brasil é o 9º maior produtor de arroz, superando 10 milhões de toneladas (CONAB, 2019). Aproximadamente 69% da produção é realizada em sistema irrigado, em áreas de várzea. O RS possui cerca de 1,1 milhões de hectares utilizados para a orizicultura e responde por mais de 70% da produção brasileira (CONAB, 2019).

Esses resultados se devem à alta produção dessa cultura, que está relacionada com diversos fatores como semeadura na época recomendada, uso de sementes certificadas, disponibilidade de água, adubação e manejo de insetos e doenças. Além disso, temperaturas nas faixas entre 20 a 35 °C também são essenciais, pois contribuem para a sua germinação, floração e maturação (SOSBAI, 2016).

Porém, fatores bióticos também interferem na produtividade, principalmente o ataque de pragas, que segundo Martins et al. (2009), são capazes de causar perdas de 15 a 30% de produtividade e doenças que incidem sobre a cultura, que comprometem diretamente a produtividade e a qualidade dos grãos, pois podem ocorrer durante todo o seu ciclo de desenvolvimento e, dependendo do patógeno e das condições ambientais, pode causar até 100% de perdas (PRABHU et al., 2006).

Assim, a cultura do arroz necessita de especial atenção quanto a esses fatores, principalmente os bióticos, que atuam na sanidade e influenciam negativamente sobre o seu potencial produtivo.

2.2 BRUSONE DO ARROZ

A brusone, doença causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* Cavara (1891), é responsável por danos diretos e indiretos na produção de arroz (SKAMNIOTI; GURR, 2009) e podem comprometer até 100% da produção em anos com condições ambientais favoráveis ao patógeno e em cultivares suscetíveis (LOBO et al., 2006; PRABHU et al., 2009), principalmente quando a incidência ocorre no período mais crítico que decorre desde o emborrachamento até a floração do arroz (SOSBAI, 2014).

Segundo Wang e Valent (2009), é uma das doenças do arroz mais frequentes e onerosas em regiões de cultivo em todo o mundo, e alguns aspectos podem ajudar a detectar previamente a sua presença e proceder métodos de controle, como a sintomatologia. Inicialmente, nas folhas, os sintomas surgem na forma de pequenas lesões necróticas alongadas de coloração marrom, que evoluem tornando-se maiores e na forma elíptica, com margens de coloração marrom e centro cinza ou esbranquiçado causando perdas indiretas, pois afetam a fotossíntese e a respiração (LOBO et al., 2006). Já nas panículas os danos são diretos, devido às lesões nos diferentes componentes de produção (PRAHBU et al., 2009; NUNES, 2013), que ocorrem durante todo o período da produção do arroz.

Devido a danos como os descritos anteriormente, responsáveis por influenciar diretamente no declínio da produtividade, tanto na cultura do arroz assim como em outros cultivos pertencentes a família *Poaceae*, *P. oryzae* está catalogada como um sério patógeno quarentenário que ameaça a agricultura (KOHLI et al., 2011).

Outros aspectos contribuem para isso, como a sua enorme variabilidade patogênica, sendo esse um dos fatores que possibilitam que o ciclo de vida de *P. oryzae* continue após a colheita ou até o próximo estabelecimento da cultura (DIAS NETO et al., 2008). Devido a isso, esse patógeno pode sobreviver na forma de micélio ou conídios em restos culturais ou em plantas hospedeiras alternativas, como trigo (*Triticum aestivum*), aveia branca (*Avena sativa*), aveia preta (*Avena strigosa*), azevém (*Lolium multiflorum*), arroz vermelho (*Oryza sativa*), milhã (*Digitaria* sp.), etc, permitindo que os conídios sejam disseminados pelo vento durante todo o ano e, quando encontra outro hospedeiro, iniciem os processos de infecção (BEDENDO; PRABHU, 2005).

Na literatura são listadas mais de 50 espécies como hospedeiros alternativos deste patógeno, embora plantas de arroz seja considerado o hospedeiro mais

importante (PRABHU et al., 2009). Além disso, segundo Chavez e Kohli (2015), *P. oryzae* tem incidido sobre uma ampla variedade de hospedeiros nos cereais de inverno. Para Stukenbrock e McDonald (2008), essa troca de hospedeiros pode estar relacionada com a proximidade entre as plantas cultivadas e os hospedeiros alternativos deste patógeno; e até o momento, não foram encontradas informações disponíveis na literatura consultada.

2.3 O CICLO DE VIDA DE *P. oryzae*

O ciclo de infecção pelo patógeno fúngico envolve vários passos importantes, incluindo a produção e fixação de conídios à superfície da planta, formação de apressório que emerge das pontas do tubo germinativo do conídio, penetração e crescimento invasivo de hifas de infecção (WILSON; TALBOT, 2009).

A principal forma de disseminação do fungo durante uma epidemia ocorre por dispersão aérea de conídios. Segundo Barksdale e Asai (1961), cada lesão de um hospedeiro suscetível pode dar origem a mais de 20 mil conídios durante vários dias, servindo como fonte de dispersão secundária. A liberação de conídios é desencadeada por uma exposição de uma a duas horas à escuridão e diminui com a escuridão contínua (LEE et al., 2006).

Assim, segundo Ingold (1964), a liberação de esporos é um processo ativo, e tem sido sugerido que a pequena célula do caule formada na base do conídio (Figura 1) constrói a pressão do turgor até que se rompa, lançando o conídio.

Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura de conídios de *P. oryzae*, que iniciam a infecção. Fonte: Wilson; Talbot, 2009.

A infecção foliar é iniciada pela fixação de um conídio tricelular de *P. oryzae* à cutícula das folhas de arroz. O conídio em formato piriforme adere firmemente à superfície da folha por meio de um adesivo, que é liberado de um compartimento apical do conídio durante a hidratação (HAMER, et al. 1988).

Este adesivo fornece ao esporo uma maneira de se ancorar firmemente à superfície de arroz, que é hidrofóbica, e permite que a germinação ocorra (TALBOT; EBBOLE; HAMER, 1993).

Na figura 2, pode ser visualizado o ciclo de vida de *P. oryzae*.

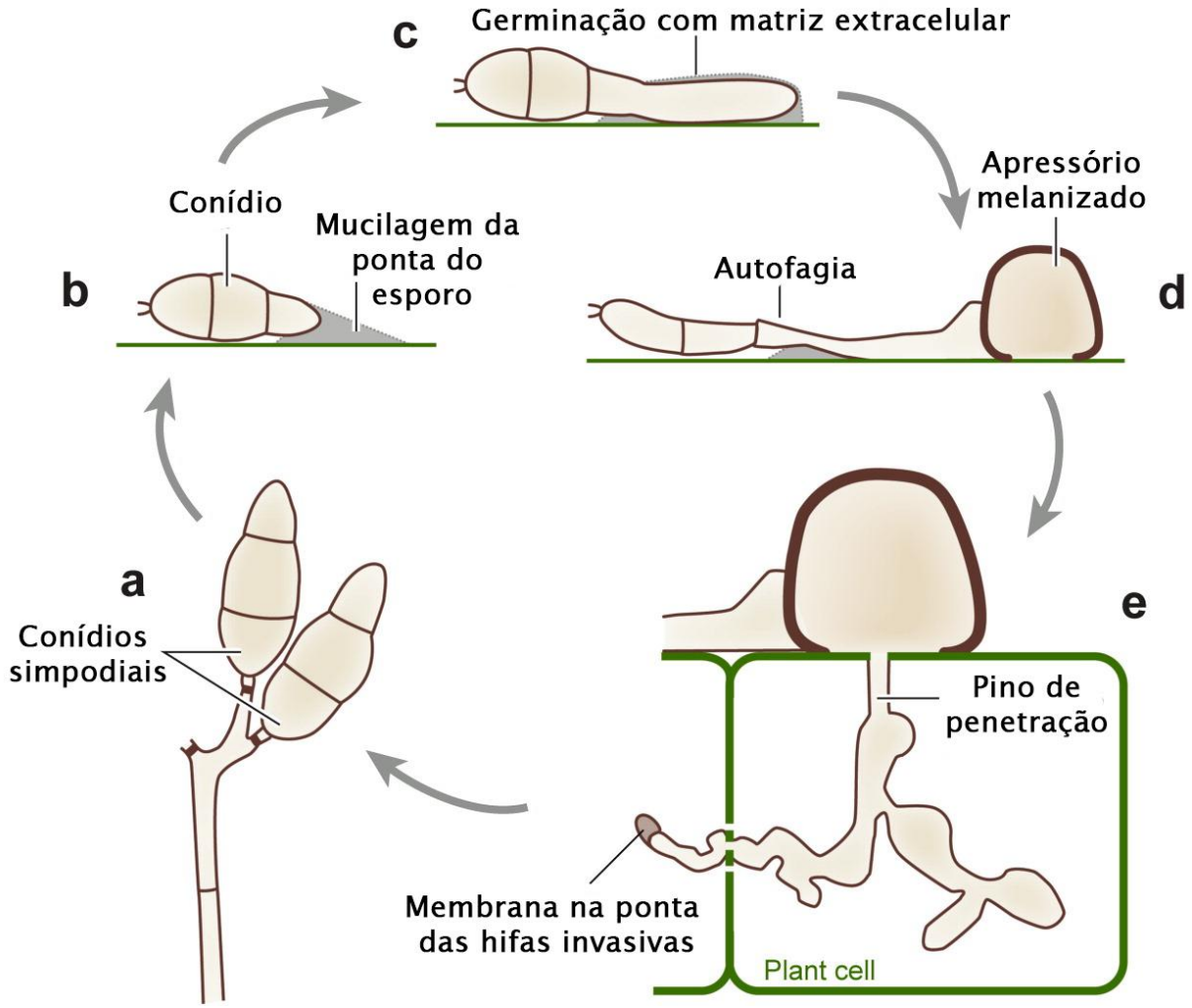


Figura 2. Ciclo de vida de *Pyricularia oryzae*. (a) os conídios simpodiais são observados nos conidióforos. (b) conídios aderem na superfície do hospedeiro com auxílio da mucilagem da ponta do esporo. (c) conídios germinam e produzem hifas. (d) O apressório melanizado é formado e, (e) um pino de penetração dá origem a hifas de infecção que tem aparência bulbosa. Fonte: Adaptado de Ebbole, D.J., 2007.

O tubo germinativo emerge do esporo, normalmente de sua extremidade afilada (mais fina), e cresce através da superfície da folha, antes de se diferenciar no apressório em forma de cúpula (TALBOT, 2003)

A formação do apressório requer uma superfície dura e hidrofóbica. Uma vez formado, o apressório amadurece e gera turgor, acumulando altas concentrações de solutos compatíveis, como o glicerol (de JONG et al., 1997). O apressório possui uma parede celular diferenciada, rica em quitina e contém uma camada distinta de melanina entre a parede e a membrana celular (EBBOLE, 2007), que é essencial para a geração de turgescência e atua como uma barreira ao fluxo de soluto do apressório que ocorre com a pressão gerada (CHUMLEY; VALENT, 1990).

A melanina desempenha um papel estrutural no fortalecimento do apressório e forma uma camada impermeável para evitar o vazamento de osmólitos, que geram o substancial turgor interno necessário para a penetração da cutícula (de JONG et al., 2007).

O turgor celular é traduzido em força mecânica, que é exercida pela cavidade de penetração, forçando-a através da cutícula da folha. Hifas fúngicas ramificam através do tecido da planta, resultando nas lesões da doença causando sintomas da brusone do arroz. O fungo esporula a partir de lesões em condições de alta umidade, permitindo que o patógeno se espalhe rapidamente para plantas de arroz adjacentes pelo vento ou gotas de orvalho (TALBOT, 2003).

O crescimento invasivo de *P. oryzae* envolve um estágio biotrófico prolongado no qual o fungo cresce dentro das células da planta hospedeira, circundado pela membrana plasmática da planta (EBBOLE, 2007). As células bulbosas ramificadas formadas *por P. oryzae* durante a invasão inicial dos tecidos são estruturas especializadas de alimentação fúngica adaptadas para derivar a nutrição de células vegetais vivas e podem ser análogas aos haustórios produzidas por fungos biotróficos obrigatórios, como oídio e ferrugem (TALBOT, 2003).

A natureza biotrófica das infecções por brusone do arroz também é sugerida por evidências recentes de que o movimento do fungo de uma célula para outra pode ocorrer por meio de plasmodesmos, pois as hifas invasivas se movem para as células epidérmicas adjacentes. Além disso, o fungo parece não ter capacidade de penetrar em estômatos que não possuem plasmodesmos compatíveis com esse modo de disseminação célula-célula (KANKANALA; CZYMMEK; VALENT, 2007). Somente mais tarde, à medida que as lesões se tornam aparentes, o fungo torna-se mais

necrotrófico e, por essa razão, *P. oryzae* foi classificado como hemi-biotrófico, ou seja, ataca células vivas, porém pode se desenvolver e reproduzir após a morte dos tecidos atacados (EBBOLE, 2007).

2.4 BIOLOGIA DO PATÓGENO

O fungo que causa a brusone no arroz é chamado *Magnaporthe oryzae* (anteriormente conhecido como *Magnaporthe grisea*). Produz esporos sexuais (ascósporos) em estruturas denominadas de ascos, localizados em estruturas especializadas chamadas de peritécio, classificando-o como um ascomiceto.

O resultado da germinação é chamado de micélio, que é septado e possui núcleos haploides no seu interior.

A fase sexual, ou teleomórfica, do patógeno da brusone do arroz pode ser produzida em laboratório. Porém, a fase sexual não tem sido encontrada em condições de campo. Sendo um ascomiceto, este fungo produz ascósporos hialinos, de formato fusiforme (cilíndricos com pontas afinadas) com três septos. Com base em recentes dados filogenéticos, moleculares e morfológicos, isolados obtidos do arroz e isolados obtidos de outras espécies próximas de gramíneas como *Eragrostris curvula*, *Eleusine coracana*, *Lolium perenne*, e *Setar*ia spp. são taxonomicamente descritos como *Magnaporthe oryzae* (COUCH et al., 2002), enquanto que isolados de *Digitaria sanguinalis* (capim-colchão) são distintos e devem ser descritos como *Magnaporthe grisea* (TOSA; CHUMA, 2014).

A fase assexual, ou anamórfica, de *Magnaporthe oryzae* é descrita pelo nome *Pyricularia oryzae* Cavara (anteriormente chamada *P. grisea*) e é caracterizada pela presença de esporos (COUCH; KOHN, 2002). Estes esporos, chamados conídios, são geralmente compostos por três células e são produzidos abundantemente sobre lesões e em meio de cultura em hifas especializadas, chamadas de conidióforos. Os conídios são simples, secos, hialinos, septados, lisos, solitários e podem ser terminais ou laterais ao conidióforo. Os conidióforos são longos, delgados, livres e eretos, presentes em lesões características da doença (REIS; CASA, 2005) e podem conter até 20 conídios (PRABHU; FILIPPI, 2006).

O gênero *Pyricularia* sp. possui esse nome em referência à forma piriforme de seus conídios (MURATA et al., 2014), sendo ainda que *Pyricularia oryzae* foi usado

para se referir aos estágios assexuais do fungo da brusone como foi encontrado no campo. Colônias esporulantes em placas com meio de ágar podem ter uma aparência acinzentada.

2.5 CONTROLE DA DOENÇA

O manejo da brusone em lavouras de arroz tem o objetivo de diminuir a população do patógeno a níveis toleráveis, de maneira que não ocorram danos econômicos e, para isso, devem ser executadas medidas preventivas como uso de cultivares resistentes ou tolerantes à doença, práticas culturais e controle químico, que ainda é considerado o mais eficiente (PRABHU; FILIPPI, 2006).

Entretanto, o controle químico vem apresentando alguns problemas quanto a sua eficiência e isto pode estar ligado aos aspectos biológicos do patógeno ou suas variações genéticas, a fonte de inóculo que pode ser de restos culturais, sementes ou plantas hospedeiras e quanto a proteção de folhas e panículas (MACIEL, 2011).

Ainda, outros fatores estão ligados a esses resultados como a pressão de seleção, que está fortemente relacionada ao número de aplicações de fungicidas na cultura, alternância e uso de misturas de fungicidas em relação ao uso frequente de um único princípio ativo, tecnologia de aplicação, tempo de degradação das moléculas fungicidas, etc (MA; UDDIN; OLAYA, 2009).

O uso de fungicidas para a proteção de plantas é a prática que apresenta a melhor resposta no controle de doenças, no entanto, casos de resistência de *P. oryzae* vem ocorrendo com alguns grupos químicos, como por exemplo com os fungicidas do grupo das estrobilurinas, que são amplamente utilizados no controle de doenças na cultura do arroz (PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009).

Os ingredientes ativos fungicidas mais comuns são pertencentes aos seguintes grupos químicos: azoxistrobina, picoxistrobina, fluoxastrobina, orizastrobina, dimoxiystrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina e são conhecidos como fungicidas inibidores da quinona oxidase, ou fungicidas QoI, pois apresentam apenas um modo bioquímico de ação que é a inibição da respiração mitocondrial, atuando no sítio QoI (PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009).

De forma mais específica, casos de resistência de *P. oryzae* ao princípio ativo azoxistrobina foram relatados no Japão (FRAC, 2012). No Brasil, em trigo, há relatos de casos de resistência do patógeno às estrobirulinas, mas não de *P. oryzae* em arroz.

Contudo, o emprego contínuo desse grupo químico pode acelerar esse processo, principalmente por *P. oryzae* ser um patógeno com alta capacidade de mutação e também pelos fungicidas desse grupo químico atuarem em um único sítio de ação nas células fúngicas, e isso pode representar alto risco de aquisição de resistência para populações fúngicas (RODRIGUES et al., 2007).

