ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA
DE *Pyricularia* spp. EM ARROZ (*Oryza sativa* L.)
E OUTRAS GRAMÍNEAS

ANA PAULA AYRES BORDIN
(Engenheiro Agrônomo)

Orientador: Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1986

Aos meus pais

EVONIR e JANE

Ofereço

Ao

Luiz Antonio Geraldo Pereira

Dedico

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação e ensinamentos;
- . Ao Dr. Yoshitaka Tanaka pela sua cò-orientação, crença e empenho na realização deste trabalho;
- . Ao Dr. Almiro Blumeinschein e Anne S. Prabhu do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF) pelo incentivo e oportunidade;
- . A Dra. Eliane Augustin de Oliveira e Gladis Corrêa do Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado (CNPFT) pela colaboração nos procedimentos eletroforéticos utilizados neste estudo;
- . Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky e Francisco J. P. Zimmermann pela análise estatística dos resultados;
- . Ao Dr. Itamar Soares de Melo, Dr. Tadashi Yorinori e Maria José Valarini pela revisão do texto final;
- . A Terezinha de Jesus L. Barrete e Nilce Puga Sigrist pelo auxílio na listagem bibliográfica;

- . Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelas bolsas de estudo concedidas;
- . A Janete Magali de Araújo, Lygia Vitória Galli e Romeu A. A. Kiihl pela amizade e estímulo;

A todos aqueles que de alguma maneira manifestaram colaboração, apoio, incentivo ou críticas no sentido de motivar a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Mecanismos genéticos e variabilidade patogênica em <i>Pyricularia oryzae</i> Cav.....	4
2.2. Hospedeiros.....	7
2.3. Variabilidade morfológica.....	15
2.3.1. Características de colônia.....	15
2.3.2. Características dos conídios	17
2.4. Variabilidade isoenzimática.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Isolados utilizados.....	22
3.1.1. Isolados de <i>Pyricularia</i> spp.	22
3.1.2. Raças de <i>Pyricularia oryzae</i>	23
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas.....	26
3.2.1. Batata dextrose ágar (BDA).....	26
3.2.2. Aveia dextrose ágar (ADA).....	26
3.2.3. Meio definido B (OU, 1972).....	26
3.2.4. Meio de batata sacarose (LEUNG, 1984) ..	27
3.2.5. Solução de albumina e glicerina.....	27
3.2.6. Tampão fosfato 0,5M pH 6,8.....	27

3.2.7. Tampão tris-citrato 0,2M pH 8,3 (SCANDALIOS, 1969).....	27
3.2.8. Tampão tris-citrato 0,2M pH 8,3 modificado (MACHADO, comunicação pessoal)....	28
3.2.9. Tampão lítio-borato 0,2M pH 8,3 (SCANDALIOS, 1969).....	28
3.2.10. Tampão fosfato 0,2M pH 4,3 (SCANDALIOS, 1969).....	28
3.2.11. Tampão fosfato 0,2M pH 9,2 (SCANDALIOS, 1969).....	28
3.2.12. Tampão tris-malato 0,2M pH 3,3 (SCANDALIOS, 1969).....	29
3.2.13. Tampão hidróxido de sódio 0,2M pH > 14 (SCANDALIOS, 1969).....	29
3.2.14. Tampão acetato 0,2M pH 4,0 (SCANDALIOS, 1969).....	29
3.2.15. Tampão DH 0,018M pH 8,6 (AYALA, comunicação pessoal).....	29
3.2.16. Solução de persulfato de amônia a 10%..	30
3.2.17. Solução de azul de bromofenol a 0,1%...	30
3.2.18. Solução de α -naftil acetato a 1%.....	30
3.2.19. Solução de β -naftil acetato a 1%.....	30
3.2.20. Solução de $MgCl_2$ a 10%.....	30
3.2.21. Solução de Tween 80 - 0,01%.....	31

	Página
3.3. Isolamentos.....	31
3.4. Características de colônia.....	31
3.4.1. Morfologia.....	31
3.4.2. Crescimento.....	32
3.4.3. Delineamento experimental e métodos estatísticos.....	33
3.5. Características dos conídios	36
3.5.1. Indução da esporulação.....	36
3.5.2. Coloração de núcleo e dimensão de conídios.....	37
3.5.3. Métodos estatísticos.....	38
3.6. Caracterização enzimática.....	38
3.6.1. Obtenção e preparação das amostras para eletroforese.....	39
3.6.2. Preparação dos géis.....	39
3.6.2.1. Acrilamida.....	39
3.6.2.2. Amido.....	40
3.6.3. Aplicação das amostras.....	41
3.6.4. Migração.....	41
3.6.5. Coloração e fixação dos géis.....	42
3.6.6. Condicionamento dos géis.....	43
3.6.7. Análise dos géis.....	44
3.7. Inoculação cruzada.....	44
3.7.1. Variedades diferenciais de arroz.....	44
3.7.2. Gramíneas.....	45

3.7.3. Plantio e material experimental.....	45
3.7.4. Inoculação.....	47
3.7.5. Critérios de avaliação das reações dos hospedeiros.....	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Características de colônia.....	49
4.1.1. Morfologia.....	49
4.1.2. Crescimento.....	55
4.2. Características dos conídios.....	60
4.2.1. Determinação do número de núcleos.....	60
4.2.2. Dimensão dos conídios.....	61
4.3. Caracterização enzimática.....	61
4.3.1. Zimogramas.....	61
4.3.2. Diversidade enzimática.....	69
4.4. Inoculação cruzada.....	70
4.4.1. Isolados.....	70
4.4.2. Reisolamentos.....	76
5. DISCUSSÃO.....	79
5.1. Características de colônia.....	79
5.1.1. Morfologia.....	79
5.1.2. Crescimento.....	81
5.2. Características dos conídios.....	85
5.2.1. Número de núcleos,.....	85

5.2.2. Dimensão dos conídios	86
5.3. Caracterização isoenzimática.....	89
5.3.1. Zimogramas.....	89
5.3.2. Diversidade enzimática.....	91
5.4. Inoculação cruzada.....	95
5.4.1. Raças de <i>P. oryzae</i> de arroz e isolados de outras gramíneas.....	95
5.4.2. Reisolamentos.....	103
6. CONCLUSÕES.....	104
7. BIBLIOGRAFIA.....	106
8. APÊNDICE.....	121

ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E PATOGENICA
DE *Pyricularia* spp. EM ARROZ (*Oryza sativa* L.) E
OUTRAS GRAMÍNEAS

AUTOR: Ana Paula Ayres Bordin

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

RESUMO

Objetivando estudar causas da variação patogênica do fungo *Pyricularia oryzae* Cav., oito isolados de *Pyricularia* spp. provenientes de gramíneas não cultivadas e cinco raças provenientes do arroz foram caracterizados sob o ponto de vista patológico, enzimático, morfológico e fisiológico.

Os testes de patogenicidade utilizando hospedeiros diferenciais de arroz e outras gramíneas, evidenciaram patogenicidade das raças do fungo do arroz a algumas destas espécies de gramíneas, principalmente a *Paspalum notatum* Flügge e a *Paspalum paniculatum*. Os isolados de *Pennisetum setosum* (Swartz) L. e *Hyparrhenia rufo* (Nees.) Stapf. foram patogênicos a algumas variedades de arroz. Também houve uma variação de padrões de reações das raças de arroz explicadas pelas condições diferentes de ambiente entre os três experimentos.

A análise eletroforética de cinco sistemas en-

enzimáticos (esterase, fosfatase ácida, malato desidrogenase, superóxido dismutase e leucina aminopeptidase) revelou padrões de bandas similares entre as raças de arroz e considerável diversidade entre os outros isolados, sugerindo a uniformidade genética entre fungos provenientes do mesmo hospedeiro (arroz) e diversidade genética entre isolados de outras espécies não cultivadas. Portanto, a variação da patogenicidade entre as raças de arroz não pode ser detectada através dos sistemas enzimáticos utilizados. Os isolados de *P. seto sum* e *H. ruífa* apresentaram os mesmos padrões de bandas que as raças isoladas do arroz.