Outro fungicida muito utilizado no controle de *P. oryzae* em todos os países produtores de arroz pertence ao grupo químico benzotiazol, e tem como princípio ativo o triciclazol. Segundo Di Tullio e Baldi (2011), em 2009 aproximadamente 94% das lavouras da Itália foram tratadas com triciclazol.

Essa ampla utilização é devido, principalmente, pela alta eficácia no controle sobre a doença, como foi relatada por Titone, Mongione e Tamborini (2015), que após avaliarem a resistência de isolados de *P. oryzae* sobre cultivares italianas de arroz e o efeito de triciclazol sobre a brusone, obtiveram mais de 80% de controle, demonstrando que, apesar do longo período em que é utilizado, o fungicida é uma fonte de proteção indispensável para manter a sanidade das lavouras.

Porém o mesmo não foi observado em trabalho realizado por Kunova et al. (2014), onde avaliaram a sensibilidade e a EC_{50} de triciclazol em isolados que nunca tinham sido expostos ao fungicida, e verificaram que a concentração efetiva, que inibiu o crescimento micelial, foi menor quando comparado à dose para inibir o crescimento de isolados coletados de lavouras onde já haviam sido expostos ao produto, concluindo assim que há uma diminuição da sensibilidade de *P.oryzae* quando exposto ao triciclazol por um longo período. Na China casos de resistência de *P. oryzae* à triciclazol foram relatados por ZHANG et al. (2009). Já no Japão Zhou et al. (2013), afirmam que além do triciclazol não ser mais efetivo no controle da brusone, ainda deixam resíduos no ambiente.

No Brasil ainda não foram relatados casos de resistência de *P. oryzae* a triciclazol, porém vem sendo utilizado amplamente em lavouras de arroz na tentativa de controle da brusone, e isso pode induzir resistência devido a pressão de seleção.

Como alternativa na rotação de princípios ativos fungicidas e uso de produtos menos nocivos ao meio ambiente, a casugamicina, que pertence ao grupo dos antibióticos/fungicidas, tornou-se uma opção aos orizicultores, porém apresenta

limitações e carece de cuidados no seu uso. Esse produto possui modo de ação sistêmica, protetora e curativa, e atua na inibição do crescimento de hifas de *P. oryzae* em arroz, prevenindo o desenvolvimento de lesões (COPPING; DUKE, 2007).

Comparativamente aos fungicidas tradicionais, apresenta fraca ação inibitória para germinação de esporos, formação de apressório na superfície da planta ou penetração na epiderme da célula. Ainda, a casugamicina é considerada um produto de médio risco de resistência por parte dos fungos em que é utilizado (COPPING; DUKE, 2007).

Em estudos realizado por Miura (1976), foram encontrados falhas no controle de brusone em arroz, pois naquela época já havia ocorrência natural de isolados de *P. oryzae* resistentes à casugamicina no Japão. Mais recentemente, em pesquisa realizada por Zhang et al. (2013), ao avaliarem a EC_{50} de casugamicina em isolados de *P. oryzae* coletados na província de Jiangxi, constataram grande variação das doses testadas até obter controle, que chegou a 333 mg/L e foi determinada como baixa eficiência do fungicidas e alto risco de resistência do patógeno.

Em seus experimentos, McGhee e Sundin (2011), determinaram que a exposição de *Erwinia amylovora* a baixas concentrações de casugamicina aumentou o risco de desenvolvimento de resistência espontânea e que existe forte probabilidade de resistência múltipla, por haver multigenes envolvidos na resistência à casugamicina. No Brasil não foram encontrados dados de estudos científicos relacionados à EC_{50} de casugamicina para isolados de *P. oryzae* do arroz. Mesmo assim, em trabalhos realizados com trigo e experimentos de arroz à campo, demonstraram que quando a casugamicina foi aplicada de forma isolada não foi obtido total controle do patógeno, porém, quando utilizada em mistura a outros fungicidas, houve maior controle e incremento nos índices de produtividade.

2.6 SISTEMA DE CULTIVO DO ARROZ X SOBREVIVÊNCIA DO PATÓGENO

Os sistemas de cultivo de arroz mais utilizados no Rio Grande do Sul são convencionais, cultivo mínimo e plantio direto e ambos estão diretamente ligados às condições disponibilizadas para o desenvolvimento da cultura do arroz.

O sistema convencional de cultivo baseia-se no intenso revolvimento do solo, pela ocasião do preparo primário (aração), seguido de preparo secundário mais

superficial (grades e plainas niveladoras). Nesse sistema há o revolvimento total do solo e incorporação dos restos culturais, acelerando a decomposição da palhada. Dessa forma ocorre maior acúmulo de matéria orgânica (MO) e permite que o nitrogênio (N) fique mais disponível e em menor tempo (CUCU et al., 2014). Assim, quando a cultura do arroz é estabelecida, a absorção desse nutriente é mais rápida e isso pode influenciar diretamente sobre a ocorrência de brusone, pois a severidade da doença é gradativamente influenciada pelo N, e isso se deve à rápida expansão e menor espessura da parede celular, facilitando a penetração da hifa de infeção do patógeno (WU et al., 2014). Esse aumento da pré-disposição à doença também pode ser influenciado pela quantidade e modo de aplicação, forma disponível e época de aplicação do N durante o desenvolvimento da cultura do arroz (FREITAS et al., 2010).

Além disso, esse sistema de cultivo ocasiona a desestruturação do solo e, consequentemente, contribui para o maior acúmulo de água durante períodos mais longos quando comparado aos sistemas de cultivos onde existe melhor drenagem (ASSIS; LANÇAS, 2010). Assim, pela ocasião do estabelecimento da cultura e no decorrer do período de cultivo do arroz, o acúmulo de água permitirá a formação de microclima e, dessa forma, irá contribuir para o desenvolvimento de doenças, uma vez que excesso de umidade e períodos de calor excessivo fornecem as condições ótimas para o desenvolvimento da brusone.

Outro método utilizado é o cultivo mínimo, que apresenta menor mobilização do solo e pode ser realizado no verão ou final do inverno, sendo neste segundo caso com uma antecedência que permita a formação de uma cobertura vegetal antes do plantio do arroz. Neste sistema a incidência de plantas daninha é bastante reduzida (SOSBAI, 2016), porém ainda assim permite a permanência de inóculo no solo, que inicialmente pode incidir e se propagar nas plantas daninhas presentes na lavoura (GLADIEUX et al., 2014; FISHER et al., 2012).

Já em locais onde é adotado o sistema de semeadura direta, o solo não é revolvido e tanto a aeração quanto a drenagem são melhores, evitando acúmulo de água nos estádios iniciais da cultura, assim como, há maior perda de nitrato por lixiviação, menor decomposição dos restos culturais pela maior volatilização da amônia e imobilização microbiana, sendo ainda que a introdução de MO com alta relação C/N incrementa a atividade microbiana, aumentando a mobilização do N e, consequentemente, sua menor disponibilidade inicial às plantas (SANTOS et al., 1998).

Nesse sistema, a semeadura do arroz ocorre diretamente sobre os resíduos da cultura anterior, sem que haja preparo do solo, proporcionando a permanência da cobertura vegetal durante todo o ano e mantendo um aporte contínuo de resíduos que contribuem para a redução da degradação do solo (GOMES et al., 2004). Outro fato decorrente é o favorecimento à sobrevivência do inóculo de brusone uma vez que os resíduos, estando na superfície do solo, requerem mais tempo para a mineralização e assim, facilita o surgimento da doença devido à proximidade que está em relação ao arroz (REIS; CASA; BIANCHIN, 2011). Ainda, como no RS essas áreas são cultivadas geralmente com pastagens de inverno (aveia, azevém, ...), a permanência de inóculo oriunda de culturas anteriores é maior, pois por ser um patógeno saprófito e que incide sobre diversas culturas, sobrevive na forma de micélio dormente no interior de tecidos de restos culturais, na forma de conídios ou hifas vegetativas (KIM et al., 2009), permanecendo inativos até que as condições ambientais estiverem favoráveis para a sua disseminação (REIS; CASA, 2007).

Além disso, como o manejo de irrigação é realizado após a emergência do arroz, emergem também outras plantas daninhas, entre elas, o arroz vermelho (RAO et al., 2007). Embora o arroz vermelho seja fisiologicamente e fenotipicamente semelhante ao arroz cultivado, ele difere em vários traços importantes, incluindo o hábito de debulha precoce de sementes, dormência, emergência prolongada etc. A debulha precoce promove a propagação de sementes na lavoura antes que o arroz cultivado seja colhido (OTTIS et al., 2017). Essa permanência no solo interfere negativamente, pois ao germinar, servirá de hospedeiro para a brusone, permitindo que o inóculo persista na lavoura por mais tempo (GIANINETTI; VERNIERI, 2007). Dessa forma, quando isso ocorrer, o controle deve ser realizado preferencialmente antes da semeadura do arroz.

Outro fator que contribui na permanência do inóculo de *P. oryzae* nessas áreas é pela capacidade de parasitar hospedeiros secundários ou plantas voluntárias de diferentes famílias que permanecem na lavoura durante a entressafra (WOOLHOUSE; HAYDON; ANTIA, 2005; GLADIEUX et al., 2014; FISHER et al., 2012). Essa possibilidade ocorre por meio de mecanismos evolutivos comuns entre patógenos que vão se adaptando após cada troca de hospedeiro, pois o genoma sofre alterações e permite maior adaptação com o novo hospedeiro (RAFFAELE et al., 2010; STUKENBROCK; BATAILLON, 2012). Porém no caso da *P. Oryzae,* a adaptação ao hospedeiro são características evolutivas adquiridas por espécies de *Pyricularia* sp.

sob fortes pressões de seleção predeterminadas pelas plantas hospedeiras (ZHONG et al., 2016).

Esses hospedeiros geralmente estão localizados nas bordaduras ou em taipas da lavoura e, em muitos casos, dificilmente são removidas e estão sujeitos a infecções causados por *P. oryzae* durante a ausência do arroz (PARKER; GILBERT, 2004). Dessa forma, procedimentos que contribuem na redução de inóculo de *P. oryzae* em lavouras de arroz devem ser adotados, principalmente a eliminação das plantas aquáticas hospedeiras que estejam nas lavouras ou nos canais de irrigação, taipas e estradas internas (VIENE et al., 2013), além de restos de cultura após a colheita (“soca”). Exemplo da importância da realização desse manejo foi relatado em trabalho realizado na Índia com o propósito de estudar o tempo de sobrevivência de *P. oryzae* em plantas de azevém, onde foi observado que, mesmo após cinco anos, a quantidade de conídios viáveis ainda era grande, e após serem inoculados em plantas de arroz, houve a manifestação dos sintomas da doença (HARMON; LATIN, 2005).

Esses casos citados acima, podem demonstrar como *P. oryzae* é um fungo agressivo, com habilidade de adaptação e sobrevivência, e sua vasta diversidade genética. Assim, representa um desafio para desenvolver estratégias duradouras para o seu controle (MCDONALD; LINDE, 2002), e devido a sua exposição a efeitos ambientais exercendo pressão evolutiva, ocasionaram taxas de mutação mais rápidas, adaptação e sobrevivência nos hospedeiros secundários (HOFFMANN; SGRO, 2011; BADYAEV, 2005). Ainda, os impactos das mudanças adaptativas são evidentes pelo aumento da população desse patógeno (FISHER et al., 2012), onde as mutações indutíveis ao estresse, aceleraram a evolução adaptativa nas populações (GALHARDO; HASTINGS; ROSENBERG, 2007). Desta forma, a alta instabilidade genômica e a diversidade genética de *P. oryzae* levam à quebra precoce da resistência à doença em variedades de arroz, o que constitui um desafio para os produtores de arroz.

2.7 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PATÓGENOS

Os patógenos fúngicos, especialmente hemibiotróficos, inicialmente estabelecem uma relação biotrófica com o hospedeiro e supostamente produzem

metabólitos secundários tóxicos principalmente durante a infecção tardia (HORBACK et al. 2011)

Nesse momento, os fungos produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários de baixo peso molecular que não são diretamente necessárias para o crescimento básico ou processos celulares. Porém, de acordo com Spatafora e Bushley (2015), são considerados essenciais em funções ecológicas como sensoriamento ambiental, interação microbiana ou patogênese.

Ainda, no caso de patogênese, a metabolização de fitotoxinas fúngicas seletivas ao hospedeiro se fazem necessárias e cruciais para tal processo (TSUGE et al., 2013)

Entre os metabólitos secundários sintetizados por vias complexas, podem ser encontrados policetídeos, terpenos, peptídeos e alcalóides. No caso da *P. oryzae*, muitos compostos fitotóxicos já possuem estruturas conhecidas, incluindo muitos derivados de policetídeos aparentes semelhantes a piramiolol e piriculariol. Segundo Dean et al. (2005), estima-se que 23 policetídeos sintases estejam presentes na sequência do genoma de *P. oryzae*, juntamente com seis sintetases peptídicas não ribossômicas e oito genes híbridos não ribossômicos.

Para Liu et al. (2011), outro fato importante é que esses metabólitos podem ser produzidos em diferentes fazes de desenvolvimento da *P. oryzae*, como por exemplo, na identificação da cerosidade da superfície foliar do arroz, na degradação da parede celular do hospedeiro ou até na ativação de metabólitos de defesa.

2.8 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ESPÉCIES VEGETAIS

No decorrer do tempo, as plantas desenvolveram mecanismos complexos para resistir a agentes patogênicos incluindo as respostas programadas à morte celular e a libertação de proteínas relacionadas com a patogenicidade e explosões oxidativas. Outro mecanismo deste tipo é a síntese e liberação de metabolitos secundários tóxicos para potenciais agentes patogênicos. Este reconhecimento ativa várias respostas de defesa vegetal, incluindo a produção de fitoalexinas, sinalização de metabólitos primários, produção de espécies reativas de oxigênio, produção de protease e quitinase, reticulação de polímeros de parede celular, produção de

proteínas relacionadas à patogênese e resposta hipersensível, morte celular localizada (SUDHA et al., 2002).

Estes metabolitos secundários oferecem uma vantagem de sobrevivência à planta durante o ataque de patógenos, e possuem várias funções, tais como meios de dissuasão de alimentação, compostos alelopáticos e agentes antimicrobianos que podem ser adquiridos ou induzidos (fitoalexinas) (IRITI et al., 2009).

As fitoalexinas são metabolitos secundários induzíveis que possuem atividade antimicrobiana em relação aos fitopatógenos. Abaixo estão citados os principais metabólitos secundários existentes em poaceas e suas vias metabólicas.

Benzoxazinóides são uma classe de metabolitos secundários amplamente distribuídos em cereais, exercendo uma série de papéis biológicos, incluindo alelopatia, resistência a insetos e defesa contra patógenos. São sintetizados a partir do aminoácido triptofano na via chiquimato. Estão presentes no trigo, no entanto, não foram encontrados em variedades cultivadas de aveia, arroz e milhã.

Os terpenos e terpenóides são a maior e mais diversificada classe de metabólitos secundários com mais de 40.000 compostos descritos (MORRONE et al., 2012). Os terpenos são sintetizados a partir da unidade de base de isopreno cinco átomos de carbono (C_5 H_8) pela mevalonato ou via não-mevalonato. A presença de um grande número de compostos terpenóides no arroz tem sido positivamente correlacionada com a redução da infecção por patógenos (PETERS, 2006). Foram identificados quatro diterpenoides, produzidos em folhas de arroz sobre a infecção por *Pyricularia oryzae*, sendo momilactonas A e B, e oryzalexinas A e D, as quais apresentaram atividade antifúngica contra o patógeno. Mais tarde, oryzalexina S e orzyalexina E e F foram descobertos como diterpenoides adicionais com potente atividade antifúngica (KATO et al., 1994). Esse metabólito também é encontrado em aveia e trigo.

Os flavonóides são uma grande classe de metabólitos fenólicos de fitoanticipina e fitoalexina sintetizados a partir de fenilalanina na via xikimato e inclui os flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianidinas, proantocianidinas e chalconas. Desempenham um papel extenso em muitos processos de plantas tais como resistência da planta, defesa, sinalização e simbiose (TREUTTER, 2006). Um número de flavonóides pré-formados (fitoanticipans) pertencentes à classe de anti-anidanidina inibem o crescimento e a germinação de esporos de *P. oryzae* em arroz e trigo.

Glicosídeos cianogênicos estão presentes em mais de 2.600 espécies de plantas e uma série de cereais, incluindo o trigo, cevada, aveia, centeio, sorgo, painço, cana-de-açúcar, milho e arroz (JONES, 1998). Estes compostos são derivados dos aminoácidos valina, leucina, isoleucina, fenilalanina ou tirosina e do aminoácido não-proteína ciclopentenil-glicina biossintetizados via xikimato (NIELSEN et al., 2002). Ocorre na presença se sinais liberados pelo ataque de herbívoros ou patógenos.

As saponinas são uma classe de triterpenos glicosilados; esteroides e alcalóides esteroides sintetizados a partir da via mevalonato ou não mevalonato em plantas, e estão ausentes na maioria das plantas monocotiledóneas e todos os cereais com exceção da aveia. Possuem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, inseticida, ação alelopática. A aveia contém dois tipos de saponinas, quatro avenacinas triterpenoides e dois avenacosídeos esteroides presentes nas raízes e folhas, respectivamente (PRICE et al, 1987). As avenacinas são ativas na sua forma glicosilada natural na planta, em contraste com os avenacosídeos, benzoxazanoides e muitos outros compostos antifúngicos que são ativos apenas nas suas formas aglicona (CROMBIE et al., 1984; INGHAM,1973).

Também existem outras fitoalexinas terpenóides em diversas espécies, como tabaco (*Nicotiana tabacum*), algodão (*Gossypium hirsutum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), etc. Apesar de existir uma grande diversidade de monocotiledóneas, o maior grupo de fitoalexinas terpenoidais de Poaceas ocorre nos gêneros Oryza e Zea (HARBONE, 1999).

Em plantas, os precursores de isoprenóide de difosfato de isopentenilo e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) podem ser derivados do fosfato de mevalonato ou metileritritol. A via do fosfato de metileritritol (MEP) conduz à biossíntese do geranil geranil difosfato e da via de biossíntese diterpenoide (OKADA, 2007). Já a produção de geranil geranil difosfato no arroz provavelmente ocorre nos plastídios pela via do fosfato de metileritritol, enquanto os sesquiterpenos e triterpenos são normalmente sintetizados no citoplasma através da via do mevalonato (VRANOVA et al., 2013).

2.9 CONDIÇÕES AMBIENTAIS X METABÓLITOS

Espécimes das mesmas espécies de plantas que crescem sob diferentes condições ambientais apresentam diferenças significativas na produção e

acumulação de metabólitos primários e secundários (PAVARINI et al., 2012), e isso pode ser encontrado em plantas de uma mesma espécie cultivadas em diferentes condições ambientais.

Influenciados por fatores ambientais, os metabólitos secundários atuam como uma interface química entre a planta e seu ambiente (RAMAKRISHNA et al., 2011).

Essa interação química é mediada principalmente pela biossíntese de metabólitos secundários, que exercem seus papéis biológicos, como uma resposta plástica adaptativa ao seu ambiente. Tal interação química inclui frequentemente variações na produção de metabolitos de plantas (GUTBRODT et al., 2012; SZAKIEL et al., 2010).

Alguns processos podem ser as principais fontes de variação nos níveis de metabolitos para espécies de plantas individuais. Esses processos envolvem aclimatação a longo prazo ou adaptação local, diferenças sazonais relacionadas à fenologia ou mudanças ambientais nos fatores bióticos e abióticos, diferenças geográficas envolvendo diferentes populações (diferenças genéticas dentro de uma espécie vegetal) ou diferentes condições ambientais do local de crescimento da espécie, e até mesmo pela diferença de espécies de seus potenciais predadores ou patógenos presentes no ambiente em que são cultivadas (TELASCREA et al., 2007).

A ocorrência de metabólitos tais como açúcares, sesquiterpenos lactonas e fenólicos nas partes de folhas e caule, podem estar correlacionados com a quantidade de chuvas e mudanças de temperatura. A distribuição dos metabólitos na inflorescência e nas partes radiculares pode ser afetada principalmente pela variação de alguns nutrientes do solo como Ca, Mg, P, K e Cu, e podem estar relacionadas a vários papéis fisiológicos que tais nutrientes desempenham em plantas superiores, uma vez que esses nutrientes são essenciais para o crescimento e funcionamento normal do metabolismo.

O acúmulo de ésteres de derivados do ácido trans-cinâmico nas raízes de solos com níveis mais baixos de macronutrientes pode ser uma resposta à menor disponibilidade de nutrientes, uma vez que os polifenóis ligados aos sesquióxidos têm a capacidade de prevenir a adsorção do fosfato. Além disso, os ácidos fenólicos têm também a capacidade de sorver o fosfato ligado, aumentando assim a disponibilidade de P inorgânico no solo, além do facto de que os compostos fenólicos também podem reter cátions inorgânicos permutáveis (Ca, Mg e K) (JONES et al., 2013)

A abordagem sobre os efeitos dos fatores ambientais sobre o metabolismo de plantas é denominada metabolomia. Para a realização desses estudo podem ser comparados diferentes espécies da mesma família, ou indivíduos de populações da mesma espécie que crescem sob diferentes condições ambientais, ou mudanças na produção de metabólitos de indivíduos dentro da mesma população em diferentes estações (JONES et al., 2013; ARBONA et al., 2013; KIM et al., 2010).

Vários fatores climáticos, como a disponibilidade de água, a temperatura e a radiação solar, são bem descritos como capazes de influenciar a produção de metabólitos (RAMAKRISHNA et al., 2011). Assim, as plantas sob condições de estresse induzidas por fatores climáticos (seca, altas temperaturas, congelamento, ampla amplitude térmica, altos níveis de radiação solar) podem mostrar mudanças na produção de diferentes classes de metabólitos.

Geralmente amostras de folhas e de caule coletadas durante os períodos mais secos são mais ricas em metabólitos secundários, como as lactonas sesquiterpênicas, particularmente nos meses frios, enquanto ocorre aumento na produção de derivados éster de ácido trans-cinâmico durante os meses quentes. Já em amostras coletadas de folhas e caules durante o período de transição entre as estações seca e chuvosa produziram níveis intermediários de metabólitos primários e secundários.

Para inflorescências, a temperatura e a radiação solar também podem influenciar a produção de metabólitos.

O mecanismo envolvido na influência de fatores climáticos no metabolismo pode estar relacionado à indução sazonal de fatores de estresse na planta, tais como:

(I) estresse de seca, que pode causar uma redução da taxa fotossintética com o consequente aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em um aumento na produção de compostos fenólicos (antioxidantes naturais) durante a estação seca como mecanismo de defesa (ARBONA et al., 2013; RAMAKRISHNA et al., 2011; REDDY et al., 2004);

(II) estresse térmico causado por grande variação de temperatura durante o ano, especialmente durante períodos mais secos, que podem afetar a regulação metabólica, a permeabilidade à água e CO_2 e a taxa de reações intracelulares (RAMAKRISHNA et al., 2011; MORISON et al., 1999) bem como melhorar as propriedades antioxidantes com um aumento da disponibilidade de carboidratos (MORISON et al., 1999) ; e

(III) estresse por radiação solar, particularmente radiação UV-B (280-320 nm), que afeta principalmente a produção de compostos fenólicos (taninos, antocianinas, flavonóides e outros derivados de ácidos trans - cinâmicos) que, além de contribuir para a absorção e / ou dissipação da energia solar, proporcionam proteção contra os efeitos deletérios da radiação UV, tais como lesões teciduais induzidas diretamente por UV-B ou formação de radicais livres e outras espécies oxidativas (GRACE et al., 2000; ROZEMA et al., 1997) .

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a virulência de isolados de *Pyricularia oryzae* sobre espécies pertencentes à família *poaceae*, e a inoculação bidirecional de isolados obtidos de lesões dessas espécies sobre *Oryza sativa*, para obter respostas sobre os hospedeiros do patógeno virulento para a cultura do arroz.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Fitossanidade – Fitopatologia, no Departamento de Defesa Fitossanitária, em casa de vegetação e em laboratório, na Clínica Fitossanitária, localizada na Universidade Federal de Santa Maria, Lat. 29º43’05.59’’S e Long. 53º43’00.71’’O, em Santa Maria, RS.

3.1 EXPERIMENTO 1: Virulência de isolados de *P. oryzae* sobre espécies da família *Poaceae*

Esse experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 repetições, em esquema fatorial 15 x 2, sendo o fator A= hospedeiros e fator B= isolados.

3.1.1 Isolados

Para este trabalho, foram utilizados dois isolados de *P. oryzae*. O primeiro isolado (Isolado 1) foi fornecido pela Embrapa Arroz e Feijão, e teve como origem folhas de arroz, cultivar IRGA 424 RI, com lesões de brusone, coletadas em lavouras do Estado de Tocantins, isolado em laboratório e identificado como PY 11.208.

O segundo isolado (Isolado 2), foi obtido de folhas de plantas de arroz, cultivar Guri INTA CL, contendo lesões características de brusone, coletadas em uma lavoura localizada na cidade de Dona Francisca-RS.

No laboratório, em câmara de fluxo laminar, foram coletados fragmentos de tecido foliar a partir de folhas contendo lesões características da doença. Esses fragmentos foram individualmente desinfetados durante 30 segundos por imersão em álcool 70% e em hipoclorito de sódio (NaClO) diluído a 0,5% por 1 minuto, seguido de três lavagens com água destilada estéril. Posteriormente, os fragmentos foram distribuídos em caixas de acrílico do tipo gerbox, contendo no fundo uma folha de papel filtro estéril, saturadas com água destilada e esterilizada (Figura 3A), e incubados em B.O.D., a 28ºC e fotoperíodo de 12 horas, até ocorrer esporulação.

Após 18 horas, foi possível verificar a presença de conídios sobre as lesões foliares (Figura 3B, C e D), que foram coletados e inoculados em placas de Petri com 20 ml de meio de cultura BDA (batata 200 g, dextrose 15 g, ágar 16 g por litro de água) + estreptomicina (0,2 g L^{-1}) para fins de crescimento micelial.

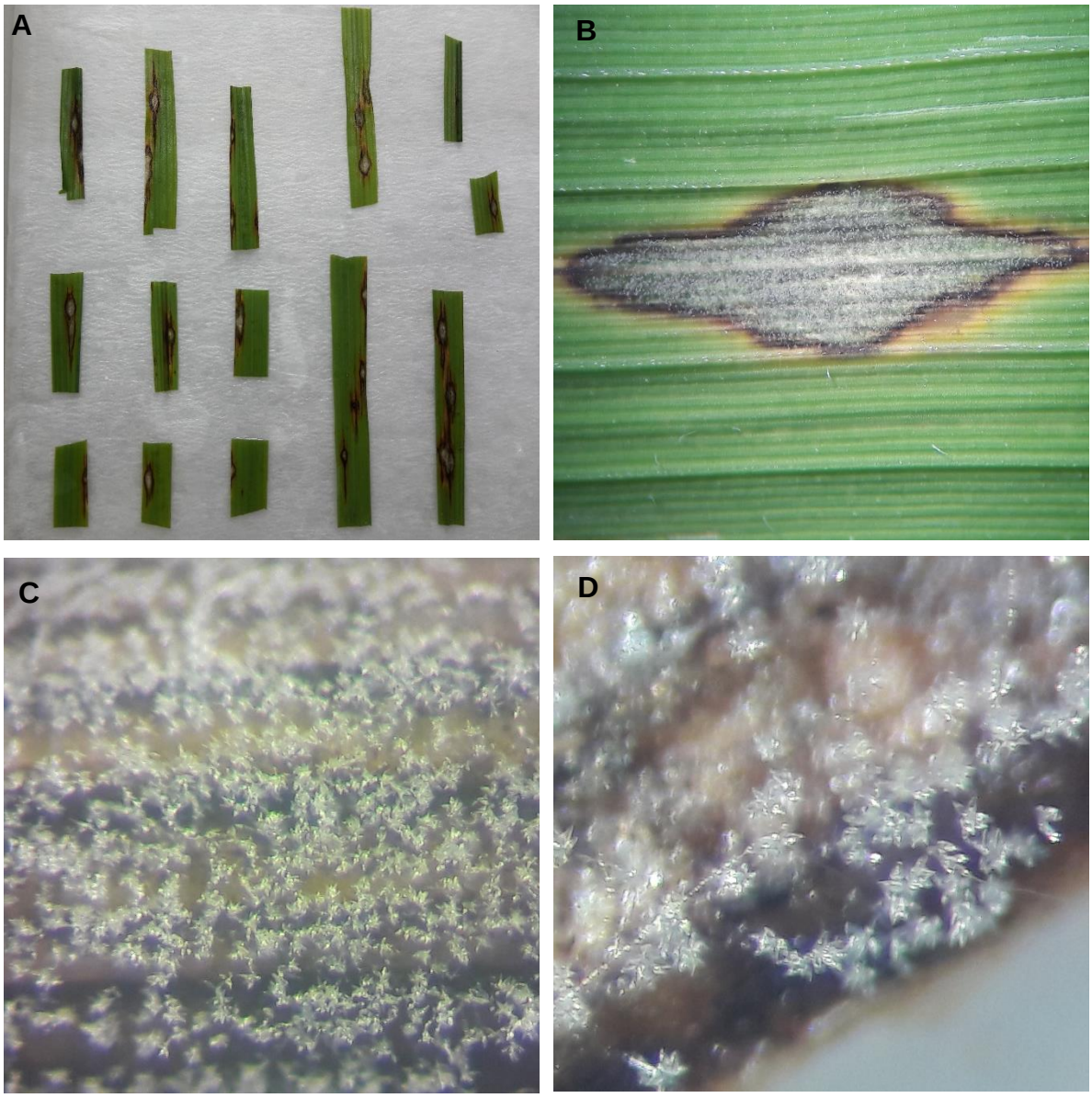


Figura 3. Câmara úmida montada com folhas de arroz cultivar Guri INTA CL contendo lesões típicas de brusone (A); Lesão esporulativa típica de brusone em folha de arroz (B); Lesões de brusone em folhas de arroz com a presença de conidióforos de *P. oryzae* originados após 48h em câmara úmida observadas em microscópio estereoscópico marca Olympus SZ-40 (C e D). Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.

Após o crescimento e esporulação da *P. oryzae*, realizou-se o isolamento para cultivo monospórico conforme metodologia descrita por TAKASI (1970). Para isso, 10

mL de água destilada e esterilizada misturada com solução de Tween 80 (0,1%), foi adicionada no interior de uma placa com crescimento e esporulação de *P. oryzae*, realizando nesse momento uma raspagem superficial com o auxílio de uma alça em L, fixada em um Cabo De Kolle, para desprendimento dos conídios dos conidióforos. Em seguida, realizou-se a filtragem dessa suspensão com auxílio de gaze estéril e a contagem dos conídios em câmara de Neubauer.

Para auxiliar no momento da inoculação da suspensão de conídios nas placas e posterior remoção dos conídios germinados, linhas longitudinais de cor amarela foram marcadas na parte externa do fundo das placas de Petri. A solução foi aspirada com o auxílio de uma micropipeta esterilizada marca Kacil, equipada com ponteira de 1 mL de capacidade (Figura 4A). Em seguida, com as placas a 45º de inclinação, realizou-se a deposição da solução, em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Ágar-água, sendo que o Ágar utilizado na proporção de 1,5%.

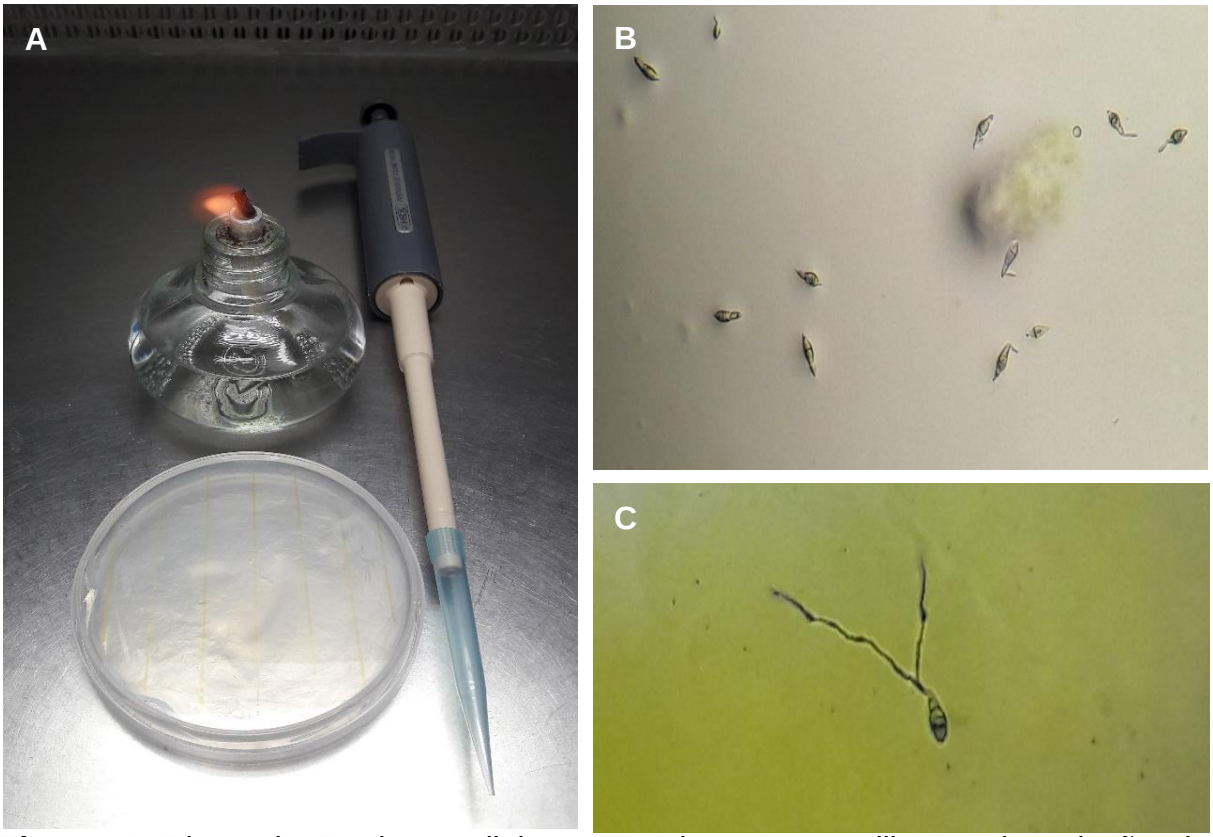


Figura 4. Placa de Petri com linhas amarelas para auxiliar na inoculação da suspensão de conídios sobre meio de cultura ágar-água, com auxílio de micropipeta marca Kacil (A); Conídios iniciando a emissão do tubo germinativo após 6 horas de incubação (B); Conídio após 12 horas de incubação (C). Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.