De uma maneira geral, as características morfológicas de colônia foram variáveis, sendo que os conídios de *P. oryzae* do arroz tinham tendência de serem mais alongados. Os isolados de *P. seto sum* e *H. ruífa* apresentaram morfologia de colônia e dos conídios semelhantes aos das raças de arroz. As células dos conídios eram uninucleadas.

A análise da velocidade de crescimento em três meios de cultura (BDA, AVEIA e definido B) mostrou diferenças entre as raças de arroz e isolados de outras gramíneas.

De acordo com a caracterização patogênica, enzimática, morfológica e fisiológica, sugere-se que os isolados de *Pyricularia* spp. obtidos de *P. seto sum* e *H. ruífa* sejam *Pyricularia oryzae* Cav. utilizando estas plantas como hospedeiros alternativos. Isto também pode explicar a ocorrência da doença em áreas onde esta ainda não havia sido constatada.

GENETIC AND PATHOGENIC VARIABILITY OF *Pyricularia* spp. ON
RICE (*Oryza sativa* L.) AND OTHER GRAMINEOUS

AUTHOR: Ana Paula Ayres Bordin

ADVISER: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

SUMMARY

The objective of the present work was to study the causes of pathogenic variation of the rice blast fungi, *Pyricularia oryzae* Cav. Pathogenicity, morphology, physiological and enzymatical aspects of the fungus were studied. A total of thirteen isolates of *Pyricularia* spp. were used, eight from gramineous species and five from rice.

Pathogenicity tests using a set of eighteen differential varieties of rice and eighteen gramineous species showed that *Paspalum notatum* Flügge and *Paspalum paniculatum* were the gramineous most affected. The isolates of *Pennisetum setosum* (Swartz) L. and *Hyparrhenia rufa* (Neis.) Stapf. were pathogenic to some rice differential varieties. Also it was

observed the variation of reaction of rice fungus races to the differentials varieties due to different micro-climatical conditions through the three experiments.

Electrophoretic analysis using five enzymatic systems (Esterase, Acid phosphatase, Dehydrogenase Malat, Dismutase Superoxid and Aminopeptidase Leucine) showed similar band patterns among rice fungus races and considerable diversity among gramineous isolates, suggesting the genetic uniformity among fungi from the same host (rice) and genetic diversity among other isolates. So the variability on pathogenicity of the rice fungus races could not be detected by the enzymatic systems used. The isolates of *P. setosum* and *H. rufo* showed the same band patterns as those from rice.

Generally, the morphological characteristics of colony and conidiospore were variable, and conidia of isolates from rice plants were longer than the others. All the conidiospore cells were uninucleate. Isolates of *P. setosum* and *H. rufo* showed similar morphological characteristics of colony and conidiospores to those of rice fungus races.

The growth rate in three medium (PDA, Oat meal Agar and Defined B) was different among rice fungus races and those of other gramineous.

According to pathogenical, enzymatical, morphological and physiological characterization, it was suggested that the isolates obtained from *P. setosum* e *H. rufo* were *Pyricularia oryzae* Cav. Also, it was suggested that this

gramineous were considered as alternative hosts of rice blast fungus. This can explain the occurrence of rice blast epidemics in regions where it is not common.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de arroz de sequeiro do mundo, sendo que este sistema de cultivo correspondia em 1981 a 88,8% da área total cultivada com arroz no país, segundo De Rubinstein (1984) citado por TRAN (1985).

A produtividade média do arroz de sequeiro vem declinando ao longo dos anos. As oscilações na produção decorrem em grande parte das variações climáticas e da ocorrência de doenças, sendo que a mais limitante destas, é a brusone causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* Cav. (PRABHU, 1984).

Danos devido a brusone têm sido estimados em cerca de 25% da média total devida a todos os fatores biológicos e físicos (OU, 1972). No Brasil perdas de 100% já foram observadas em algumas lavouras (PRABHU, 1984).

O melhoramento visando resistência genética tem sido a principal medida de controle na maioria das regiões produtoras de arroz, onde o uso de fungicidas não é compensador. No entanto, a variabilidade patogênica deste fungo tem feito

com que esta abordagem seja complexa. Embora vários esquemas de melhoramento tenham sido propostos para o desenvolvimento de uma resistência mais duradoura, a escolha crítica de métodos de melhoramento não tem sido feita devido a falta de entendimento da base de variação patogênica.

A especialização patogênica no gênero *Pyricularia* já foi muito estudada, no entanto, ainda não há referências que definitivamente evidenciem a importância de outras plantas hospedeiras no ciclo da brusone do arroz. A ampla gama de hospedeiros reportada para *Pyricularia* (YAMASAKI e KOZAKA, 1980) sugere que a seleção natural tenha favorecido um grande número de genes de virulência para diferentes hospedeiros, nenhum dos quais é muito fortalecido pela ação de genes para a agressividade tal qual foi descrito por DAY (1974) para o gênero *Helminthosporium*. Entretanto, os estudos genéticos de fungos do gênero *Pyricularia* a nível de isolados e de população seriam necessários a fim de elucidar os aspectos epidemiológicos e evolutivos deste gênero e, conseqüentemente, o conhecimento de como novos patótipos surgem ou são disseminados, e, daí, poder prever estratégias adequadas para controlar a brusone do arroz.

Tendo em vista os progressos feitos na análise de estrutura genética de populações de *P. oryzae* via marcadores eletroforéticos (LEUNG, 1984), este estudo foi feito com o objetivo de verificar a variabilidade genética entre alguns isolados da população de fungos do gênero *Pyricularia* provenientes

tes do arroz e outras gramíneas da região arrozeira de Goiânia, GO. Análise isoenzimática foi empregada para tal. A variabilidade fenotípica foi observada também na morfologia e fisiologia desses isolados selecionados. Para tentar esclarecer as relações entre esses isolados e várias plantas hospedeiras, inclusive o arroz, foram feitos testes de inoculação cruzada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MECANISMOS GENÉTICOS E VARIABILIDADE PATOGENICA EM *Pyricularia oryzae* Cav.

A variação da patogenicidade foi constatada pela primeira vez em 1922 por Sasaki, no Japão o qual observou que variedades resistentes ao isolado A do fungo eram severamente afetadas pelo isolado B no mesmo fungo. Estudos intensivos sobre raças patogênicas foram iniciados a partir de 1950, quando algumas variedades resistentes se tornaram suscetíveis a *P. Oryzae* (OU, 1980). No final da década de 60, OU e AYAD (1968) e GIATGONG e FREDERIKSEN (1969) reportaram que culturas monospóricas continuavam a dar origem a novas raças. Por outro lado, LATTERELL (1972 e 1975) observou que a maioria dos isolados utilizados em seus estudos manteve seu padrão de patoo

genicidade.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a variabilidade genética deste fungo. A ocorrência de heterocarióse persistente em conídios, células miceliais e apressórios foi reportada por SUZUKI (1965); FATEMI e NELSON (1977) usando marcadores morfológicos naturais mostraram a formação de heterocários entre isolados de diversas regiões geográficas. Entretanto, YAMASAKI e NIIZEKI (1965), GIATGONG e FREDERIKSEN (1969), YAEHASHI e HEBERT (1976), entre outros, observaram que a grande maioria dos isolados possuíam alta percentagem de células mononucleadas, LEUNG (1984) estudando oito mil quatrocentos e sessenta células de hifa (apicais, intercalares e penúltimas) observaram que 8,6% eram multinucleadas, não havendo diferenças nas condições nucleares entre isolados de diferentes regiões sugerindo que a variação em número de núcleos não é responsável pelas diferenças na variabilidade patogênica observada entre isolados regionais.