3.1.2 Preparo da suspensão de conídios

Discos de micélio com 5mm de diâmetro foram cortados e colocados em frascos Erlenmeyer, contendo 100 gramas de trigo esterilizado três vezes para propagação e esporulação do fungo (Figura 5A e B). Os frascos foram fechados e incubados em câmera tipo B.O.D., com temperatura ajustada para 28ºC e fotoperíodo de 12 horas. Após crescimento e esporulação do fungo (+ou-15 dias), adicionou-se água estéril no interior do frasco suficiente para cobrir 2 cm acima das sementes e procedeu-se a agitação manual por 2 minutos para liberação dos conídios. Após a solução foi coada para remoção dos grãos de trigo e filtrada em gaze para retirada de suspenções indesejadas. Por fim, amostras da solução foram obtidas para a contagem de conídios com auxílio da câmaras de Neubauer. A concentração foi ajustada para uma $3x10^5$ conídios.mL^{-1}, conforme metodologia e recomendação descrita por Dias Neto et al. (2010). Antes da inoculação, o equivalente a 1 mL por litro de Tween 80 (0,5%) foi adicionado no interior do frasco com o objetivo de diminuir a tensão superficial da água e possibilitar melhor cobertura foliar da suspensão.

Figura 5. Micélio de *P. oryzae* crescido em grãos de trigo em frasco Erlenmeyer após 10 dias de incubação em B.O.D (A e B). Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.

3.1.3 Cultivo de plantas hospedeiras

Para a realização desse experimento, foram utilizadas 15 hospedeiros pertencentes a seis espécies da família *Poaceae*, sendo eles as cultivares de arroz 'IRGA 424', 'IRGA 424 RI', 'IRGA 425', 'BRS A701 CL', 'Guri INTA CL', 'Puita INTA CL', 'EPAGRI 108' e 'SCS 121 CL', Arroz vermelho, Arroz preto, Capim arroz (*Echinocloa spp.*), Azevém (*Lolium multiflorum*) cultivar 'BRS Ponteio', trigo (*Triticum aestivum*) cultivar 'Toruk', Aveia preta (*Avena strigosa*) cultivar 'Iapar 61' e Aveia branca (*Avena sativa*) cultivar 'URS 21'.

Cada hospedeiro foi cultivado em cinco copos plásticos previamente perfurados, com capacidade de 300 mL, contendo substrato comercial marca Mecplant®. Em cada copo foram semeadas 10 sementes (Figura 6). Cada copo foi identificado com o nome do hospedeiro e isolado inoculado.

Figura 6. Demonstração do método de semeadura realizada no experimento. Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.

Esses copos foram mantidos em bandejas de polipropileno para fins de irrigação por capilaridade (Figura 7A, B e C), em estufa climatizada, com temperatura controlada de 25±2ºC. Aos 20 DAE, para aumentar a predisposição à brusone, realizou-se adubação nitrogenada com quantidade equivalente a 5 g de nitrogênio por m^2 (RIBEIRO; TERRES, 1987) e posterior irrigação por aspersão.

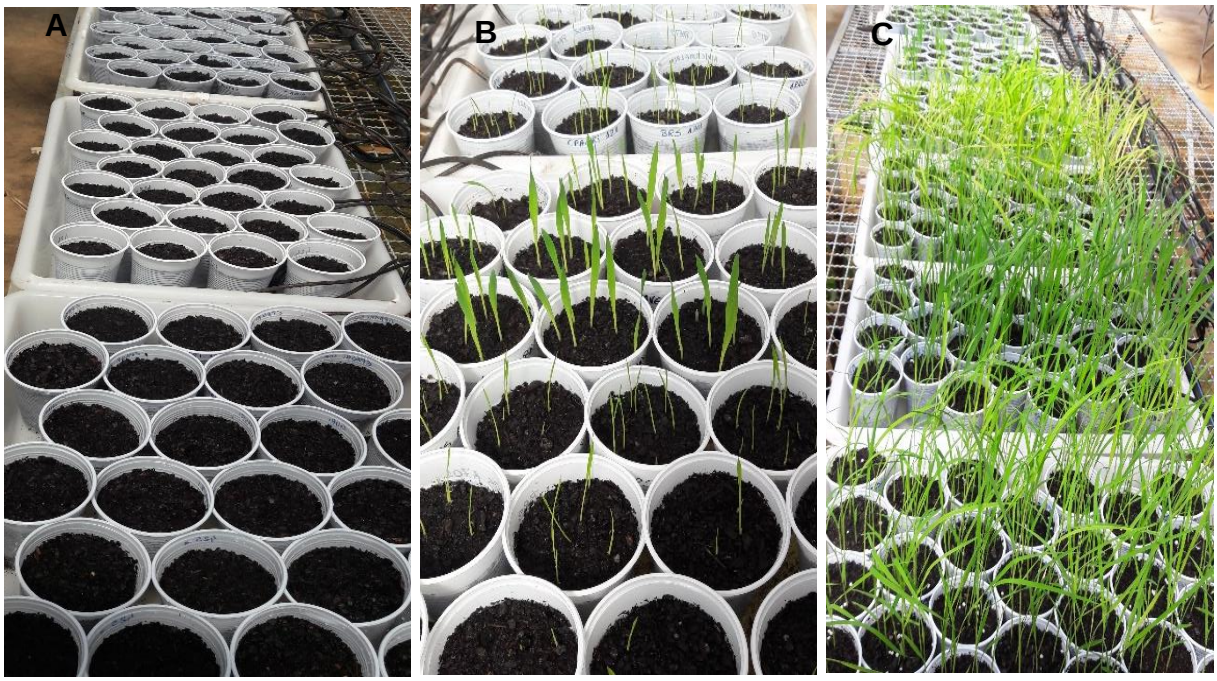


Figura 7. (A) Semeadura dos copos e alocação em bandejas de polipropileno; (B) Registro realizado seis dias após a emergência; (C) registro realizado aos 20 dias após a emergência. Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.

3.1.4 Inoculação dos isolados

Dois dias após receberem a adubação nitrogenada, as plantas foram levadas ao laboratório e acondicionadas em câmera de crescimento, equipada com um umidificador portátil e iluminação artificial com lâmpadas LED, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 28ºC (Figura 8A, B e C).

Após 24 horas sob condição de alta umidade, procedeu-se a inoculação da suspensão de esporos por meio de aspersão sobre as plantas, com aspersor manual (Figura 8D), até o total molhamento da superfície foliar, adaxial e abaxial, e reincubadas por mais dois dias, porém sem a presença de luz.

Esse procedimento foi adotado com o objetivo de realizar a inoculação em um local com menor chance de contaminação e para fornecer as condições ótimas para a ocorrência da doença.

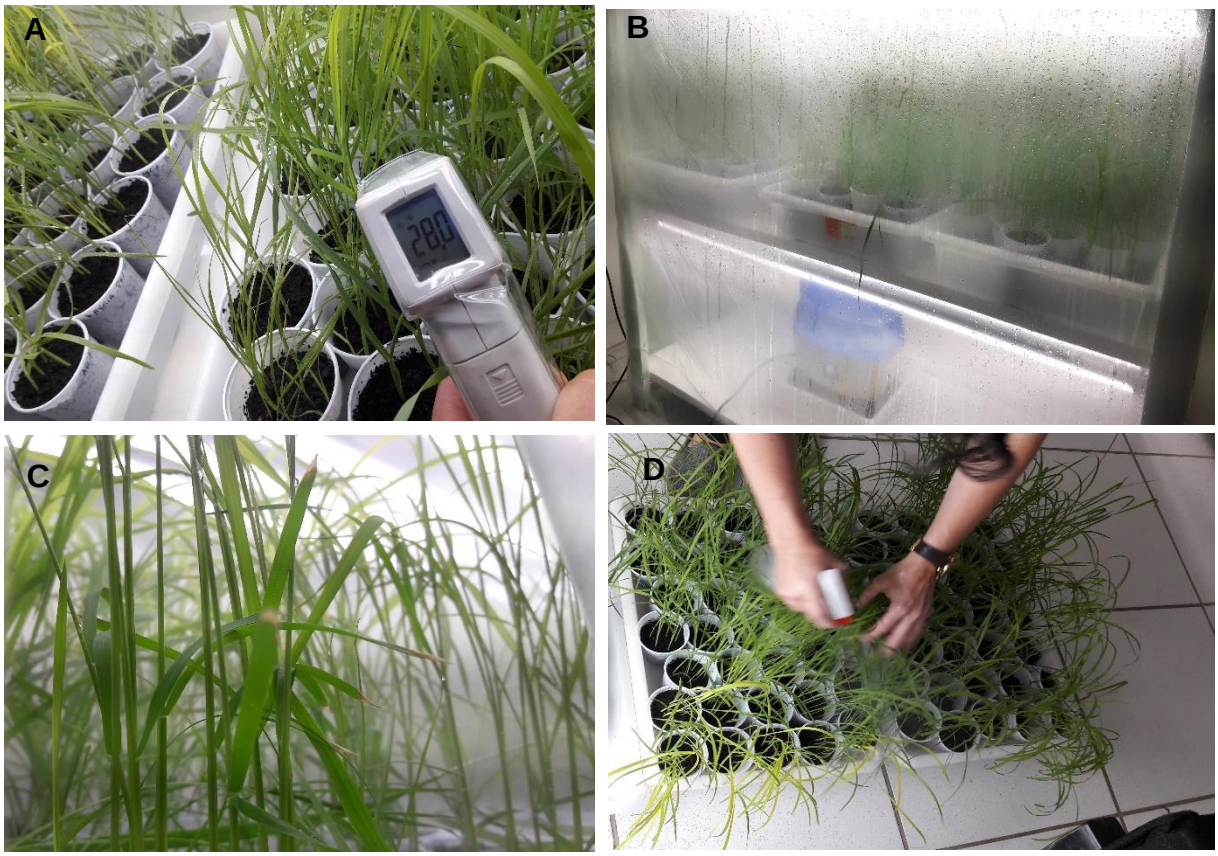


Figura 8. Verificação da temperatura interna da câmera com auxílio de termômetro digital (A); Vista externa da câmera de crescimento montada no laboratório de fitopatologia (B); Condição de alta umidade no interior da câmara de crescimento (C); e Momento da inoculação da suspensão de conídios sobre as plantas hospedeiras (D); Fonte: do autor. Santa Maria, RS, 2019.

Após dois dias, as plantas foram levadas para a casa de vegetação climatizada. A irrigação passou a ser realizada por microaspersores suspensos, acionados automaticamente a cada 1 hora, no período das 8 às 19 hs, por 20 segundos cada irrigação. Assim, foi possível manter maior umidade e molhamento foliar constante, pois segundo Cardoso et al. (2008), a doença ocorre com maior intensidade sob altas temperaturas (25 a 30 ºC) e humidade acima de dez horas de molhamento foliar.

3.1.5 Avaliações

Aos 2, 5, 7, 14, 18, 21 e 28 DAI (dias após inoculação) a severidade da doença foi avaliada a partir do surgimento das lesões foliares, conforme a escala de notas de nove graus proposta pelo IRRI (IRRI, 2013) (Tabela 1), de modo que o conjunto do

tipo, tamanho de lesões e porcentagem de área foliar afetada foram classificadas como resistentes para notas de 0 a 3 e suscetíveis para notas de 4 a 9.

Tabela 1. Escala de notas proposta pelo IRRI (2013) para avaliação da severidade de brusone. Santa Maria, 2019.

ESCALA IRRI (para experimentos de brusone)	
Nota	Observação
0	Nenhuma lesão observada;
1	Pequenas manchas marrons de tamanho de ponta de alfinete ou manchas marrons maiores sem centro de esporulação.
2	Pequenas manchas cinzentas necróticas, arredondadas a ligeiramente alongadas, com cerca de 1-2 mm de diâmetro, com uma margem castanha distinta. As lesões são encontradas principalmente nas folhas inferiores.
3	O tipo de lesão é o mesmo da escala 2, mas há um número significativo de lesões nas folhas superiores.
4	Lesões típicas de brusone com 3 mm ou mais, infectando menos de 4% da área foliar.
5	Lesões infectando 4-10% da área foliar.
6	Infecção por lesões 11-25% da área foliar.
7	Lesões em 26-50% da área foliar.
8	Lesões em 51-75% da área foliar e muitas folhas estão mortas.
9	Mais de 75% da área foliar afetada.

Aos 30 DAI, foi realizada a avaliação para quantificar e comparar a patogenicidade dos isolados sobre os hospedeiros. Para isso, foram contados o número de lesões em 10 folhas escolhidas aleatoriamente em cada unidade experimental. Nessas mesmas folhas, realizou-se também a medição do comprimento das lesões de brusone com auxílio de paquímetro. Os resultados do número de lesões e tamanho de lesões foram submetidos ao teste de comparação de médias Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa estatístico SISVAR® (SILVA; AZEVEDO, 2006).

3.1.6 Resultados e discussões

Após inoculação dos Isolados 1 e 2 sobre os 15 hospedeiros pertencentes à família *Poaceae*, sintomas característicos da doença foram identificados em alguns deles. As avaliações da incidência da doença e o grau de suscetibilidade apresentaram grande variação.

Abaixo, nas Tabela 2 e 3, estão relacionados os hospedeiros e as notas estipuladas conforme a escala de notas proposta pelo IRRI para cada um dos isolados.

Tabela 2. Resultados da avaliação de suscetibilidade dos hospedeiros inoculados com o Isolado 1 conforme a escala de notas proposta pelo IRRI. Santa Maria-RS, 2019.

ISOLADO 1							
HOSPEDEIROS	**Dias Após Inoculação (DAI)**						
	2 DAI	**5DAI**	**7DAI**	**14DAI**	**18DAI**	**21DAI**	**28DAI**
IRGA 424	0	1,28*	2,52	4,08	4,42	5,9	**6,04****
IRGA 424 RI	0	1,72	3,64	4,12	4,52	5,48	**6,22**
IRGA 425	0	1,48	2,56	2,94	3,24	4,26	**5,50**
BRS A701	0	0	0	1,06	1,40	1,74	2,02
Guri INTA CL	0	0	0	0	0	0	0
Puita INTA CL	0	0	0	0	0	0	0
Epagri 108	0	0	0	0	0	0	0
SCS 121 CL	0	0	0	0	0	0	0
Arroz vermelho	0	0	0,78	1,12	1,42	1,66	2,08
Arroz preto	0	0	0,86	1,24	1,98	1,72	2,1
Capim arroz	0	0	0	0	0	0	0
Azevém	0	1,16	2,54	3,92	5,74	7,22	**8,8**
Trigo	0	1,06	1,42	2,26	3,02	3,56	**4,08**
Aveia Preta	0	1,18	1,44	2,60	2,96	3,48	3,92
Aveia branca	0	0	1,10	1,34	1,60	1,86	2,3

*Médias das notas atribuídas em cada avaliação sobre lesões típicas de brusone em 50 folhas (10 folhas de 5 repetições) de cada hospedeiro inoculado. **Números em negrito com média acima de quatro classificam o hospedeiro como suscetível ao Isolado 1 conforme escala de classificação IRRI

Aos 2 DAI não foram observadas lesões visíveis em nenhum hospedeiro inoculado com o Isolado 1. Na segunda avaliação, realizada aos 5 DAI foram identificados os primeiros sinais de lesões foliares em seis hospedeiros. Aos 7 DAI, esse número subiu para nove, porém continuavam classificados como resistentes, com base na escala de notas do IRRI. As médias obtidas aos 14 DAI, classificou as

cultivares ‘IRGA 424’ e ‘IRGA 424 RI’ como suscetíveis ao Isolado 1. Aos 18 DAI o azevém atingiu média que também o classificava nessa categoria. Aos 21 DAI a cultivar ‘IRGA 425’ obteve média de 4,26. As médias obtidas na avaliação realizada aos 28 DAI demonstrou que a cultivar de trigo ‘Toruk’ também foi suscetível ao Isolado 1.

Tabela 3. Resultados da avaliação de suscetibilidade dos hospedeiros inoculados com o Isolado 2 conforme escala de notas proposta pelo IRRI. Santa Maria-RS, 2019.

ISOLADO 2							
HOSPEDEIROS	**Dias Após Inoculação (DAI)**						
	2 DAI	**5DAI**	**7DAI**	**14DAI**	**18DAI**	**21DAI**	**28DAI**
IRGA 424	0*****	1,16	1,96	2,74	3,32	3,86	**4,32****
IRGA 424 RI	0	0	0	0	0	0	0
IRGA 425	0	1,32	1,52	2,28	2,86	3,54	**4,38**
BRS A701	0	0	0,82	1,16	1,46	1,84	2,26
Guri INTA CL	0	1,40	2,24	2,88	4,12	5,82	**7,04**
Puita INTA CL	0	0	1,46	3,34	4,26	4,92	**6,18**
Epagri 108	0	0	0,86	1,28	1,36	1,80	2,06
SCS 121 CL	0	0	1,02	1,40	1,62	1,84	2,12
Arroz vermelho	0	0	0,92	1,36	1,54	1,72	2,08
Arroz preto	0	0	0,86	1,10	1,28	1,58	2,04
Capim arroz	0	0	0	0	0	0	0
Azevém	0	1,26	1,92	3,04	5,08	5,90	**7,10**
Trigo	0	1,10	1,62	2,44	3,10	3,74	**4,42**
Aveia Preta	0	0	1,28	2,36	2,92	3,44	3,90
Aveia branca	0	0,68	1,12	1,46	1,62	1,84	2,02

*Médias das notas atribuídas em cada avaliação sobre lesões típicas de brusone em 50 folhas (10 folhas de 5 repetições) de cada hospedeiro inoculado. **Números em negrito com média acima de quatro classificam o hospedeiro como suscetível ao Isolado 2 conforme escala de classificação IRRI.

Para a avaliação de suscetibilidade ao Isolado 2, seis hospedeiros apresentaram os primeiros sinais de lesões foliares aos 5 DAI. Aos 7 DAI os sintomas foram observados em 13 hospedeiros. Aos 14 DAI esse número permaneceu igual, porém em todas elas, os valores das médias encontradas aumentaram consideravelmente. Aos 18 DAI as cultivares de arroz ‘Guri Inta CL’, ‘Puita INTA CL” e azevém foram classificadas como suscetíveis ao Isolado 2. Aos 21 DAI o número de hospedeiros suscetíveis permaneceu igual. Por fim, aos 28 DAI, as cultivares de arroz “IRGA 424’, ‘IRGA 425’ e trigo também atingiram médias acima de quatro, totalizando 6 hospedeiros suscetíveis ao Isolado 2.

Conforme mencionado por Arruda et al. (2005), a utilização de escalas de resistência, como a utilizada nesse trabalho, é uma importante ferramenta, pois fornece parâmetro mais precisos quando comparado a indicações da incidência ou não da doença.

Na avaliação do número de lesões (Tabela 4), as médias apresentaram diferença estatística significativa entre hospedeiros e entre isolados. Segundo Bergamin Filho e Amorim (1996), a avaliação do número de lesões é uma variável importante e que pode explicar a progressão da doença tanto pelo aumento do número de novas lesões, assim como pelo crescimento das já existentes. Além disso, para Araújo e Prabhu (2004), essa avaliação caracteriza-se como muito precisa.

Tabela 4. Médias das notas da avaliação do número de lesões causadas por isolados de *Pyricularia oryzae* inoculados sobre 15 hospedeiros pertencentes à família *Poaceae*. Santa Maria, RS, 2019.

HOSPEDEIROS	Nº de Lesões	
	Isolado 1	Isolado 2
IRGA 424	6,8 Ag [(1)]	3,24 Bd
IRGA 424 RI	8,12 Ah	0,00 Ba
IRGA 425	6,44 Ag	3,24 Bd
BRS A701	2,8 Ab	2,2 Bc
Guri INTA CL	0,00 Ba	9,2 Ai
Puita INTA CL	0,00 Ba	7,36 Ah
Epagri 108	0,00 Ba	2,16 Ac
SCS 121 CL	0,00 Ba	1,6 Ab
Arroz vermelho	3,96 Ad	3,84 Ae
Arroz preto	3,48 Ac	3,96 Ae
Capim arroz	0,00 Aa	0,00 Aa
Azevém	6,68 Ag	5,60 Bf
Trigo	4,60 Be	5,84 Af
Aveia Preta	5,28 Bf	6,72 Ag
Aveia branca	4,20 Ad	3,44 Bd
Média	3,49	3,89

[(1)] Médias seguidas pela mesma letra na linha (maiúsculas) e na coluna (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade de erro; Letras maiúsculas comparam as médias na linha (comparação da virulência dos diferentes isolados a um mesmo hospedeiro). Letras minúsculas comparam as médias na coluna (comparação da suscetibilidade entre os hospedeiros a um determinado isolado). CV número de lesões (%) = 12,21.

Com base nos resultados, a cultivar de arroz ‘IRGA 424 RI’ apresentou o maior número de lesões para o Isolado 1, porém foi resistente ao Isolado 2 demonstrado pela ausência de lesões.

As cultivares ‘IRGA 424’, ‘IRGA 425’ e azevém não diferiram estatisticamente entre si, mas apresentaram maior número de lesões para o Isolado 1 quando comparadas a plantas inoculadas com o Isolado 2.

As cultivares de arroz ‘Guri INTA CL’, ‘Puita INTA Cl’, ‘Epagri 108’, ‘SCS 121 Cl’ e capim arroz, não apresentaram lesões para isolado 1. Dessa forma, para fins de confirmação dos resultados previamente obtidos, a inoculação do Isolado 1 foi novamente realizada, tanto em hospedeiros resistentes, quanto em hospedeiros suscetíveis. Nessa ocasião, sementes foram obtidas de duas fontes distintas, para descartar a possibilidade de erro na identificação das cultivares.

Os resultados encontrados anteriormente se repetiram, demonstrando a virulência do Isolado 1 sobre a cultivar ‘IRGA 424 RI’ e a avirulência sobre as cultivares ‘Guri INTA CL’, ‘Puita INTA CL’, ‘Epagri 108’ e ‘SCS 121 CL’. As sementes das cultivares ‘Guri INTA CL’ e ‘Puita INTA CL’, ambas classificadas como suscetíveis ao patógeno, foram produzidas no RS. Já as sementes das cultivares ‘Epagri 108’, classificada como suscetível, e ‘SCS 121 Cl’, classificada como médio/resistente, foram produzidas em SC.

De acordo com Chen et al. (1995), isso pode ser explicado devido a diferenciação genética da população de *P. oryzae*, que podem ocorrer de duas formas, sendo geográfica, no local onde foi obtido o isolado, influenciado pelo clima e plantas hospedeiras, e temporal, pelo tempo em que esteve presente e sobre quais plantas teve contato, e ter essa diferenciação atribuída, na maioria das vezes, à seleção feita no hospedeiro.

Assim, isso pode ajudar a justificar os resultados apresentados pelo Isolado 1, que foi obtido de plantas de arroz cultivar “IRGA 424 RI’, em lavoura do Estado de Tocantins. Pressupõe-se que esse seria o principal motivo de ter sido virulento para a mesma cultivar utilizada nesse experimento. Ainda, segundo Santos et al. (2012), existe grande variabilidade na patogenicidade de *P. oryzae* nesse Estado, demonstrado pela identificação de 21 raças fisiológicas entre 119 isolados obtidos de lavouras de arroz de terras altas.

Já a ausência de lesões em cultivares suscetíveis, pode ter sido pela ausência de *gens* de avirulência do Isolado 1, com capacidade de causar lesões nas cultivares sem ser reconhecido pelo hospedeiro, o que ainda corrobora com a teoria de Chen et al. (1995), onde pressupomos que esse Isolado nunca teve contato com tais hospedeiros em que não fora virulento. Segundo Urashima et al. (1999), a obtenção

de resultados como esses, podem ser justificados, principalmente, pela existência de alta variabilidade entre os isolados que compõem a população de *P. oryzae*.

Resultados semelhante foram obtidos para a variável tamanho de lesão (Tabela 5), onde o Isolado 1, mesmo causando lesões em menos hospedeiros, foi o responsável pelo maior tamanho de lesões em folhas de azevém, sendo esse o mais suscetível. Em trabalho realizado por Nunes et al. (2014), ao avaliarem a patogenicidade de isolados de *P. oryzae* sobre cultivares de arroz, os resultados de maior suscetibilidade à doença foram apresentados pelas cultivares com maior grau de resistência para isolados obtidos também de cultivares com maior resistência.

Tabela 5. Médias das notas da avaliação do tamanho de lesões causadas por isolados de *Pyricularia oryzae* inoculados sobre 15 hospedeiros pertencente à família *Poaceae*. Santa Maria, RS, 2019.

HOSPEDEIROS	Tamanho de Lesão (mm)	
	Isolado 1	Isolado 2
IRGA 424	8,9 Ae	4,12 Bd
IRGA 424 RI	10,11 Af	0,00 Ba
IRGA 425	7,00 Ad	4,20 Bd
BRS A701	4,1 Ac	1,73 Bd
Guri INTA CL	0,00 Ba	14,57 Ag
Puita INTA CL	0,00 Ba	11,9 Ae
Epagri 108	0,00 Ba	1,96 Ab
SCS 121 CL	0,00 Ba	1,72 Ab
Arroz vermelho	1,34 Bb	2,07 Ab
Arroz preto	1,47 Bb	2,30 Ab
Capim arroz	0,00 Aa	0,00 Aa
Azevém	16,47 Ag	13,67 Bf
Trigo	1,55 Bb	2,85 Ac
Aveia-preta	1,56 Bb	2,69 Ac
Aveia-branca	1,37 Bb	1,6 Ab
Média	3,59	4,36

(1) Médias seguidas pela mesma letra na linha (maiúsculas) e na coluna (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade de erro; Letras maiúsculas comparam as médias na linha (comparação da virulência dos diferentes isolados a um mesmo hospedeiro). Letras minúsculas comparam as médias na coluna (comparação da suscetibilidade entre hospedeiros a um determinado isolado). CV tamanho de lesões (%) = 10,59.

Em ordem decrescente no tamanho das lesões, o Isolado 1 causou as maiores lesões nas cultivares de arroz ‘IRGA 424 RI’, ‘IRGA 424’, ‘IRGA 425’, ‘BRS A701’, aveia preta, trigo, arroz preto, aveia branca e arroz vermelho.

O isolado 2 foi responsável pelo maior tamanho de lesões na cultivar “Guri INTA CL’, que demonstrou alta suscetibilidade. Quando comparado ao Isolado 1, o Isolado

2 também foi mais virulento para a cultivar “Puita INTA CL’, trigo, aveia preta, arroz preto, arroz vermelho, e cultivares de arroz ‘Epagri 108’ e ‘SCS 121 CL’.

No geral, o Isolado 2 foi virulento para um número maior de hospedeiros quando comparado ao Isolado 1. Esse resultado demonstra a adaptação do Isolado 2 às espécies e cultivares do RS, uma vez que quase todas as sementes foram obtidas de plantas cultivadas no estado.

Porém, essa ausência de lesões sobre a cultivar ‘IRGA 424 RI’ pode estar relacionada a capacidade de virulência específica desse isolado, pois alguns casos já foram relatados sobre a ocorrência de lesões de brusone encontradas em plantas da cultivar ‘IRGA 424 RI’, tanto por produtores do estado, como por órgãos de pesquisa (Informação pessoal), e isso pode ser interpretado como um início de quebra de resistência e presença de raças de *P. oryzae* adaptados à essa cultivar.

Segundo Cruz et al. (2010), isso pode ocorrer porque *P. oryzae,* por ser um fungo filamentoso, apresenta mecanismos de variabilidade genética que lhes conferem fácil adaptação a diferentes ambientes e hospedeiros, e isso pode dar origem a novas espécies, como relatado por Castroagudín et al. (2016), sobre *a Pyricularia graminis-tritici*, que foi altamente agressiva para a aveia-branca (*Avena sativa* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), braquiária (*Urochloa brizantha*) e trigo (*Triticum aestivum* L.)

Ainda, segundo Nunes et al. (2014), por possui essa alta variabilidade genética, raças podem ter suas frequências modificadas de forma gradativa dentro da população que, ao longo do tempo, tornarem-se mais agressivas aos genótipos de arroz irrigado, e pode ser relacionado ao aumento da pressão de seleção sobre *P. oryzae* exercida pelo aumento no tamanho da área plantada com uma cultivar específica.

De acordo com Valent e Chumley (1994), a resistência completa a alguns genótipos de *P. oryzae* é conferida pelos principais genes de resistência do arroz, denominados *genes R*, que agem reconhecendo patógenos portadores de um *gene* de avirulencia (AVR) correspondente. Dessa forma, conforme Böhnert et al. (2004), quando ocorre a mutação ou deleção nos *genes* AVR, permite que o patógeno evite sua detecção pela planta, e cause a infecção, como o ocorrido com o Isolado 1 sobre a cultivar ‘IRGA 424 RI’.

Ainda, a interação entre a resistência do hospedeiro e a virulência do fungo no patossistema da brusone pode ser explicada pela teoria gene-gene: para cada gene

de resistência no hospedeiro, existe um gene de avirulência correspondente no patógeno (FLOR, 1956; SILUE et al., 1992).

Para os demais hospedeiros, algumas observações podem ser feitas e levantam algumas hipóteses, como por exemplo a ausência de virulência de ambos isolados sobre plantas de capim arroz (*Echinochloa* spp.), que segundo Nunes et al. (2014), é uma espécie hospedeira para *Pyricularia oryzae*. O resultado desse trabalho gerou a dúvida se isolados de brusone obtidos de plantas de capim arroz seriam virulentos para plantas de arroz. Em consulta na literatura sobre o assunto, encontrou-se o trabalho realizado por Ribeiro (1981), que, ao inoculador isolados de *P. oryzae* obtidos de plantas de capim arroz, obteve resposta positiva quanto a virulência do fungo sobre plantas de arroz. Porém, o contrário não foi encontrado na literatura pesquisada, ou seja, a fonte de inóculo que causa a doença em capim arroz.

Outro fato recorrente encontrado é a informação de que *Pyricularia grisea* é a responsável pela brusone em azevém (*L. multiflorum*). Em estudos realizados por Couch e Kohn (2002), consideraram *P. oryzae* como responsável pela causa da brusone do arroz e em algumas outras espécies de gramíneas e *Pyricularia grisea* como uma espécie de espectro mais amplo, que ataca outras gramíneas e plantas em outras famílias. Essa dúvida foi sanada quando Kusaba et al. (2006), ao realizar diagnóstico para a identificação de espécies pela amplificação da região do gene da beta-tubulina, identificou que *P. oryzae* ocasiona brusone no azevém.

Como conclusão parcial ao experimento 1, foram observadas variações quanto a patogenicidade de ambos isolados após serem inoculados em espécies pertencentes a família *poaceae.* Isso deve-se principalmente a grande variabilidade genética já comprovada em vários estudos sobre o patógeno e também a aclimatação do isolado quanto a sua origem, pois o isolado 2, obtido do Estado do RS, foi virulento a um número maior de espécies quando comparado ao Isolado 2.

Ainda, foi confirmada a quebra de resistência da cultivar ‘IRGA 424 RI’ quando inoculada com um isolado obtido da mesma cultivar do Estado de Tocantins, demonstrando que já existem patótipos virulentos a essa cultivar, como vem ocorrendo em lavouras brasileiras.

Também podemos identificar que *P. oryzae* é responsável por doenças em uma ampla variedade de hospedeiros, causando preocupação devido a sua agressividade e contribuindo para a permanência do inóculo durante a ausência do cultivo do arroz.

3.2 EXPERIMENTO 2: Avaliação de potenciais hospedeiros de Pyricularia oryzae virulentos para a cultura do arroz.

3.2.1 Etapa 1: Origem dos isolados

Ao concluir o experimento1, foram coletadas folhas dos hospedeiros que apresentaram sintomas característicos de brusone após serem inoculadas com os isolados de *P. oryzae*. Essas amostras foram armazenadas em envelopes de papel pardo, identificados com o nome do hospedeiro e o isolado utilizado, e levadas para o laboratório de fitopatologia.

Após isso, individualmente para cada um dos hospedeiros, foram realizados os procedimentos de assepsia das amostras de tecido foliar com presença de lesões e posteriormente, acondicionadas no interior de caixas do tipo gerbox, sobre folhas de papel germiteste, umedecidas com água destilada. As caixas foram incubadas em câmera do tipo B.O.D., com temperatura ajustada para 28ºC e fotoperíodo de 12 horas. Esse procedimento foi realizado novamente para todas as amostras que não apresentaram esporulações, sendo que, além da metodologia de assepsia, também foi adotado um procedimento utilizando apenas água destilada e esterilizada, com o objetivo de eliminar possíveis interferências ocasionadas pelos produtos químicos.

Seis horas após, foram realizadas inspeções visuais para verificar a presença de esporos com auxílio de microscópio estereoscópico marca Olympus, modelo SZ-40, equipado com lente de aumento de 40X. Esse procedimento foi realizado diariamente, pelo período de 10 dias.

Procedeu-se a coleta dos conídios de todas amostras que apresentaram esporulações, com o auxílio de agulha coletora. Após a coleta, conídios foram depositados em placas de Petri contendo BDA como meio de cultura. Cada placa foi identificada com o nome do hospedeiro de origem e o isolado utilizado na inoculação (Figura 9). Na sequência, as placas foram incubadas em câmera do tipo B.O.D. com temperatura e fotoperíodo controlados, a fim de promover a germinação dos esporos e crescimento micelial.

Em seguida, após a obtenção de culturas puras de cada um dos novos isolados, realizou-se o cultivo em grãos de trigo estéreis, conforme a metodologia já citada no item 3.1.2 do experimento 1.

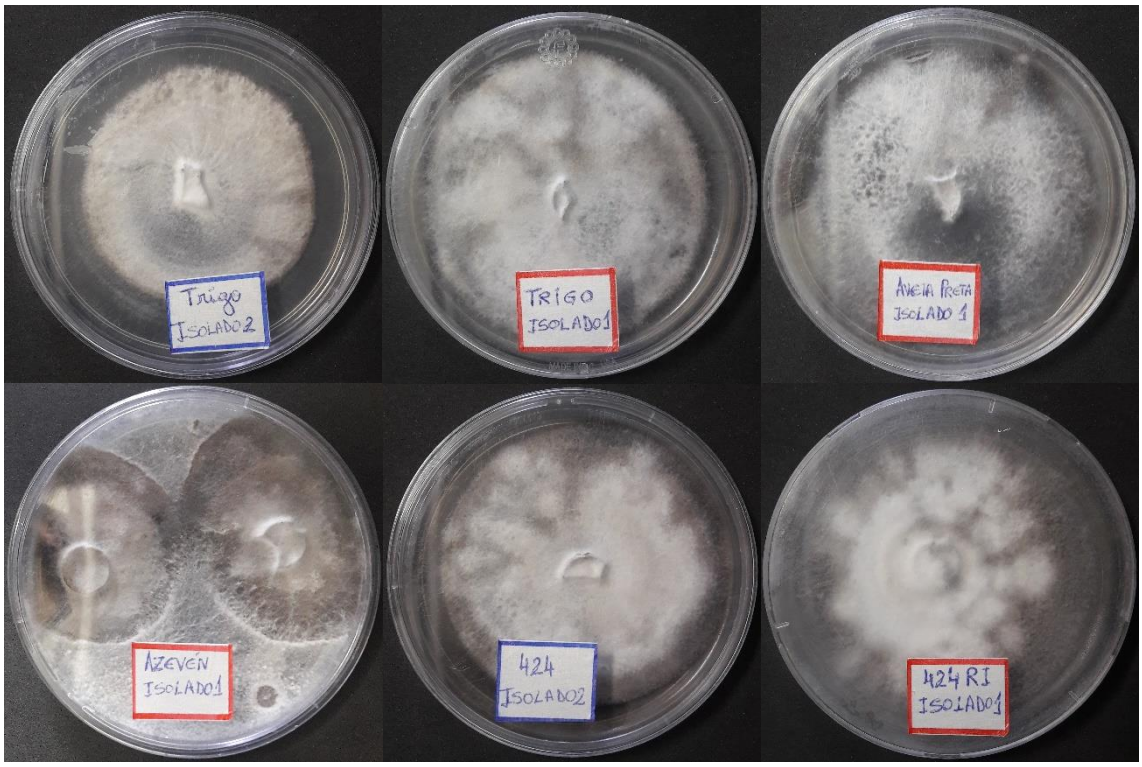


Figura 9. Placas com isolados obtidos de hospedeiros suscetíveis aos Isolados 1 e 2. Fonte: do Autor. Santa Maria, RS. 2019.