A parassexualidade como mecanismo de variabilidade foi detectada geneticamente por YAMASAKI e NIIKEZI (1965). WU e TSAI (1974), GENOVESI e MAGILL (1976), CHEVAUGEON e MAKOUNZI (1979) e citologicamente por YAMASAKI e NIIKEZI (1965) e TANAKA e YAMASAKI (1974 e 1975). A oscilação do número de cromossomos por núcleo, ou heteroploidia vem sendo implicada na variabilidade patogênica deste fungo. Segundo TOIMSOFF (1983), a variação de tamanho e forma de cada célula do conídio trice-lular de *P. oryzae* sugere que cada uma seja um heteroplóide

diferente da sua célula vizinha, uma vez que tamanho e forma celulares são fortemente influenciados pelo estado específico de heteroploidia. O número de cromossomos em cada célula de conídio de *P. oryzae* varia de 2 a 12, sendo que os números mais frequentemente citados são, 3, 4, 5 e 6 (OU, 1979). De acordo com o autor, estes dados suportam a magnitude da variação patogênica reportada neste fungo. Recentemente LEUNG (1984) utilizando marcadores eletroforéticos (4 loci enzimáticos) em cruzamentos de *Pyricularia* spp. observou segregação regular dos variantes, sendo que pelo menos para os cromossomos que possuíam estas marcas, a incidência de aneuploidia foi menor que 0,2%. Em vista do reduzido número de progênies de aneuplóides e da instabilidade observada em muitos deles (FINCHAM *et alii*, 1979), os autores acreditam que a aneuploidia não tenha um grande significado epidemiológico.

A frequência de mutação gênica afetando patogenicidade segundo CHEVAUGEON e MAKOUNZI (1981) é aproximadamente igual a frequência de mutação de outras características codificadas por gens nucleares. KIYOSAWA (1976) em seus estudos concluiu que taxa de mutação varia de acordo com o locus e variedade de arroz ensaiados, sendo que alguns loci apresentaram taxas maiores. O mesmo autor explica a alta variabilidade patogênica reportada em muito trabalhos como sendo devida, em grande parte, a diferentes critérios de avaliação da doença.

A partir de 1971, quando HEBERT (1971) descreve

veu a fase perfeita entre isolados de *Pyricularia grisea* (COOKE) do hospedeiro *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop, intensificou-se a procura da fase perfeita entre isolados de *P. oryzae* até que KATO e YAMAGUCHI (1982) descreveram-na como sendo *Magnaporthe grisea*. Estudos envolvendo herança de caracteres (ex. patogenicidade, tipo sexual, resistência a drogas, atividade enzimática), afinidade genética, comportamento citogenético e mapeamento genético (KATO *et alii*, 1976; YAEHASHI e ASAGA, 1981; KATO e YAMAGUCHI, 1979; UYAMA e TSUDA, 1975, YAEHASHI e HEBERT, 1976; YAEHASHI, 1977; ITOI *et alii*, 1983; LEUNG, 1984 e NAGAKUBO *et alii*, 1983), têm sido intensivamente abordados tentando esclarecer a natureza da variação genética, aspectos epidemiológicos decorrentes da mesma, e taxonomia deste gênero (YAEHASHI, 1981).

2.2. HOSPEDEIROS

O gênero *Pyricularia* foi descrito por Saccardo em 1880 ao identificar a espécie *Pyricularia grisea* (COOKE) patogênica a *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. (OU, 1979). Desde então muitos isolados provenientes de várias espécies de hospedeiros têm sido classificados como novas espécies do fungo (Tabela 1). Estes trabalhos mostram a divergência na classificação de fungos do gênero *Pyricularia* revelando a natureza

Tabela 1. Espécies de *Pyricularia*, respectivos hospedeiros e data de identificação (YAEHASHI, 1981).

<i>Pyricularia</i> spp.	Hospedeiro
<i>Pyricularia angulata</i> Hashioka	<i>Musa sapientum</i> L. (1971)
P. <i>apiculata</i> Matsushima	<i>Phyllostachydis</i> sp. (1971)
P. <i>aquatica</i> Ingold	<i>Alnus glutinosa</i> (1943)
P. <i>buloloensis</i> Matsushima	<i>Musae paradisiacae</i> (1971)
P. <i>cannae</i> Roldan	<i>Canna</i> sp. (1938)
P. <i>cannaecola</i> Hashioka	<i>Canna indica</i> L. (1971)
P. <i>caricis</i> Arnaud	<i>Carex</i> sp. (1954)
P. <i>caudata</i> Appel & Str.	
P. <i>costi</i> (Sawada) Ito	<i>Costus speciosus</i> (1918)
P. <i>curcumae</i> (Sawada)	<i>Curcuma aromatica</i> Salisb. (1959)
P. <i>cyperi</i>	<i>Cyperus iris</i> L. (1971)
P. <i>cypersae</i> Siwasin et Giatgong	<i>Cyperus</i> sp.
P. <i>distorta</i> Hashioka	<i>Alpinia</i> sp. <i>Catymbium</i> sp. (1971)
P. <i>didyma</i>	<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. (1949)
P. <i>dubiosa</i> (Speg.)	<i>Digitaria violascens</i> (1946)
P. <i>ebbelii</i>	<i>Commelina africana</i> L. (1972)
P. <i>echinochloae</i>	<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link. (1958)
P. <i>euphorbiae</i> (Tracy & Earle) Atk.	
P. <i>grisea</i> (Cke.) Sacc.	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop. 1880
P. <i>higginsii</i> Luttrell	<i>Cyperus rotundus</i> L. (1954)
P. <i>higginsii</i> var. <i>poonensis</i> T.K. et P.	<i>Cyperus compressus</i> L. (1956)
P. <i>junicola</i> MacGarvie	<i>Juncus effusus</i> L. (1953)
P. <i>leersiae</i> (Sawada) Ito	<i>Leersia japonica</i> Makino (1918)
P. <i>lourinae</i>	<i>Aniba burchellii</i> Kosterm (1971)
P. <i>musae</i> Hughes	<i>Musa sapientum</i> L. (1958)
P. <i>oryzae</i> Cavares	<i>Oryza sativa</i> L. (1891)
P. <i>oryzae</i> var. <i>commelina</i> Thir.	<i>Commelina bengalensis</i> L. (1958)
P. <i>oryzae</i> f. <i>brachiariae</i> G.R. and K.R.	<i>Brachiaria mutica</i> (1958)
P. <i>panicum-miliaceae</i> Hara	<i>Panicum miliaceum</i> L. (1925)
P. <i>panicum-repentis</i> (Sawada) Hara	
P. <i>parasitica</i> Ellis and Everhart	<i>Elymus</i> sp. <i>Hystrix</i> sp. (1893)
P. <i>penniseti</i> Prasada et Goyal	<i>Pennisetum typhoides</i> St. & Hu. (1970)
P. <i>guarumicola</i>	<i>Technosiphon simplex</i> Hubb. (1971)
P. <i>antaulensis</i> Matsushima	<i>Musae</i> sp. (1971)
P. <i>sansevieriae</i>	<i>Sansevieria</i> sp. (1960)
P. <i>scripta</i> (Bon.) Secc.	
P. <i>setariae</i> Nishikado	<i>Setaria italica</i> Beauv. (1917)
P. <i>submersa</i> Ingold	
P. <i>vandalurensis</i>	<i>Ficus bengalensis</i> (1974)
P. <i>zingiberi</i> Nishikado	<i>Zingiber mioga</i> Rosc. (1917)
P. <i>zizaniae</i> Hara	<i>Zizania latifolia</i> Turcz. 1925
P. <i>zizaniae</i> Hashioka	<i>Zizania latifolia</i> Turcz. 1973

ASUYAMA (1965), HASHIOKA (1971, 1973), HUGHES (1958), INGOLD (1943), ITO (1918), PRASADA (1960), LUTTRELL (1964), MATSUSHIMA (1971), NAPIFA et al. (1956), NISHIMARU (1917), NISHIOKA (1962), PADWICK (1991), PRASADA and GOYAL (1970), RAO and RAO (1956), SAWADA (1917), SPENCER (1950), Catalogue of Commonwealth Mycological Institute (1975).

complexa da especialização patogênica. Segundo YAEHASHI (1981) a inconsistência dos dados de literatura se deve às condições experimentais variáveis entre os estudos. Além deste fato, a classificação baseada em características morfológicas deve ser complementada com teste de patogenicidade a hospedeiros determinados e testes de compatibilidade sexual.

Kuribayashi (1928) citado por OU (1972) reportou a sobrevivência do fungo da brusone do arroz em clima temperado. Conídios e micélio podem sobreviver de um a três anos em condições de secas. No campo, a fonte mais comum de inóculo primário são os restos de cultura de arroz. OU (1972) menciona que o fungo da brusone do arroz pode também sobreviver em cereais de inverno e hospedeiros alternativos. Nos trópicos, o fungo pode ser encontrado no ar durante todo ano, pode sobreviver em sementes, restos de cultura e, também em hospedeiros alternativos.

A gama de hospedeiros do fungo causador da brusone do arroz é bastante complexa. Há muitas dúvidas sobre a disseminação do fungo proveniente do arroz para esses hospedeiros e vice-versa, em virtude da variabilidade genética do mesmo, dos hospedeiros observados e da taxonomia do gênero *Pyricularia* (OU, 1980). YAMASAKI e KOZAKA (1980) citam cento e vinte e seis espécies hospedeiras naturais de *Pyricularia* spp. pertencentes a dezessete famílias das quais algumas, de interesse deste trabalho, aparecem na Tabela 2. Os mesmos autores relatam a reação de várias espécies hospedeiras à inoculação

Tabela 2. Patogenicidade de *Pyricularia* spp. a várias espécies de plantas (YAMASAKI e KOZAKA, 1980 modificado).

Espécie	Referência
Monocotiledoneae	
Gramineae	
Oryzoideae	
Oryzeae	
<i>Oryza sativa</i> L.	CAYARA (1892)
Eragrostae	
<i>Eragrostis curvula</i> (Schrad.) Nees	YAMASAKI <i>et alii</i> (1976)
<i>Eragrostis lehmanniana</i> Nees	RISHIHARA (não publicado)
<i>Eragrostis lugens</i> Nees	SPRAGUE (1950)
Chlorideae	
<i>Cenchrus echinatus</i> (L.)	CRUZ (1978)
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Persoon	SPRAGUE (1950)
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	DEIGHTON (1928), BAILEY <i>et al.</i> (1961)
<i>Digitaria ischaemum</i> (Schreb.) Schreb. ex Muhl.	COUCH (1962)
Panicaceae	
<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scopoli	COOKE (1878) [<i>Trichothecium griseum</i>] + SACCARDO (1880) [<i>Pyricularia grisea</i> (Cooke)]
<i>Digitaria scalarum</i> Chiov.	RILEY (1960)
<i>Digitaria serotina</i> (Walt.) Michx.	SPRAGUE (1950)
<i>Digitaria setigera</i> Roth	VEERARAGHAVAN <i>et alii</i> (1965) (<i>P. grisea</i> f. sp. <i>digitaria-setigera</i>)
<i>Digitaria smilii</i> Stent	RISHIHARA (não publicado)
<i>Digitaria velutina</i> Forsk ex Beauv.	RILEY (1960)
<i>Digitaria violascens</i> Link	SAWADA (1917), VIEGAS (1946) [<i>P. dubiosa</i> (Speg.)]
<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) Beauv.	COUCH (1962)
<i>Panicum blauticum</i> Thunb.	YAMASAKI <i>et alii</i> (1976)
<i>Panicum colonatum</i> L.	RISHIHARA (não publicado)
<i>Panicum miliaceum</i> L.	KARA (1925) (<i>P. panic-miliacei</i>)
<i>Panicum nauseosum</i> L.	MURRAY (1922)
<i>Panicum repens</i> L.	SAWADA (1917) [<i>Pyricularia panic-repentis</i>] + <i>P. panic-repentis</i> (Sawada) KARA; VEERARAGHAVAN <i>et alii</i> (1965) (<i>P. grisea</i> f. sp. <i>panicar</i>)
<i>Panicum texanum</i> Buckl.	SPRAGUE (1950)
<i>Panicum trigonum</i> Retz	JOHNSON (1960)
<i>Paspalum plicatulum</i> Michx.	SPRAGUE (1950)
<i>Paspalum stramineum</i> Nash.	SPRAGUE (1950)
<i>Pennisetum clandestinum</i> Hochst et Chiov.	YAMASAKI <i>et alii</i> (1976)
<i>Pennisetum polystachyon</i> Schult.	KENTA <i>et alii</i> (1952)
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum.	MALLACE <i>et alii</i> (1949), ELLIS (1971) (<i>P. didyma</i>)
<i>Pennisetum typhoides</i> Rich (= <i>P. typhoides</i> Stapf et Hubb.) (= <i>P. americanum</i> (L.) Leake)	KENTA (1952), PRASADA <i>et alii</i> (1970) (<i>P. penniseti</i>)
<i>Pennisetum setosum</i> (Swartz) L.	CRUZ (1978)
<i>Rynchosyrum azeum</i> (Nees) Stapf et Hubb	RILEY (1956)
<i>Scleria glauca</i> Beauv	KAWAKAMI (1901)
<i>Scleria intermedia</i> Roem et Schult.	PAYAR <i>et alii</i> (1954)
<i>Scleria italica</i> (L.) Beauv.	SAWADA (1917), RISHIKADO (1917) (<i>P. setariae</i>), SIMMONS (1956)
<i>Scleria lutescens</i> (Weigel) Hubb.	MARDISON (1942)
<i>Scleria viridis</i> (L.) Beauv.	RISHIKADO (1917) (<i>P. setariae</i>)
Andropogoneae	
<i>Andropogon</i> sp	COUCH (1962)
<i>Sorghum sudanense</i> (Piper) Stapf.	SPRAGUE (1950)
<i>Sorghum vulgare</i> Pers.	JOHAN <i>et alii</i> (1971)
Cyperaceae	
<i>Cyperus rotundus</i> L.	LITTRELL (1954) (<i>P. higginsii</i>) + ELLIS (1976) [<i>Distyleria higginsii</i> (Litt.)]

Tabela 3 - Patogenicidade de alguns isolados de *Pyricularia* spp. a *Oryza sativa* L. (YAMASAKI e KOZAKA, 1980 modificado).

Espécies	Referência	
	Virulência	Avirulência
Monocotyledoneae		
Gramineae		
Oryzaceae		
<i>Leersia hexandra</i> Swartz	RIBEIRO (1981)	
Eragrostaceae		
<i>Eragrostis curvula</i> (Schrad.) Nees		YAMANAKA et alii, (1976), KATO et alii (1978)
Chlorideae		
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn		KATO et alii (1977)
Paniceae		
<i>Cenchrus echinatus</i> (L.)	CRUZ (1978)	
<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	YAMANAKA et alii (1901) ITSUNI et alii (1949), JOHNSON (1954) KRISHNASWAMY et alii (1959) RIBEIRO (1961)	SAWADA (1917), McRAE (1922), NISHIKADO (1917), PRASADA et alii (1970) e SIWASIN et alii, (1971)
<i>Digitaria</i> sp.	CRUZ (1978)	
<i>Echinochloa</i> sp.	RIBEIRO (1981)	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) Beauv.	McRAE (1922), KURIBAYASHI et alii (1953)	
<i>Panicum bisulcatum</i> Thunb.		YAMANAKA (1976)
<i>Panicum miliaceum</i> L.	KURIBAYASHI et alii (1953)	NISHIKADO (1926), MARITA et alii (1956), KHOKHRYAKOV et alii (1971)
<i>Panicum repens</i> L.	GIATGONG (1961)	SAWADA (1917), McRAE (1922), THOMAS (1941), VEERARAGHAVAN et alii (1965) SIWASIN et alii (1971),
<i>Pennisetum clandestinum</i> Hochst. et Chior		YAMANAKA et alii (1976)
<i>Pennisetum polystachyon</i> Schult.		SIWASIN et alii (1971), NASHIOKA (1973)
<i>Pennisetum purpureum</i> Schult.	KRISHNASWAMY et alii (1959)	
<i>Pennisetum setosum</i> (Swartz) L.	CRUZ (1978)	
<i>Pennisetum typhoides</i> Rich.		METHA et alii (1952), PRASADA et alii (1970)
<i>Rhynchelytrum repens</i> (Willd.) Hubb		WILSON (1962)
<i>Setaria italica</i> (L.) Beauv.		NISHIKADO (1917), THOMAS (1941) e PALANISWAMI et alii (1970)
<i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv.	NISHIKADO (1917)	

Tabela 4. Patogenicidade de raças de *Pyricularia oryzae* à várias espécies de plantas (YAMASAKI e KOZAKA, 1980 modificado).