3.2.2 Etapa 2: Cultivo das plantas hospedeiras

Foram cultivados os 15 hospedeiros utilizados no experimento 1, seguindo também os mesmos métodos de cultivo. Para cada novo isolado obtido durante a etapa 1 desse experimento, foram cultivados 10 copos de cada hospedeiro, sendo que cinco copos foram utilizados como testemunhas, sem inoculação.

3.2.3 Etapa 3: Inoculação dos isolados

Primeiramente, salienta-se que a condução dessa etapa ocorreu sob as mesmas condições ambientais (temperatura e umidade controlada) para todos os isolados, porém em locais e épocas distintas, visando, principalmente, evitar contaminações e interferência dos resultados.

Para cada novo isolado obtido na Etapa 1, foi realizado a inoculação com suspensão de conídios sobre plantas da mesma espécie da qual o isolado havia sido obtido com o objetivo de testar a viabilidade e virulência dele, e nas demais plantas pertencentes ao gênero *Oryza*.

3.2.4 Etapa 4: Avaliações

Aos 10 DAI de cada isolado, foram avaliadas a incidência de lesões características de brusone nas folhas das cultivares de arroz e, a partir dessa informação, os hospedeiros de origem do isolado foram classificados quanto a sua viabilidade em hospedar *P. oryzae* virulento para o arroz.

Para melhor entendimento das etapas realizadas no Experimento 2, a figura 10 ilustra as fases que foram executadas.

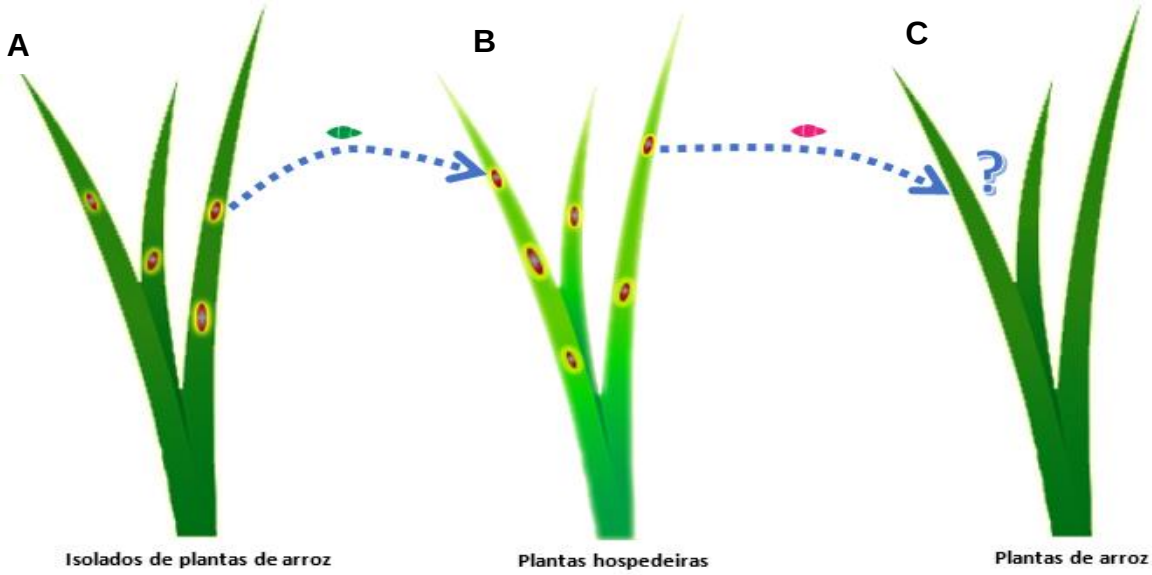


Figura 10. Isolamento de *P. oryzae* obtidos de plantas de arroz (A); Inoculação dos isolados sobre hospedeiros para avaliação quanto à doença e diferença de virulência entre isolados (B) e; Isolamento de *P. oryzae* obtida das lesões manifestadas em hospedeiros e posterior reinoculação em cultivares de arroz, com o objetivo de avaliar a potencialidade do hospedeiro em manter a viabilidade do patógeno (C). Santa Maria, RS, 2019.

3.2.5 Resultados e discussões

Conforme resultados do experimento 1, dez hospedeiros apresentaram lesões foliares para o Isolado 1 e 13 para o Isolado 2.

Como resultados preliminares dessas amostras de tecido com lesões da doença, após serem submetidas ao processo de câmara úmida, houve esporulação em seis das 10 amostras anteriormente inoculadas com o Isolado 1, sendo as cultivares de arroz ‘IRGA 424’, ‘IRGA 424 RI’ e’ IRGA 425’, e as culturas do azevém, trigo e aveia preta.

Os primeiros esporos foram observados após 12 hs nas amostras da cultivar de arroz ‘IRGA 424 RI’, azevém e trigo. Após 24 horas, todas as amostras do Isolado 1 já continham muitos esporos germinados.

Já para as 13 amostras de tecido foliar com lesões cuja origem foi o Isolado 2, após o procedimento de câmara úmida, ocorreu esporulação em sete delas, sendo nas amostras da cultivar de arroz ‘IRGA 424’, ‘IRGA 425’, ‘Guri INTA CL’ e ‘Puita INTA CL’, além do azevém, trigo e aveia preta.

As primeiras constatações foram observadas após 24 horas nas amostras da cultivar ‘Guri INTA CL’, ‘Puita INTA CL’ e azevém. Após 36 horas para trigo e 48 horas para as cultivares ‘IRGA 424’, ‘IRGA 425’ e aveia preta.

Para as demais amostras, mesmo possuindo lesões no tecido foliar, não ocorreram esporulações após 10 dias incubadas em câmera úmida. Para garantir que a assepsia realizada nas amostras não fora o fator responsável pelo resultado negativo, o processo de câmera úmida foi repetido para esses hospedeiros. Para isso, adotou-se dois métodos de assepsia para as novas amostras. O primeiro método consistiu em utilizar o mesmo procedimento realizado anteriormente, utilizando, para isso, álcool 70% e hipoclorito de sódio, e o segundo método foi utilizado apenas água destilada e estéril. Porém, mesmo assim, depois de cinco dias após incubação, não houve esporulação em nenhuma das amostras.

A diferença de tempo até ocorrer a esporulação entre os isolados e entre os hospedeiros, ou a ausência de esporulação não foi influenciado pela umidade ou temperatura, uma vez que ambas amostras estavam nas mesmas condições durante o processo de câmara úmida. Assim, a hipótese dessa causa pode estar relacionada com os isolados e com os hospedeiros. Quanto aos isolados, demonstraram ter diferença na patogenicidade entre eles,

principalmente pelo Isolado 2 causar lesões em um número maior de hospedeiros quando comparado ao Isolado 1. O outro fator pode ter ocorrido pelas diferenças de composição dos compostos celulares dos diferentes hospedeiros, dos quais o patógeno se nutre para poder se desenvolver, e que podem ter influenciado nesse tempo até a esporulação.

Já para as amostras que continham lesões, porém não apresentaram esporulação, podem ter sido influenciadas reações de defesas das plantas que, quando atacadas por patógenos, induzem o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), destacando-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAGBANUA et al., 2007). De acordo com Mehdy et al. (1996), essas ERO agem na morte direta do patógeno e de células do hospedeiro, além de ligações oxidativas cruzadas de proteínas da parede celular, deixando-a mais resistente a degradação por enzimas produzidas pelo patógeno. Assim, permanece o sintoma que tende a se estabilizar ao longo do ciclo da cultura, porém com o patógeno inativo.

Assim, após a conclusão dessa etapa, foram obtidos um total de 13 novos isolados monospóricos.

Para melhor entendimento e identificação, cada novo isolado recebeu nomenclatura conforme o hospedeiro e isolado de origem, sendo ainda que, essa última informação, está na forma abreviada, conforme tabela 6 abaixo relacionada.

Tabela 6. Nomenclatura dos novos isolados obtidos de diferentes hospedeiros, conforme isolado de origem. Santa Maria, RS, 2019.

Isolado de origem	
Isolado 1	**Isolado 2**
424 - Iso1 [1]	424 - Iso2 [3]
424 RI - Iso1	425 - Iso2
425 - Iso1	GURI - Iso2
AZEVÉM - Iso1	PUITA - Iso2
TRIGO - Iso1	AZEVÉM - Iso2
AV. P [2]. - Iso1	TRIGO - Iso2
-	AV. P. - Iso2

[1]Iso1: abreviação do Isolado 1; [2] AV.P.: Aveia Preta; [3] Iso2: abreviação do Isolado 2.

A partir dos novos isolados, procederam-se as inoculações sobre plantas do gênero O*ryzae* e de plantas do mesmo hospedeiro do qual se originou o isolado para os casos de isolados obtidos de azevém, trigo e aveia preta. Por exemplo, para o

isolado obtido do azevém (‘BRS Ponteio’), realizou-se a sua inoculação em todas as cultivares de arroz e sobre plantas de azevém dessa cultivar.

Assim, além de verificar se um isolado obtido de um hospedeiro poderia ser virulento a outro, seria possível também verificar se ele continuaria virulento no hospedeiro de origem.

Na tabela 7, estão relacionados os isolados obtidos de seis hospedeiros anteriormente inoculadas com o Isolado 1 e a resposta quanto a incidência de brusone sobre os demais hospedeiros.

Tabela 7. Resultados da incidência de brusone causada por novos isolados originários do Isolado 1, sobre hospedeiros pertencentes a família *Poaceae*. Santa Maria, RS, 2019.

	Isolados obtidos de hospedeiros inoculadas com o Isolado 1					
HOSPEDEIROS	**424-Iso1**	**424 RI-Iso1**	**425-Iso1**	**AZEVÉM-Iso1**	**TRIGO-Iso1**	**AV. P. -Iso1**
IRGA 424	S	S	S	S	N	S
IRGA 424 RI CL	S	S	S	S	N	S
IRGA 425	S	S	S	S	N	S
BRS A701	S	S	S	S	N	S
Guri INTA CL	N	N	N	N	N	N
Puita INTA CL	N	N	N	N	N	N
Epagri 108	N	N	N	N	N	N
SCS 121 CL	N	N	N	N	N	N
Arroz vermelho	S	S	S	S	N	S
Arroz preto	S	S	S	S	N	S
Azevém	-	-	-	S	-	-
Trigo	-	-	-	-	S	-
Aveia Preta	-	-	-	-	-	S

* S = Presença de lesões; N = Ausência de lesões; **-** = Não foram inoculadas.

Após a análise dos resultados, foi possível observar que cada isolado permaneceu patogênico para o mesmo hospedeiro do qual foi obtido, demonstrando estar ativo quanto a ação patogênica.

Entretanto, o isolado obtido de lesões em folhas de trigo não foram virulentas para outros hospedeiros em que foi inoculado, diferenciando-se dos demais isolados.

Outro fato observado é que o Isolado 1 permaneceu avirulento às cultivares ‘Guri INTA CL’, ‘Puita INTA CL’, ‘Epagri 108’ e ‘SCS 121 CL’, significando que não sofreu interferência do hospedeiro quanto a sua patogenicidade.

Na tabela 8, estão relacionados os isolados obtidos de sete hospedeiros anteriormente inoculadas com o Isolado 2 e a resposta quanto a incidência de brusone sobre diferentes hospedeiros pertencentes a família *Poaceae*.

Tabela 8. Resultados da incidência de brusone causada por novos isolados originários do Isolado 2, sobre hospedeiros pertencentes a família *Poaceae*. Santa Maria, RS, 2019.

Isolados originados de hospedeiros inoculadas com o Isolado 2							
HOSPEDEIROS	**424-Iso2**	**425-Iso2**	**GURI-Iso2**	**PUITA-Iso2**	**AZEVÉM-Iso2**	**TRIGO-Iso2**	**AV. P. -Iso2**
IRGA 424	S*	S	S	S	S	N	S
IRGA 424 RI CL	N	N	N	N	N	N	N
IRGA 425	S	S	S	S	S	N	S
BRS A701	S	S	S	S	S	N	S
Guri INTA CL	S	S	S	S	S	N	S
Puita INTA CL	S	S	S	S	S	N	S
Epagri 108	S	S	S	S	S	N	S
SCS 121 CL	S	S	S	S	S	N	S
Arroz vermelho	S	S	S	S	S	N	S
Arroz preto	S	S	S	S	S	N	S
Azevém	-	-	-	-	S	-	-
Trigo	-	-	-	-	-	S	-
Aveia Preta	-	-	-	-	-	-	S

*S = Presença de lesões; N = Ausência de lesões; **-** = Não foram inoculadas.

Ao observar os resultados apresentados na tabela 8, é possível ver que todos os isolados continuaram patogênicos para plantas semelhantes das quais foram obtidos.

Outro fato observado foi que, isolados obtidos de plantas de arroz (Isolado 1 e 2), mesmo após serem inoculados e reisolados de outras hospedeiros, continuaram virulentos para o arroz, com exceção dos isolados obtidos de plantas de trigo, que foram patogênicos apenas para o trigo.

Umas das hipóteses levantadas é que quando genes AVR estão associados a patógenos vindos de outros hospedeiros, podem ser reconhecidos pelos genes R de plantas de arroz, impedindo o estabelecimento da doença (FARMAN et al., 2002).

Para sanar essa dúvida e descobrir o que influenciou na perda de virulência de ambos isolados sobre o arroz, será necessário o sequenciamento genético da região ITS e amplificação dos genes rDNA (KLAUBAUF et al., 2014) dos isolados 1 e 2, e dos isolados Trigo-Iso1 e Trigo-Iso 2 e comparar se houveram modificações. Com o

objetivo de se obter essa resposta, discos de micélio desses isolados encontram-se armazenado em microtubos tipo Eppendorf contendo água destilada conforme método de Castellani (1939), que serão utilizados em estudos futuros.

Em contrapartida, o isolado obtido da aveia preta e do azevém foram virulentos para todas as cultivares de arroz, demonstrando serem potencias hospedeiro para *P. oryzae*.

Em trabalho realizado por Danelli et al. (2017), a severidade de brusone foi acima de 40% sobre as plântulas de aveia preta após serem inoculadas com um isolado de *P. oryzae*. Ainda, nesse mesmo estudo, as cultivares ‘Iapar 61’ (aveia preta) e ‘URS 21’ (aveia branca) foram as mais suscetíveis.

Resultados obtidos por Urashima e Silva (2011), demonstraram que isolados de *P. oryzae*, obtidos de aveia preta, foram virulentos para as culturas do arroz, trigo, triticale, sorgo e cevada.

Sobre os resultados apresentados por ambos isolados do azevém, também nos trazem preocupações, pois além de ser um hospedeiro da doença, mesmo sendo uma planta alógama e, por isso, possuir maior resistência horizontal, demonstrou alta suscetibilidade à doença e uma ótima fonte de inóculo virulento para a cultura do arroz.

Corroborando com os resultados aqui encontrados, em trabalho realizado por Nunes et al. (2017), ao testarem a resistência de sete isolados de *P. oryzae* sobre sete cultivares de azevém, encontraram diferença na variabilidade quanto à reação de resistência com os diferentes isolados de *Pyricularia*, mesmo sendo todas suscetíveis, apresentaram variabilidade em patogenicidade sobre os genótipos de azevém.

De acordo com a literatura, relatos de ocorrência de brusone em azevém datam o ano de 1972 nos Estados Unidos (KUSABA et al., 2006), 2001 no Brasil, mais precisamente no Estado do Rio Grande do Sul (Nunes et al., 2001), em 2015 na China (LIU et al., 2018) e em 2017 na França (MILAZZO et al., 2017). Baseado nessas informações, é observada uma expansão da brusone sobre essa espécie, o que torna preocupante para a agricultura mundial, pois além de ser um hospedeiro, poderá ser fonte de inóculo para as demais espécies suscetíveis, como relatado por Farman et al. (2017), sobre a suspeita de um patótipo de *P. oryzae* que evoluiu de plantas de azevém possa ser o causador da brusone do trigo nos Estados Unidos.

Ao realizar esse estudo, foi possível detectar a maior agressividade dos isolados obtidos de plantas de azevém quando comparado aos demais. Isso foi

possível porque a verificação dos sintomas foi realizada diariamente e foram constatadas diferenças entre isolados, sendo que todos originados do Isolados 1, apresentaram sintomas em menor período após serem inoculados.