Espécies	Referência	
	Virulência	Avirulência
Monocotyledoneae		
Gramineae		
Orizoidae		
Eragrostinae		
<i>Eragrostis curvula</i> (Schrad.) Nees	YAGASHI (1977)	KATO et alii (1978)
<i>Eragrostis lehmanniana</i> Nees	YAGASHI (1977)	
Chlorideae		
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.		SUZUKI (1967) e YAGASHI (1977)
Panicaceae		
<i>Brachiaria plantaginea</i> (L.) Beauv.		CRUZ (1978)
<i>Cenchrus echinatus</i> L.	CRUZ (1978)	
<i>Digitaria</i> sp.	CRUZ (1978)	
<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	HORI (1898) e SUZUKI (1953) RIBEIRO (1981)	SAKADA (1917), NISHIKADO (1917), RAJAKRISHNAN (1948), SUZUKI (1967), PRASADA et alii, (1971), YAGASHI (1977).
<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) Beauv.	SUZUKI et alii, (1953)	SUZUKI (1967)
<i>Echinochloa</i> sp.		RIBEIRO (1981)
<i>Panicum miliaceum</i> L.	KARITA et alii, (1956) e YAGASHI (1977)	KHOIKHRYAKOV et alii, (1971)
<i>Panicum repens</i> L.		SAKADA (1917), SIWASIN et alii, (1971)
<i>Paspalum notatum</i> Flugge		KATO et alii (1978)
<i>Pennisetum purpureum</i> Schumack	CRUZ (1978)	
<i>Pennisetum setosum</i> (Swartz) L.	CRUZ (1978)	
<i>Pennisetum typhoides</i> Rich		MENTA et alii, (1952), PRASADA et alii, (1970) e YAGASHI (1977)
<i>Rhynchelytrum repens</i> (Willd.) Hubb.		WILSON (1962)
<i>Rhynchelytrum roseum</i> (Nees) Staff Hubb	CRUZ (1978)	
<i>Setaria italica</i> (L.) Beauv.	SAKADA (1917), THOMAS (1940), YAGASHI (1977) e KATO et alii, (1978)	NISHIKADO (1917), SUZUKI et alii (1953) e KATO et alii (1978)
<i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv.		NISHIKADO (1917), YAGASHI (1977)
<i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv. f. <i>purpurescens</i> Peck ex Dudley		SUZUKI (1967)
<i>Setaria</i> sp.	CRUZ (1978)	
Cyperaceae		
<i>Cyperus compressus</i> L.		THIRUPARACHAR et alii (1956)
<i>Cyperus iria</i> L.		SIWASIN et alii (1971)

de *P. oryzae* provenientes do arroz (Tabela 3) e a reação de variedades de arroz à inoculação de isolados de outras espécies hospedeiras (Tabela 4).

KATO *et alii* (1977) estudaram a transmissão de *Pyricularia* sp. através sementes de *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. O micélio do fungo dentro do pericarpo das sementes contaminadas e folhas das plantas foi encontrado como fonte de inóculo no campo. No Japão, onde esta espécie de planta é cultivada para produção de alpiste para passarinhos, a introdução de sementes contaminadas tem sido apontada como origem de epidemias em locais ainda não afetados com *Pyricularia* sp. A transmissão do patógeno através de outras grâmíneas especialmente *Eleusine indica*, parece possível embora sejam necessárias mais avaliações da distribuição do patógeno.

CRUZ (1978) utilizando pinça para ferir as folhas, demonstrou patogenicidade de isolados de *Cenchrus echinatus*, *Pennisetum setosum*, *Digitaria* sp. e *Oryza sativa* da região de Jaboticabal, São Paulo, às variedades de arroz, a seus próprios hospedeiros e a *Pennisetum purpureum* e *Rynchelytrum roseum*, no entanto, a *Brachiaria plantaginea* não se mostrou infectada.

ITOI *et alii*, (1979) observaram a infecção natural de isolados de *Pyricularia* spp. provenientes de bambu e grama de bambu durante a primavera e verão. Do mesmo modo, através de inoculação artificial foi observada a patogenicidade a todas as espécies de bambu ensaiadas sendo que alguns

folhas infectadas com micélio destas plantas, as quais são comuns em áreas produtoras de arroz no Japão, sejam fonte de infecção primária no ciclo da brusone do arroz.

RIBEIRO (1981) mostrou que três isolados de *Pyricularia* spp. provenientes de *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa* sp. e *Leersia hexandra* foram patogênicos à série diferencial internacional, enquanto dois isolados de *Leersia hexandra* e dois de *Paspalum* sp. não o foram. Desta maneira, o autor sugere que essas plantas silvestres possam atuar como hospedeiras intermediárias e proporcionar a disseminação de *P. oryzae* ao arroz.

IGARASHI *et alii* (1986) relataram a ocorrência epidêmica de *Pyricularia* sp. na cultura do trigo em vários municípios do Estado do Paraná. Através de inoculação artificial foi observado que o isolado de *Pyricularia* proveniente do trigo apresentou maior infecção em cevada, moderada em trigo, aveia, centeio e milho e baixa em arroz e outras gramíneas. O isolado de *Pyricularia oryzae* mostrou alta infecção em arroz, trigo e cevada, sugerindo a especialização do fungo ao trigo e ao arroz.

2.3. VARIABILIDADE MORFOLÓGICA

2.3.1. CARACTERÍSTICAS DE COLÔNIA

Segundo OU (1972), a morfologia de colônia varia de acordo com o isolado e o meio utilizado. A quantidade de micélio aéreo se apresenta, desde muito escasso a uma massa algodonosa bem evidente. A cor varia desde o branco ou creme, passando por pardo, rosado, cinza até oliváceo escuro.

ROSSETI e MELLO (1962) estudando isolados de *P. oryzae* em meio de cultura batata-dextrose ágar, observaram três grupos de acordo com a coloração do micélio aéreo: cinza escuro, cinza intermediário e cinza claro a esbranquiçado.

Após ter estudado centenas de isolados de *P. oryzae* em meio de quirera de arroz, LATTEREL (1975) encontrou muitas tonalidades de cinza entre branco e preto-carvão, e alguns mutantes marrons. A textura variou de algodonosa (não esporulante) e aveludada (altamente esporulante), aparecendo colônias intermediárias com textura mista e também colônias sem micélio aéreo, formando poucos ou nenhum esporo. Outros tipos de colônias foram observados como: aveludada mas com rugas profundas, colônia de micélio interno branco com pigmentos difusíveis pretos no ágar (pouco esporulante) e colônias com exudatos (cobertas com glóbulos líquidos). A mesma autora não encontrou correlação entre patogenicidade e tipo de

colônia exceto para os tipos pouco patogênicos resumindo-se em: 1) mutantes marrons (não patogênicos), 2) colônias algodono-
sas brancas que não produziram esporos e não puderam ser en-
tão prontamente ensaiadas, 3) culturas úmidas, possivelmente,
infectadas por vírus e que não produziram esporos e 4) cultu-
ras deterioradas que produziram esporos em pouca quantidade ou
anormais, os quais, na sua maioria, produziram apressórios em
ágar (um comportamento anormal). Algumas das raças que apresen-
tam amplo espectro de patogenicidade incluem: 1) colônias es-
curas, altamente esporulantes e 2) colônias cinza claro, pouco
esporulantes, e tipos de colônia mistos com micélio algodonos-
branco, pigmento preto no ágar, e, esporadicamente, superfície
cinza (esporulante). Algumas das raças com menor espectro es-
tão entre as mais esporulantes. Estes resultados contrastam
com os de Ling e Chinte-Sanchez (1968) citados por LATTERELL
(1975) que encontraram alto grau de correlação entre tipo de
colônia e patogenicidade. Segundo YAEHASHI (1981) característi-
cas morfológicas de colônia (coloração de micélio aérea e diâ-
metro de colônia) não foram adequadas como critério taxonômico
devido a variabilidade entre isolados do mesmo tipo de hospe-
deiro. TREVATHAN (1982) estudando treze isolados de *P. grisea*
provenientes de sete espécies de plantas, observou que os iso-
lados mais virulentos eram, geralmente, cinza ou branco, en-
quanto os isolados pretos eram pouco virulentos. Embora alguns
isolados mais virulentos tivessem taxa de crescimento maior,
não foi observada correlação entre esta e virulência.

2.3.2. CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS

Segundo ASUYAMA (1965) a forma, em geral, do conídio de *P. oryzae* da brusone do arroz é piriforme e trice-lular, com um apêndice basal, mas as dimensões do mesmo va-riam de acordo com as condições nas quais ele é produzido (hospedeiros, umidade, temperatura e meio de cultura). Parte do trabalho de revisão de literatura referente a tamanho de conídio realizado por YAMASAKI e KOZAKA (1980) é mostrada na Tabela 5.

O tamanho e forma de esporos é um importan-te critério na delimitação de espécies de fungos dentro de um gênero. KULKARANI e PATEL (1956) investigaram a influênci-da nutrição e temperatura no tamanho de esporos de *P. seta-riae* usando cerca de cem conídios de lesões do próprio hospe-deiro e cinquenta esporos produzidos em meios artificiais. En-tre várias observações, os autores encontraram significativo aumento no comprimento e largura de esporos do meio de aveia, aumento significativo no comprimento e não na largura de coní-dios do meio BDA. A temperatura praticamente não teve influên-cia na largura, mas o comprimento foi reduzido à 10°C e 30°C e aumentado à 15°C, 20°C e 25°C. Singh e Prasad (1981) cita-dos por YAMASAKI e KOZAKA (1980), identificaram a presença de *P. grisea* (Cke.) em *Panicum miliaceum* L., cujos conídios me-diam 29,9 - 39,9 µm (33,6 µm) de comprimento e 9,1-11,6µm (9,5µm) de largura. HASHIOKA (1973) descreveu *Pyricularia pen*

Tabela 5 - Comprimento e largura de confídios de isolados de *Pyricularia* spp. (YAMASAKI e KOZAKA, 1980).

Espécie	Comprimento (u)	Largura (u)	Referência
<i>Oryza sativa</i> L.	20-22	10,0-12,0	CAVARA (1892)
	20-25	9,0-11,5	HORI (1898)
	16-32	7,0-11,0	SAWADA (1917)
	16,7-23,8 (19,2)	6,0- 9,5 (8,5)	NISHIKADO (1917)
	17,0-24,3 (20,9)	7,3- 9,7 (8,8)	SUEDA (1928)
	21,0-37,0 (29,0)	11,0-15,0 (13,0)	RAMAKRISHNAN (1948)
	14,0-32,0 (23,9)	5,0-12,0 (8,19)	ITSUMI (1949)
	18,6-31,6 (24,0)	6,2- 9,3	GIATGONG (1961)
	17,6-24,0	8,0- 9,6	VEERARAGHAVAN et alii, (1965)
	17,0-23,0 (21,2)	8,0-11,0 (9,6)	ELLIS (1971)
	17,0-27,0	7,5-10,0	MATSUSHIMA (1975)
<i>Pennisetum clandestinum</i> Hochst et Chiov	16,0-28,0	8,0-10,0	YAMANAKA et alii, (1976)
<i>Pennisetum polystachyon</i> Schult.	27,9	7,3	HASHIOKA (1973)
<i>Pennisetum typhoides</i> Rich	17,6-30,8	5,9-8,8	MEHTA et alii, (1952)
	18,4-36,7 (27,5)	7,4-11,1 (9,2)	PRASADA et alii, (1970)
<i>Rhynchosyrum repens</i> (Willd.) Hubb	17,2-30,6	5,6-10,6	WILSON (1962)
<i>Eleusine coracana</i> (L.) Gaertn.	18,6-37,2 (27,0)	6,2-9,3	GIATGONG (1961)
	20,2-29,5 (24,5)	7,6-11,5 (9,3)	OOHATA (1974)
<i>Panicum bisulcatum</i> Thumb.	21,7	9,7	YAMANAKA et alii, (1976)
<i>Panicum repens</i> L.	17,0-28,0 (22,5)	8,5-12,0 (10,2)	SAWADA (1917)
	18,6-28,8 (24,0)	6,8-9,3	GIATGONG (1961)
	19,2-25,6	9,6-11,2	VEERARAGHAVAN et alii, (1965)

niseti em *Pennisetum polystachyon* Schult. Os esporos apresentaram-se como um dos mais longos (27,9µm) das espécies conhecidas de *Pyricularia*, no entanto foi o mais estreito (7,3 µm) fazendo com que a sua forma fique mais alongada que piriforme.

2.4. VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA

A análise de isoenzimas através de técnicas eletroforéticas tem sido usada visando o entendimento da estrutura genética (LEUNG, 1984 e OLD *et alii*, 1984), evolução (BURDON *et alii*, 1982), taxonomia (BURDON e MARSHALL, 1981) e fitopatologia (GIL e POWELL, 1968 e BERNIER *et alii*, 1983) de fungos fitopatogênicos.

MATSUYAMA e KOZAKA (1971) estudaram cento e trinta e dois isolados de *P. oryzae* Cav. e alguns isolados de gramíneas não cultivadas provenientes de várias regiões geográficas sob o ponto de vista de seus padrões de bandas de proteínas solúveis, peroxidase e esterases de micélio. Foi encontrada correlação entre os três tipos de padrões de bandas para esterase e a distribuição geográfica dos mesmos. Desta maneira, a maioria dos isolados provenientes de variedades do grupo japônica e indica foi diferenciada pelos padrões de esterases obtidos neste experimento.

MATSUYAMA *et alii*, (1977) compararam padrões de bandas de enzimas extracelulares (peroxidase e esterases) de vários isolados de *Pyricularia* spp. Os zimogramas de peroxidase de isolados de *Pyricularia* de *Oryza sativa*, *Eleusine coracana*, *E. indica*, *E. africana*, *Setaria viridis* var. *minor*, *Phalaris arundinacea*, *Festuca elatior* var. *arundinacea*, *Eragrostis curvula*, *Lolium multiflorum* e *Anthoxanthum odoratum* foram idênticos, enquanto isolados de *L. oryzoides* e *D. sanguinalis* mostraram zimogramas diferentes, mas similares entre si. Isolados de *Panicum miliaceum*, *P. bisulcatum* e *O. sativa* f. *fatta* mostraram zimogramas similares os quais foram diferentes dos dois primeiros grupos. Os padrões de bandas de esterase de *Z. mioca*, *Z. latifolia*, *P. miliaceum* e *E. curvula* foram distintos dos outros. Os mesmos autores sugerem o uso da mobilidade eletroforética de isoenzimas na distinção de características genéticas no gênero *Pyricularia*.

Leung (1984) estudando dezoito loci enzimáticos através de análise eletroforética de enzimas miceliais em trezentos e trinta e cinco isolados de *P. oryzae* provenientes do arroz, observou que apenas dois exibiram diversidade alélica, fato que se contrasta com a conhecida variabilidade patogênica nesta espécie. Entretanto, isolados obtidos de outros hospedeiros evidenciaram variação genética comparada a populações naturais de outras espécies de organismos vivos. A não existência de variantes comuns entre isolados de arroz e de outros hospedeiros sugere que não haja troca de genes entre popula-

ções de *P. oryzae* e *Pyricularia* sp. de outros hospedeiros, entretanto, estudos mais direcionados são necessários.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ISOLADOS UTILIZADOS

3.1.1. ISOLADOS DE *Pyricularia* spp.

Os isolados de *Pyricularia* spp. utilizados, bem como seus respectivos hospedeiros, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Isolados monoconidiais de *Pyricularia* provenientes de gramíneas não cultivadas da região de Goiânia, GO. 1985.