Abaixo, nas tabelas 9 e 10, estão relacionados os isolados quanto a sua origem e o período latente até serem observados sintomas sobre os hospedeiros

Tabela 9. Período latente até serem observados sintomas causados por isolados originados do **Isolado 1** sobre poaceas. Santa Maria, RS, 2019.

	Isolados obtidos de hospedeiros inoculadas com o Isolado 1					
HOSPEDEIROS	**424-Iso1**	**424 RI-Iso1**	**425-Iso1**	**AZEVÉM-Iso1**	**TRIGO-Iso1**	**AV. P. -Iso1**
IRGA 424	5	4	4	4	-	4
IRGA 424 RI CL	4	4	4	3	-	3
IRGA 425	5	4	4	4	-	4
BRS A701	5	5	4	5	-	5
Arroz vermelho	5	5	5	4	-	4
Arroz preto	6	5	5	4	-	4
Azevém	-	-	-	3	-	-
Trigo	-	-	-	-	5	-
Aveia Preta	-	-	-	-	-	3
Médias de dias	5,0	4,5	4,3	3,8	5,0	3,9

Tabela 10. Período latente até serem observados sintomas causados por isolados originados do **Isolado 2** sobre poaceas. Santa Maria, RS, 2019.

	Isolados originados de hospedeiros inoculadas com o Isolado 2						
HOSPEDEIROS	**424-Iso2**	**425-Iso2**	**GURI-Iso2**	**PUITA-Iso2**	**AZEVÉM-Iso2**	**TRIGO-Iso2**	**AV. P. -Iso2**
IRGA 424	7	7	6	6	5	**-**	7
IRGA 425	7	7	6	6	5	**-**	6
BRS A701	9	8	7	7	6	**-**	7
Guri INTA CL	8	7	5	6	5	**-**	6
Puita INTA CL	8	7	6	6	5	**-**	6
Epagri 108	8	8	7	7	6	**-**	6
SCS 121 CL	8	8	7	7	6	**-**	6
Arroz vermelho	9	8	7	8	6	**-**	7
Arroz preto	9	8	7	8	6	**-**	7
Azevém	**-**	**-**	**-**	**-**	5	**-**	**-**
Trigo	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	6	**-**
Aveia Preta	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	6
Médias de dias	8,1	7,6	6,4	6,8	5,5	6,0	6,4

Para os isolados AV. P-Iso1 e AV. P-Iso2, o período de latência até surgirem os primeiros sintomas, foram de 3,9 e 6,4 dias, respectivamente.

Já para os isolados obtido da cultura do azevém, esse período foi, em média, de 3,8 dias para o isolado AZEVÉM-Iso1 e 5,5 dias para o AZEVÉM-Iso2.

Os resultados encontrados nesse trabalho também permitem realizar observações e levantar alguns questionamentos, como por exemplo a origem ou fonte de inóculo que causa a doença em capim arroz (*Echinochloa* spp.), pois demonstrou ser resistente para ambos isolados testados, e que, segundo Nunes et al. (2014), é uma planta hospedeira de *P. oryzae* e ainda, segundo Ribeiro (1981), ao inocular isolados de *P. oryzae* obtidos de plantas de capim arroz, obteve resposta positiva quanto a virulência do fungo sobre plantas de arroz.

Porém, não foram encontrados estudos onde isolados de *P. oryzae* foram inoculados sobre capim arroz e, posteriormente, após manifestação da doença e reisolamento e reinoculação sobre o arroz, analisado os resultados sobre essa inoculação cruzada, como realizado no presente estudo.

Ainda, segundo Marangoni et al. (2013), a rotação de culturas de inverno se torna mais limitada devido a suscetibilidade das cultivares de *Avena spp*. à brusone, pois por ser um hospedeiro da doença, contribui no incremento de inóculo na atmosfera. Segundo Santos et al. (2018), existe uma grande preocupação quanto a isso, pois é a espécie mais usada como cobertura do solo e produção de palhada na Região Sul do Brasil é a aveia preta.

Em conclusão ao experimento 2, conforme os resultados obtidos, foi observado que a maioria dos hospedeiros inoculados com os Isolados 1 e 2, mantiveram a viabilidade do patógeno demonstrado pelos resultados obtidos após reinoculação sobre hospedeiros pertencentes a família das poaceas, com exceção do trigo. A partir disso, pode-se afirmar também que o trigo não é uma planta hospedeira para *P. oryzae* virulenta ao arroz.

Também, podemos identificar que as culturas da aveia preta e do azevém são potenciais hospedeiros e fontes de inóculo virulento ao arroz, fato que preocupa a produção de arroz no RS, pois ambas espécies são cultivadas em praticamente todo o Estado durante o período de entre safra do arroz, tanto na formação de pastagens, quanto para cobertura do solo.

Desse modo, a relação da brusone com a cultura do arroz demanda de maior conhecimento, principalmente sobre os fatores que atuam na sua patogenicidade, uma vez que o desenvolvimento de novos métodos de controle, assim como cultivares mais resistentes, necessitam de mais respostas e conhecimento para que possam ser desenvolvidos.

4 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos no presente trabalho, nas condições em que foi realizado, permitem concluir que:

- A patogenicidade de ambos isolados de *P. oryzae* diferiram para a maioria dos hospedeiros em que foram inoculados;

- Foi identificada a perda de patogenicidade dos isolados após serem reisolados do trigo;

- O trigo não é um hospedeiro para *P. oryzae* virulento ao arroz;

- A aveia preta demonstrou ser é um importante hospedeiro viável para a *P. oryzae*;

- O azevém constituiu ser um ótimo hospedeiro para a doença e fonte de inóculo virulento ao arroz;

- A relação do patossistema arroz-brusone necessita ser mais estudado, uma vez que a evolução do patógeno é constante e está demonstrando ser cada vez mais agressivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L.; PRABHU, A. S. Resistência parcial à brusone em somaclones da cultivar de arroz CICA-8. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 394-398, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582004000400006& script =sciabstract&tlng=es>. Acesso em: 20 jan. 2019.

ARBONA, V. et al. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **Int. J. Mol. Sci**. 14, 4885–4911, 2013. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23455464 >. Acesso em: 10 fev. 2019.

ARRUDA M.A. et al. Reação do trigo a Magnaporthe grisea nos diferentes estádios de desenvolvimento. **Fitopatologia Brasileira**. 30:121-126, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582005000200003&script=sci_abstrac t&tlng=es>. Acesso em: 21 jan. 2019.

ASSIS, R. L.; LANÇAS, K. P. Agregação de um Nitossolo Vermelho Distroférrico sob sistemas de plantio direto, preparo convencional e mata nativa. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 1, p. 58-66, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/eagri/v30n1/ a06v30n1.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BADYAEV, A.V. Stress-induced variation in evolution: from behavioral plasticity to genetic assimilation. **Proc R Soc** B 272: 877–886, 2005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024341>. Acesso em: 10 fev. 2019.

BARKSDALE, T.H.; ASAI, G.N. Diurnal spore release of *Pyricularia oryzae* from rice leaves. **Phytopathology** 51:313-317, 1961.

BEDENDO, I. P.; PRABHU, A. S. Doenças do arroz. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** São Paulo: Ceres, cap. 12, p. 79-90, 2005.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico**. Ceres, São Paulo, 1996

BÖHNERT, H. U. et al. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. **Plant Cell** 16: 2499–2513, 2004. Disponível em: <http://www.plantcell.org/content/16/9/ 2499>. Acesso em: 24 nov. 2018.

BORTOLOTTO, R. P. et al. Teor de proteína e qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.2, p.513-518, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052008000200028&lng= en>. Acesso em: 24 nov. 2018.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Baltimore, v.24, p.270-276. 1939.

CASTROAGUDÍN, V.L., et al. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. **Persoonia,** vol. 37, p. 199-216. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3767/003158516X692149>. Acesso em: 03 jan. 2019.

CHAVEZ, A. KOHLI, M. Hospedeiros alternativos de Magnaporthe grisea del trigo Paraguay. **Investigación Agraria**, vol. 17, n. 1, p. 54-59, 2015.

CHEN, D. et al. Population structure of *Pyricularia oryzae* at two screening sites in the Philippines. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 9, p. 1011-1020, 1995.

CHUMLEY, F. G., VALENT, B. Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 3, 135–143. 1990.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, V.6 - Safra 2018/19 - Quinto levantamento, Brasília, p. 1-116. Fevereiro 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 12 fev. 2019.

COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science.** 63:524- 554, 2007. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1378/abstract>. Acesso em: 12 jan. 2019.

COUCH, B.C., KOHN, L.M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia** 94:683–93, 2002. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156541>. Acesso em: 12 fev. 2019.

CROMBIE, L.; CROMBIE, W.M.L.; WHITING, D.A. Structures of the four avenacins, oat root resistance factors to ‘take-all’ disease. **J. Chem. Soci. Chem. Commun.** 4: 246–248, 1984.Disponível em: < DOI:10.1039/p19860001917>. Acesso em: 17 jan. 2019.

CRUZ, M.F., et al. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical Plant Pathology**, vol. 35, n. 1, p. 24-31. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000100004>. Acesso em: 15 jan. 2019.

CUCU, M.A. et al. Influence of redox conditions and rice straw incorporation on nitrogen availability in fertilized paddy soils. **Biology and Fertility of Soils**. 2014. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400104353>. Acesso em: 5 fev. 2019.

DANELLI, A.L.D. et al. Relationship between blast severity on seedlings and panicles of Brazilian oat cultivars. **Ciência Rural**, vol. 47, n. 12, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160922>. Acesso em: 10 fev. 2019.

DEAN, R.A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea.* **Nature** 434:980–86, 2005. Disponível em: <https://www.naturecom/articles/nature03449>. Acesso em: 10 fev. 2019.

de JONG, J.C. et al. Glycerol generates turgor in rice blast. **Nature.** 389, 471–483, 1997. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/38418>. Acesso em: 06 jan. 2019.

DI TULLIO, E.; BALDI, S. La diffusione dei diversi sistemi di difesa dal brusone nella risicoltura italiana. In AGRA (Ed.), **Il ruolo economico del triciclazolo nella risicoltura italiana**. 2011. Disponível em: <http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_0934/0901b80380 9349b6.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2019.

DIAS NETO, J. J. et al. Identificação de raças fisiológicas de *Pyricularia grisea* em arroz no Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 186, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/tpp/v34n3/v34n3a09.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2019.

DIAS NETO, J. J. et al. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, p. 173-179, 2010. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/7048/4674>. Acesso em: 2 jan. 2019.

EBBOLE, D. J. *Magnaporthe* as a model for understanding host–pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**. 45, 437–456, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094346>. Acesso em: 13 fev. 2019.

FARMAN, M. L. et al. Analysis of the structure of the AVR1–CO39 avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. Mol. **Plant Microbe Interact**. 15: 6–16, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11843304>. Acesso em: 12 dez. 2018.

FISHER, M.C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**. 484:186–194, 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22498624. Acesso em: 19 dez. 2018.

FLOR, H.H. The complementary genetic systems in flax and flax rust. **Adv. Genet**. 8: 29–54, 1956. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/piiS0065266008604988>. Acesso em: 8 fev. 2019

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. FAO Rice is life.** Italy: FAO, 2004.Disponível em: <http://www.fao.org/newsroom/en/focus/2004/36887/>. Acesso em: 05 de dez. 2018.

FRAC - FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. **List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides.** 2012. Disponível em: < http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-(updated-2012).pdf?sfvrsn=4>. Acesso em: 08 jan. 2017.

FREITAS, J.G. et al. Adubação nitrogenada e incidência de brusone em arroz de sequeiro. **Bragantia, Campinas,** v.69, n.1, p.173-179, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052010000100022. Acesso em: 20 fev. 2017.

GALHARDO, R.S.; HASTINGS, P.J.; ROSENBERG, S.M. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 42: 399–435,

2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917874>. Acesso em: 19 fev. 2018.

GIANINETTI, A.; VERNIERI, P. On the role of abscisic acid in seed dormancy of red rice. **J Exp Biol.** 58: 3449–3462, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17898421>. Acesso em: 19 fev. 2018.

GLADIEUX, P. et al. Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. **Mol Ecol** 23: 753–773, 2014 Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24341913>. Acesso em: 18 fev. 2018.

GOMES, J.B.V. et al. Análise de componentes principais de atributos físicos, químicos e mineralógicos de solo do bioma cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v.28, p.37-153, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v28n1/a14v28n1.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2017.

GRACE, S.C.; LOGAN, B.A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.** B. Biol. Sci. 355, 1499–1510, 2000. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1692864/. Acesso em: 17 fev. 2018.

GUTBRODT, B. et al. Species-specific responses of herbivores to within-plant and environmentally mediated between-plant variability in plant chemistry. **Chemoecology** 22, 101–111, 2012. Disponível em: < http://link.springer.com/article/10.1007/s00049-012-0102-1>. Acesso em: 17 fev. 2017.

HAMER, J. E. et al. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science** 239, 288–290, 1988. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17769992>. Acesso em: 15 jun. 2018.

HARBONE, J.B. The comparative biochemistry of phytoalexins induction in plants. **Biochemistry Systematics and Ecology,** v.27, p.335-367, 1999. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197898000957>. Acesso em: 17 mar. 2018.

HARMON, P.F.; LATIN, R. Winter survival of the perennial ryegrass pathogen *Magnaporthe oryzae* in North Central Indiana. **Plant Disease** 89, 412-418, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0412>. Acesso em: 19 fev. 2017.

HOFFMANN, A.A.; SGRO, C.M. Climate change and evolutionary adaptation. **Nature** 470: 479–485, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21350480>. Acesso em: 19 fev. 2017.

INGHAM, J.L. Disease resistance in higher plants the concept of pre-infectional and post-infectional resistance. **J. Phytopathol,** 78:314–335, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1973.tb04182.x>. Acesso em: 15 fev. 2017.

IRITI, M., FAORO, F. Chemical diversity and defence metabolism: How plants cope with pathogens and ozone pollution. **Int. J. Mol. Sci,**10:3371–3399, 2009. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111684>. Acesso em:

JONES, O.A.H. et al. Metabolomics and its use in ecology. **Austral Ecol.** 38, 713–720, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aec.12019/abstract >. Acesso em: 17 fev. 2017.

JONES, D.A. Why are so many food plants cyanogenic? **Phytochemistry.** 1998; 47:155–162. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942297004251>. Acesso em: 15 fev. 2017.

KANKANALA, P., CZYMMEK, K., VALENT, B. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. **Plant Cell** 19, 706–724, 2007. Disponível em: <http://www.plantcell.org/content/19/2/706>. Acesso em: 15 jan. 2019.

KATO, H., KODAMA, O., AKATSUKA, T. Oryzalexin F, a diterpene phytoalexin from UV-irradiated rice leaves. **Phytochemistry.** 36: 299–301, 1994.

KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nat. Protoc.** 5, 536–549, 2010. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203669 >. Acesso em: 17 fev. 2017.

KIM, S. et al. Homeobox transcription factors are required for conidiation and appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae.* **PLoS Genet** 5, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 19997500. Acesso em: 19 fev. 2017.

KLAUBAUF, S. et al. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). **Studies in Mycology**. Vol. 79, 85-120, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.004>. Acesso em: 13 fev. 2019.

KOHLI, M. M. et al. *Pyricularia* blast - a threat to wheat cultivation. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, Praga, v. 47, p. S130-S134, 2011. Special Issue. Disponível em: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/48968.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2017.

KUNOVA, A. et al. Sensitivity of nonexposed and exposed populations of *Magnaporthe oryzae* from rice to tricyclazole and azoxystrobin. **Plant Disease.** 98: 512-518, 2014. Disponível em: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-04-13-0432-RE>. Acesso em: 05 jan. 2017.

KUSABA, M., et al. Molecule genetic characterzation and host specificity of *Pyricularia* isolates from annual ryegrass in Japan. **Plant Pathology Journal**, v. 51, n. 1, p. 72-79, 2006. Disponível em: <https://scialert.net/fulltext/?doi=ppj.2006.72.79>. Acesso em: 07 jan. 2017.

LIU, T. et al. First Report of Gray Leaf Spot (*Pyricularia oryzae*) on Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum)* in China. **Plant Disease**, Vol. 102, Number 8, 2018. Disponível em: < https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1700-PDN>. Acesso em: 13 Fev. 2019.

LIU, W., et al. Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. **PLoS Pathogens**. 2011. Disponível em: < https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001261>. Acesso em: 25 jan. 2019.

LOBO, V. L. et al. Perfil sanitário e fisiológico de sementes de arroz provenientes de ensaios de valor de cultivo e uso em três locais. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2006. 4p. (**Comunicado técnico** – 129, 1ª ed.). Disponível em: < https://core.ac.uk/display/15426506>. Acesso em: 05 jan. 2017.

MA, B.; UDDIN, W.; OLAYA, G. Baseline and non-baseline sensitivity of *Magnaporthe oryzae* isolates from perennial ryegrass to azoxystrobin in the northeastern United States. **Canadian Journal of Plant Pathology,** Canada, v.31, p. 57-64, 2009. DOI: 10.1080/07060660909507572

MACIEL, J. L. N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **CABI Reviews - Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Oxfordshire, v. 6, n. 50, p. 1-8, 2011. DOI: 10,1079/PAVSNNR 20116050

MAGBANUA, Z.V. et al. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? **Mol. Plant Microbe Interact**. 20:697-706, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555277>. Acesso em: 15 dez. 2018.

MARANGONI, M. S. et al. *Pyricularia* blast on white oats: a new threat to wheat cultivation. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 3, p.198-202, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-5676 2013000300003>. Acesso em: 11 dez. 2018.