Identificação	Hospedeiro	
	Nome Científico	Nome Comum
E-107	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Capim pé-de-galinha
E-105	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Capim pé-de-galinha
E-104	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Capim pé-de-galinha
3	<i>Pennisetum setosum</i> (Swartz) L.	Capim oferecido
4	<i>Hyparrhenia rufa</i> (Nees.) Stapf	Capim jaraguá
5	<i>Panicum maximum</i> Jacq.	Capim colonião
CO-100	<i>Panicum maximum</i> Jacq.	Capim colonião
C-104	<i>Cenchrus echinatus</i> L.	Capim-carrapicho

3.1.2. RAÇAS DE *Pyricularia oryzae*

As cinco raças de *P. oryzae* foram cedidas pelo Dr. Yoshitaka Tanaka, do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP). Os padrões de reação das raças, estabelecidas por dezesseis variedades diferenciais de arroz das séries Internacional e Kiyosawa (TANAKA, 1985) estão relacionados na Tabela 7. Observa-se, também, os padrões de reação das mesmas a duas variedades brasileiras nativas: Matão e Pérola e a duas variedades brasileiras cultivadas: IAC-25 e IAC-47.

Tabela 7 - Padrões de reação das cinco raças de *Pyricularia oryzae* utilizando a série diferencial de TANAKA (1985), variedades brasileiras nativas e cultivadas. Goiânia, GO. 1985.

Nº	Variedade	Gene de resistência	Raças				
			11	39	240	431	303
1	Shin 2	K ^S	S	S	S	S	S
2	Aichi-Asahi	a	S	S	S	S	S
3	Fujisaka 5	i	S	S	S	S	S
4	Kanto 51	K	S	R	S	R	R
5	Tsuyuake	k ^m	R ^h	R ^h	S	R ^h	R ^h
6	Fukunishiki	z	M	MR	R ^h	S	R ^h
7	K 1	ta	S	S	R	S	S
8	Pi nº 4	ta ²	R ^h	R ^h	R ^h	R ^h	M
9	Toride 1	z ^t	R ^h	R ^h	R ^h	R ^h	R ^h
10	K 60	K ^p	S	S	R ^h	S	S
11	BL 1	b	R ^h	R ^h	R ^h	R ^h	R ^h
12	K 59	t	S	S	S	R	R ^h
13	K 3	K ^h	R	R	S	R	R ^h
14	Kusabue	K	R	R	S	S	R ^h
15	Zenith	z,a	S	S	R ^h	R ^h	R ^h
16	K 2	K ^S ,a	S	S	S	S	R ^h
17	Matão ^{1/}	3/	M-MR	M	R ^h	R ^h	R ^h
18	Pérola ^{1/}	3/	M-MR	M-S	R ^h	R ^h	R ^h
19	IAC-25 ^{2/}	3/	M	M	R ^h	R ^h	R ^h
20	IAC-47 ^{2/}	3/	M	M	R ^h	R ^h	R ^h

S = sensível; R^h = hipersensível; R = Resistente; MR = Moderadamente resistente; M = moderadamente sensível; S = Sensível; 1/ = variedades utilizadas no experimento 1; 2/ = variedades utilizadas nos experimentos 2 e 3; 3/ = genes de resistência ainda não identificados.

Figura 1. Folhas de diversas gramíneas as quais apresentaram sintomas de infecção natural por *Pyricularia* spp. Goiânia, 1985.

(da esquerda para a direita, *Cenchrus echinatus*, *Pennisetum setosum*, *Hyparrhenia rufa*, *Panicum maximum*, *Eleusine indica*, *Digitaria* sp., entre outros).

3.2. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.2.1. BATATA DEXTROSE ÁGAR (BDA)

Batata, 200,0g; dextrose, 20,0g; ágar, 15,0g e água destilada, para completar 1.000 ml.

3.2.2. AVEIA DEXTROSE ÁGAR (ADA)

Aveia, 40,0g; dextrose, 20,0g; ágar 15,0g e água destilada, para completar 1.000 ml.

3.2.3. MEIO DEFINIDO B (OU, 1972)

Sacarose, 30,0g; KNO_3 3,0g; uréia 0,5g; KH_2PO_4 , 1,0g; K_2HPO_4 1,0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,75mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,22mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,6mg; ZnCl_2 7,5mg; H_3BO_3 , 0,09mg; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,6mg; biotina 5,0µg; tiamina, 1,0mg; ágar, 15,0g e água destilada, para completar 1.000 ml.

3.2.4. MEIO LÍQUIDO DE BATATA SACAROSE (LEUNG, 1984)

Batata, 100g; sacarose, 10g e água destilada, para completar 1.000 ml.

3.2.5. SOLUÇÃO DE ALBUMINA E GLICERINA

Clara de um ovo filtrada, adicionada da mesma quantidade de glicerina. Como conservante, adicionou-se naf-talina.

3.2.6. TAMPÃO FOSFATO 0,5M pH 6,8

KH_2PO_4 , 3,77g; Na_2HPO_4 , 3,42g e água destilada 1.000 ml.

3.2.7. TAMPÃO TRIS-CITRATO 0,2M pH 8,3 (SCANDALIOS, 1969)

Trisma-base, 6,2g; ácido cítrico, 1,6g e água destilada, 1.000ml.

3.2.8. TAMPÃO TRIS-CITRATO 0,2M pH 8,3 MODIFICADO
(MACHADO, COM. PESSOAL)

Tampão tris-citrato 0,2M pH 8,3, 1.000 ml e
mercaptanol, 0,075 ml.

3.2.9. TAMPÃO LÍTIO-BORATO 0,2M pH 8,3 (SCANDALIOS,
1969)

Hidróxido de sódio (anidro), 1,2; ácido bórico
11,89 g e água destilada, 1.000ml.

3.2.10. TAMPÃO FOSFATO 0,2M pH 4,3 (SCANDALIOS, 1969)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 27,8g e água destilada, 1.000ml.

3.2.11. TAMPÃO FOSFATO 0,2M pH 9,2 (SCANDALIOS, 1969)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 53,63g e água destilada, 1.000
ml.

3.2.12. TAMPÃO TRIS-MALATO 0,2M PH 3,3 (SCANDALIOS, 1969).

Trisma-base, 24,2g; anidrido maléico, 19,6g e água destilada, 1.000 ml.

3.2.13. TAMPÃO HIDRÓXIDO DE SÓDIO 0,2M PH > 14 (SCANDALIOS, 1969).

Hidróxido de sódio, 7,99g e água destilada, 1.000ml.

3.2.14. TAMPÃO ACETATO 0,2M PH 4,0 (SCANDALIOS, 1969)

Ácido acético 0,2M, 410ml; acetato de sódio 0,2M, 90 ml e água destilada, 500ml.

3.2.15. TAMPÃO DH 0,018M PH 8,6 (AYALA, COM. PESSOAL)

Trisma-base, 6,72g; HCl (conc.), 0,9ml e água destilada, 1.000ml.

3.2.16. SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE AMÔNIA A 10%

Persulfato de amônia, 100g e água destilada,
1.000ml.

3.2.17. SOLUÇÃO DE AZUL DE BROMOFENOL A 0,1%

Azul de bromofenol, 1,0g e água destilada,
1.000ml.

3.2.18. SOLUÇÃO DE α -NAFTIL ACETATO A 1%

α -naftil acetato, 0,10g; acetona, 5ml e água
destilada, 5ml.

3.2.19. SOLUÇÃO DE β -NAFTIL ACETATO A 1%

β -naftil acetato, 0,10g e acetona, 10ml.

3.2.20. SOLUÇÃO DE $MgCl_2$ a 10%

$MgCl_2$, 1,00g e água destilada, 10ml.

3.2.21. SOLUÇÃO DE TWEEN 80 - 0,01%

Tween 80, 0,1ml e água destilada 1.000ml.

3.3. ISOLAMENTOS

Folhas com lesões similares a de *Pyricularia oryzae* em arroz foram coletadas de diversas gramíneas da região de Goiânia, GO. As lesões foram divididas ao meio e colocadas em tubos de ensaio contendo cerca de 0,5ml de água esterilizada. Os tubos foram selados com papel parafilme simulando uma atmosfera úmida. Após 24 horas, foram feitos isolamentos monospóricos das lesões esporulantes, utilizando-se microscópio adaptado com estilete sob um aumento de 100X. Cada conidiospóro foi cultivado em tubo de BDA, o qual permaneceu incubado à temperatura ambiente. Oito isolados foram selecionados para todos experimentos (Tabela 6 e Figura 1).