MARTINS, J. D. S. et al. Situação do manejo integrado de insetos-praga na cultura do arroz no Brasil. Embrapa Clima Temperado - **Documentos (INFOTECA-E),** 40p., 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/783492>. Acesso em: 10 dez. 2018.

MCDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. **Annu Rev Phytopathol** 40: 349–379, 2002. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147764>. Acesso em: 19 fev. 2017.

MCGHEE, G. C.; SUNDIN, G.W. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in Erwinia amylovora. **Phytopathology**, v. 101, n. 2, p. 192-204, 2011. Disponível em: <http://aps journals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-04-10-0128>. Acesso em: 05 jan. 2017.

MEHDY, M. et al. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiol. Plant.** 98:365-374, 1996. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley. com/doi/pdf/10.1034/j.1399-3054.1996.980219.x>. Acesso em: 05 jan. 2019.

MILAZZO, J. et al. First scientific report of *Pyricularia oryzae* causing gray leaf spot disease on perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in France**. Plant Disease**, Vol. 101, Number 6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1700-PDN>. Acesso em: 13 fev. 2019.

MIURA, H. et al. Mode of occurrence of kasugamycin resistant rice blast fungus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 42, p. 117-123, 1976.

MONACO, F.; SALI, G. How water amounts and management options drive Irrigation Water Productivity of rice. A multivariate analysis based on field experiment data. **Agricultural Water Management**, v. 195, p. 47-57, 2018.

MORISON, J.I.L.; LAWLOR, D.W. Interactions between increasing CO^2 concentration and temperature on plant growth. **Plant, Cell Environ.** 22, 659–682, 1999. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3040.1999.00443.x/full>. Acesso em: 17 fev. 2018.

MORRONE, D. et al. Evident and latent plasticity across the rice diterpene synthase family with potential implications for the evolution of diterpenoid metabolism in the cereals. **Biochem. J.** 435:589–595, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3723722/>. Acesso em: 17 fev. 2018.

MURATA, N., AOKI, T., KUSABA, M. Various species of *Pyricularia* constitute a robust clade distinct from *Magnaporthe salvinii* and its relatives in Magnaporthaceae. **Journal of General Plant Pathology**. 80: 66-72, 2014.

NIELSEN, K.A. et al. Leucine-derived cyano glucosides in barley. **Plant Physiol.** 129:1066–1075. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC166501/>. Acesso em: 17 fev. 2017.

NUNES, C. D. M. et al. Ocorrência de brusone em azevém. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 40).

NUNES, C. D. M. **Doenças da cultura do arroz irrigado**. Embrapa Clima Temperado, 2013. (Embrapa Clima Temperado, Documentos, n. 360). Disponível em: < http://www.univale.br/sites/biblioteca/biblioteca_online_agronegocio/livrosbiblioteca/5/doencas-arroz-web.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2018.

NUNES, C. D. M. et al. Variabilidade de *Pyricularia oryzae Cav*. em genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 3, p. 263-270, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo. php?script=sci_arttext &pid=S1983-40632014000300014>. Acesso em: 23 nov. 2018.

NUNES, C.D.M. MITTELMANN, A. **Avaliação da Reação de Resistência dos Genótipos de Azevém Anual (*Lolium multiflorum*) à Brusone (*Pyricularia grisea*).** Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2017. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico 350).

OKADA, A. et al. Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. **Plant Molecular Biology**, v.65, p.177-187, 2007.Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634747>. Acesso em: 17 fev. 2018.

OTTIS, B.V. et al. Rice yield and quality as affected by cultivar and red rice (*Oryza sativa*) density. **Weed Sci**.53: 499–504, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1614/WS-04-154R>. Acesso em: 15 fev. 2017.

PARKER, I. M.; GILBERT G. S. The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 35, 675–700,

2004. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132339>. Acesso em: 19 fev. 2017.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de Fungos a Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Maranhão, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009. Disponível em: <http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/36/22>. Acesso em: 08 jan. 2018.

PAVARINI, D.P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Anim. Feed Sci. Technol.** 176, 5–16, 2012. Disponível em: < http://www.science direct.com/science/article/pii/S0377840112002350>. Acesso em: 16 fev. 2018.

PETERS R.J. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crop plants. **Phytochemistry.** 67:2307–2317. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942206004778>. Acesso em: 15 fev. 2017.

PRABHU A. S.; FILIPPI M. C.; RIBEIRO, A. S. Doenças e seu controle. In: SANTOS, A. B. STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. de A. A cultura do arroz no Brasil. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 561-631, 2006.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. Resistência da cultivar no manejo integrado da brusone. In: PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. **Brusone em arroz:** controle genético, progresso e perspectivas. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p. 323-387.

PRABHU, A.S. et al. An Unprecedented Outbreak of Rice Blast on a Newly Released Cultivar BRS Colosso in Brazil. In: WANG, G. L.; VALENT, B. (eds.) Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast. **Springer Science, Netherlands**, p. 257-267, 2009. Acesso em: 10 jan. 2017. DOI: 10.1007 / 978-1-4020-9500-9_26

PRICE, K.R., JOHNSON, I.T., FENWICK, G.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Critic. Rev. Food Sci. Nutr**. 26:27–135, 1987.

RAFFAELE, S. et al. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. **Science** 330, 1540–3, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148391>. Acesso em: 19 fev. 2017.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signal. Behav.** 6, 1720–1731, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329344/>. Acesso em: 17 fev. 2017.

RAO, A.N. et al. Weed management in direct-seeded rice. **Advances in Agronomy.** 93:153–255, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(06)93004-1>. Acesso em: 19 fev. 2018.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. DROUGHT-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **J. Plant Physiol.** 161, 1189–1202, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15602811>. Acesso em: 17 fev. 2018.

REIS, E.M., CASA, R.T., BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v.37, n.3, p.85-91, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/sp/v37n3/a01v37n3.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2018.

REIS, E.M., CASA, R.T. Doenças do Arroz. In: Kimati H, Amorim L, Bergamin-Filho A, Camargo LEA, Rezende, JAM (Eds.) **Manual de Fitopatologia** Vol. 2: Doenças das plantas cultivadas. Ed. Ceres: São Paulo p.637. 2005.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Doenças dos cereais de inverno:** Diagnose, epidemiologia e controle. 2.ed. rev. atual. Lages: Graphel, 2007.

RIBEIRO, A. S. Compatibilidade do arroz com *Pyricularia* de outras gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 16, n. 2, p. 209-212, 1981.Disponível em: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/16851/11179>. Acesso em: 12 dez. 2018.

RIBEIRO, A. S.; TERRES, A. L. S. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae* e sua relação com cultivares resistentes à brusone. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 12, n. 4, p. 316-21, 1987.

RODRIGUES, M. B. C. et al. Resistência a benzimidazóis por Guignardia citricarpa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 42, n. 3, p. 323-327, 2007. Disponível em: <http://www. scielo.br/pdf/pab/v42n3/04.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2018.

ROZEMA, J., et al. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. **Trends Ecol. Evol.** 12, 22–28, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21237957>. Acesso em: 17 jul. 2018.

SANTOS, G. R. et al. Diversidade de Magnaporthe grisea em arroz de terras altas no sul do Estado do Tocantins, na safra 2008/09. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 1, p. 65-70, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034737X2012000100009>. Acesso em: 20 jun. 2018.

SANTOS, H. P.; REIS, E. M.; DERPSCH, R. Características agronômicas e controle de doença radiculares de trigo, em rotação com outras culturas de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília,** v. 33, n. 3, p. 277-288, 1998. Disponível em: < http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4845/6968>. Acesso em: 19 set. 2018.

SANTOS, J.M. et al. Reação de *Avena* spp. à brusone na busca de novas fontes de resistência genética. **Revista de Ciências Agrárias**, 2018, 41(4): 1075-1082. Disponível em: < http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v41n4/v41n4a23.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2018.

SCHEUERMANN, K.K.; EBERHARDT, D.S. Avaliação de fungicidas para o controle da brusone de panícula na cultura do arroz irrigado. **Revista de Ciências**

Agroveterinárias, Lages, v.10, n.1, p.23-28, 2011. Disponível em: < http://rca.cav.udesc.br/rca_2011_1/3_scheuermann.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2019.

SILUE, D., NOTTEGHERM, J.L.; THARREAU, D. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa–Magnaporthe grisea* pathosystem. **Phytopathology** 82: 577–580. 1992.

SILVA, F. de A.S.; DE AZEVEDO, C.A.V. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA. Anais... Orlando: **American Society of Agricultural Engineers**, p.393-396. 2006.

SKAMNIOTI P.; GURR S. J**.** Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. **Trends in Biotechnology.** v.27 No.3., 2009. Disponível em: <http://www. cell.com/trends/biotechnology/pdf/S0167-7799(09)00014-6.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2019.

SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz Irrigado: recomendações técnicas de pesquisa para o Sul do Brasil.** Bento Gonçalves, RS: SOSBAI, 2014. 192 p.

SOSBAI - Sociedade Sul-Brasileira De Arroz Irrigado. **Arroz Irrigado:** Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. Editora SOSBAI, Bento Gonçalves, 200p, 2016. Disponível em: <http://www.sosbai.com.br/ docs/Boletim_RT_2016.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2017. Acesso em: 19 fev. 2017.

SPATAFORA, J.W., BUSHLEY, K.E. Phylogenomics and evolution of secondary metabolism in plant-associated fungi. **Plant biology** 26, 37-44, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.030>. Acesso em: 10 jan. 2019

STUKENBROCK, E. H.; BATAILLON, T. A population genomics perspective on the emergence and adaptation of new plant pathogens in agro-ecosystems. **PLos Pathog** 8, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/ 23028308>. Acesso em: 29 fev. 2019.

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. The origins of plant pathogens in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 46, p. 75-100, 2008. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev. phyto.010708.154114>. Acesso em: 02 jan. 2019.

SUDHA, G., RAVISHANKAR, G.A. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. 71:181–212, 2002.

SZAKIEL, A.; PĄCZKOWSK, I.C.; HENRY, M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochem. Rev.** 10, 471–491, 2010. Disponível em: < http://link.springer.com/article/10.1007/s11101-010-9177-x>. Acesso em: 17 fev. 2019.

TALBOT N. J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**. 57. 177–202, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434465>. Acesso em: 13 fev. 2019

TALBOT, N. J., EBBOLE, D. J., HAMER, J. E. Identification and characterisation of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell.** 5, 1575–1590, 1993.

TELASCREA, M. et al. Essential oil from leaves of Cryptocarya mandioccana Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochem. Syst. Ecol.** 35, 222–232, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197806002456>. Acesso em: 17 nov. 2018.

TITONE, P., MONGIANO, G.; TAMBORINI, L. Resistance to neck blast caused by *Pyricularia oryzae* in Italian rice cultivars. **European Journal of Plant Pathology**. 142: 49, 2015. Disponível em: < http://link.springer. com/article/10.1007/s10658-014-0588-1>. Acesso em: 12 jan. 2019.

TOSA, Y. CHUMA, I. Classification and parasitic specialization of blast fungi. J. Gen. **Plant Pathol.** 80, 202–209, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-014-0513-7>. Acesso em: 12 jan. 2019.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant Biol.** (Stuttg). 7, 581–591, 2006. Disponível em: < https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2005-873009>. Acesso em: 16 fev. 2017.

TSUGE, T. et al. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. **FEMS Microbiol Rev**. 37:44–66, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/37/1/44/557879>. Acesso em: 22 jan. 2019.

URASHIMA, A.S.; SILVA, O.S. Characterization of Magnaporthe grisea (*Pyricularia grisea*) from black oat in Brazil. **Journal of Phytopathology**, vol. 159, n. 11-12, p. 789-795, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01844.x>. Acesso em: 25 jan. 2019.

URASHIMA, A.S. et al. Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homolog of retrotransposon MGR 583. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. 65:429- 436, 1999. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/65/4/65_4_429/_pdf>. Acesso em: 15 jan. 2019.

VALENT, B.; CHUMLEY, F. G. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus, pp. 111–134. **Rice Blast Disease**, edited by R. S. 1994. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1450392 /#bib96>. Acesso em: 23 dez. 2018.

VAUGHAN, D. A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza genus*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 2, p. 139-146, 2003.

VRANOVA E.C.D; GRUISSEM, W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. **Review of Plant Biology,** v.64, p.665-700, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23451776>. Acesso em: 17 fev. 2019.

WANG, G.L.; VALENT, B. Advances in genetics, genomics and control of rice blast. **Amsterdam: Springer Science**, 2009.

WILSON, R.A., TALBOT, N.J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Nature Reviews Microbiology**. 7, 185 – 195, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2032>. Acesso em: 13 fev. 2019

WOOLHOUSE, M.E.; HAYDON, D.T.; ANTIA, R. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. **Trends Ecol Evol** 20, 238–44, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701375>. Acesso em: 19 fev. 2017.

WU, L. et al. Establishing a regional nitrogen management approach to mitigate greenhouse gas emission intensity from intensive smallholder maize production. **PLoS One 9**. 2014. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/24875747> . Acesso em: 19 fev. 2017.

ZHANG, C.Q. et al. Resistance development in rice blast disease caused by *Magnaporthe grisea* to tricyclazole. **Pestic. Biochem. Physiol.** 94:43-47, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357509000200>. Acesso em: 08 jan. 2017. DOI: 10.1016/j.pestbp.2009.03.001

ZHANG, J. et al. The resistance of different strains of rice blast (*M. oryzae)* in Jiangxi Province to kasugamycin and isoprothiolane. **Acta Agric**. Univ. Jiangxiensis 35: 722-726, 2013. Disponível em: <http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=CN2014002706>. Acesso em: 04 jan. 2017.

ZHONG, Z. et al. Directional Selection from Host Plants Is a Major Force Driving Host Specificity in *Magnaporthe* Species. **Scientific Reports.** 6:25591, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep25591>. Acesso em: 17 fev. 2017.

ZHOU, Y. et al. Determination of tricyclazole residues in cereals by LC-MS/MS method. J. Chin**. Cereals Oils Assoc.** 28: 102-105, 2013. Disponível em: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFD Total-ZLYX201312024.htm>. Acesso em: 09 jan. 2019.

APÊNDICES

Apêndice 1. Resumo da análise de variância referente ao número de lesões submetidos ao teste médias Skott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2019.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

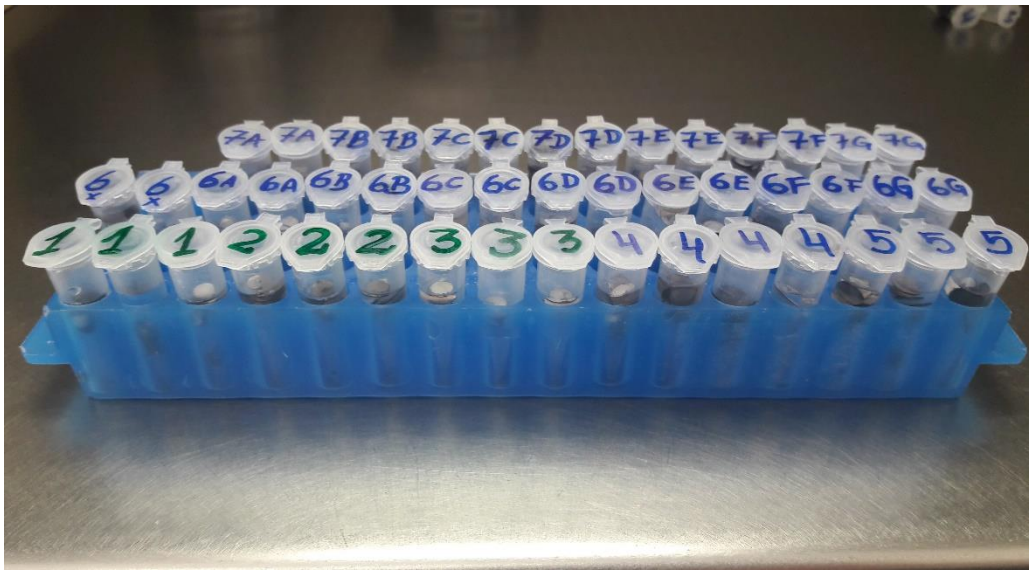
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	14	479.942400	34.281600	168.598	0.0000
ISOLADO	1	6.080267	6.080267	29.903	0.0000
TRATAMENTO*ISOLADO	14	596.027733	42.573410	209.377	0.0000
erro	120	24.400000	0.203333		
Total corrigido	149	1106.450400			
CV (%) =	12.21				
Média geral:	3.6920000	Número de observações:		150	

Apêndice 2. Resumo da análise de variância sobre médias do tamanho de lesões submetidos ao teste médias Skott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2019.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	14	2061.633663	147.259547	623.710	0.0000
ISOLADO	1	22.206885	22.206885	94.056	0.0000
TRATAMENTO*ISOLADO	14	1255.995234	89.713945	379.979	0.0000
erro	120	28.332290	0.236102		
Total corrigido	149	3368.168072			
CV (%) =	12.22				
Média geral:	3.9748793	Número de observações:		150	

Apêndice 3. Discos de micélio de isolados, armazenados em micro tubos Eppendorf contendo água destilada conforme método de Castellani. Santa Maria, RS, 2019.



Apêndice 4. Folhas de arroz, cultivar ‘IRGA 424’ com lesões características de brusone aos 40 DAI. Santa Maria, RS, 2019.

Apêndice 5. Folhas de arroz, cultivar ‘IRGA 424 RI’ com lesões características de brusone aos 40 DAI. Santa Maria, RS, 2019.

Apêndice 6. Folhas de arroz, cultivar ‘IRGA 425’ com lesões características de brusone aos 40 DAI. Santa Maria, RS, 2019.