3.4. CARACTERÍSTICAS DE COLÔNIA

3.4.1. MORFOLOGIA

A morfologia das colônias foi observada nos

treze isolados descritos, os quais foram repicados de tubos estoques contendo BDA para placas com meio de aveia.

Após 10 dias de inoculação, à temperatura de 28-30°C, discos de micélio de 4mm de diâmetro foram inoculados no centro de placas contendo aproximadamente 25ml de meio de aveia, BDA e meio definido B.

As placas foram mantidas a temperatura de 28°C até o 11º dia, quando foram realizadas avaliações sobre a presença e cor do micélio aéreo, cor do micélio submerso visto pelo reverso da placa, presença de setores, presença de zonação e esporulação. As cores foram classificadas segundo a nomenclatura de RAYNER (1970).

3.4.2. CRESCIMENTO

Para determinação da curva e taxa de crescimento foram utilizadas as mesmas placas em que foram feitas observações morfológicas. Medidas transversas do diâmetro foram feitas no 3º, 5º, 7º, 9º e 11º dias, com auxílio de régua milimetrada.

3.4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Com o objetivo de avaliar a morfologia da colônia, padrão e taxa de crescimento nos três meios de cultura, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

A análise da variância dos fatores, isolados, meios e leituras, obedeceu o procedimento convencional sugerido para experimentos fatoriais (PIMENTEL GOMES, 1973). Desse modo, em cada tempo, a análise da variância foi realizada conforme esquema básico dado na Tabela 8.

Tabela 8. Esquema de análise da variância realizada para cada tempo sob delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos em arranjo fatorial.

Fontes de variação	G.L.	Q.M.	F
Meios (M)	m-1	QM_M	QM_M/QM_E
Isolados (I)	i-1	QM_I	QM_I/QM_E
M x I	(m-1) (i-1)	QM_{MI}	QM_{MI}/QM_E
Erro	m.i (r-1)	QM_E	

G.L. = número de graus de liberdade; Q.M. = quadrado médio; r = número de repetições; m=número de meios; i=número de isolados; QM_M =quadrado médio de meios; QM_I =quadrado médio de isolados; QM_{MI} =quadrado médio da interação entre meios e isolados; QM_E =quadrado médio do erro.

Além do teste F da análise da variância, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan (STEEL e TORRIE, 1980).

Como critério para identificar o tempo em que as diferenças entre os isolados foram significativas, utilizou-se a magnitude do valor $F = QM_I / QM_E$ e também as médias de crescimento dos isolados.

A fim de comparar o padrão de crescimento de cada isolado, em cada meio, ao longo do tempo, foi também realizada análise de variância, conforme esquema dado na Tabela 9. Nesta análise admitiu-se modelo de regressão linear para explicar o crescimento (variável y =diâmetro) com relação tempo (variável x =3; 5; 7; 9; 11 dias).

Para mensurar a adequação do modelo foi estimado em cada caso o coeficiente de determinação R^2 .

Tabela 9. Esquema da análise da variância do diâmetro ao longo do tempo de cada isolado em cada meio admitindo-se modelo de regressão linear.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Regressão Linear	1	SQ_b	QM_b	QM_b / QM_e
Desvios	$tr-2$	SQ_e	QM_e	
Total	$tr-1$			

r =número de repetições; t =número de leituras; SQ_b =soma de quadrados devida à regressão (b); SQ_e =soma de quadrados dos desvios; QM_b =quadrado médio devido à regressão (b); QM_e =quadrado médio dos desvios.

Com a finalidade de comparar as velocidades de crescimento, estimadas pelos coeficientes de regressão (b), foi feita uma análise de variância ponderada segundo procedimento de STEEL e TORRIE (1980).

Para mensurar a variância entre os coeficientes de regressão utilizou-se a expressão:

$$S_E^2(b) = \frac{\sum W_j (b_j - \bar{b})^2}{\sum W_j - 1}$$

W_j = inverso da estimativa da variância do coeficiente de regressão (b), utilizado como fator de ponderação.

$\bar{b}$ = média ponderada dos coeficientes de regressão estimados, ou seja: $\sum W_j \cdot b_j / \sum W_j$

A variância residual da média, que inclui tanto os efeitos de erro experimental como os desvios em relação ao modelo foi obtida pela expressão:

$$s_r^2(b) = \frac{\sum (gl)_j \cdot s^2(b)_j}{\sum (gl)_j}$$

onde: gl = graus de liberdade

Testes complementares, para comparar as velocidades de crescimento foram também realizados agrupando-se os isolados conforme critério pré-estabelecido por razões biológicas. Utilizou-se o teste F para detectar as diferenças entre os coeficientes de regressão (b), empregando-se a expressão:

$$F = \frac{s_E^2 (b)}{s_r^2 (b)}$$

3.5. CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS

3.5.1. INDUÇÃO DA ESPORULAÇÃO

As observações com relação a morfologia dos conídios foram realizadas com os treze isolados, os quais foram incubados em placas contendo meio de aveia a 28°C, sem iluminação, durante onze dias. Após esse período, o micélio aéreo foi removido com a ajuda de um pincel e água corrente. Em seguida, uma pequena quantidade de água foi deixada sobre cada colônia nas placas e, estas foram expostas à luz fluorescente, durante 24 horas, quando foram fechadas. Um dia depois, os conídios foram coletados. Os conídios dos treze isolados foram fotografados a seguir.

3.5.2. COLORAÇÃO DE NÚCLEO E DIMENSÃO DE CONÍDIOS

Com o objetivo de observar o número de núcleos de conídios dos treze isolados mencionados, utilizou-se a metodologia de coloração de TANAKA *et alii* (1979).

Esporos de *Pyricularia* spp. foram aderidos à lâmina através do uso de uma solução de albumina. A fixação dos espécimes foi feita com uma solução de álcool etílico e ácido acético (3:1) durante trinta minutos à temperatura ambiente. As lamínulas foram transferidas para álcool etílico a 95%, permanecendo ali por cinco minutos. Os materiais fixados foram colocados em álcool etílico a 70% e, a seguir, lavados com água destilada, por três vezes. Para a hidrólise foi utilizado HCl 1N a 60°C por três a cinco minutos, seguindo-se lavagem com água destilada por três vezes. As lamínulas foram então colocadas em solução de Giemsa (Merck), diluída duas a três vezes com tampão fosfato 0,5M pH 6,8, por trinta a quarenta minutos. A seguir, foram lavadas com o mesmo tampão, sendo que o excesso de água das lamínulas coradas foi retirado com papel absorvente. Para vedação foi utilizado esmalte incolor ou parafina.

As fotomicrografias coloridas foram obtidas no Photomikroskop III Carl Zeiss e Olympus BH-II com filme Fuji ASA 100.

Comprimento e largura de 50 conídios por isolado, tomados ao acaso, foram medidos com auxílio de uma ocular

micrométrica adaptável Baush & Lomb · previamente calibrada para a objetiva de 40X.

3.5.3. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para comparar as dimensões de conídios comprimento (C); largura (L) e quociente (C/L) dos treze isolados, foram feitas análises da variância e verificadas as respectivas significâncias dos efeitos. A comparação de médias das medidas acima citadas, foi também feita pelo teste de Tukey de acordo com PIMENTEL GOMES (1973).

3.6. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Com objetivo de verificar a diversidade enzimática entre os treze isolados de *Pyricularia* foi utilizada a técnica de eletroforese horizontal em gel de acrilamida e amido. Cinco sistemas enzimáticos: esterases, leucina, aminopeptidase, fosfatase ácida, superóxido dismutase (acrilamida) e malato desidrogenase (amido) foram estudados, utilizando-se o sistema de tampão descontínuo descrito por SCANDALICS (1969).

3.6.1. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ELETROFORESE

A produção de micélio foi realizada em meio líquido de batata-sacarose. Tubos de ensaio (150mm x 15mm) contendo 8ml de meio foram incubados com pedaços de micélio de cada um dos treze isolados mencionados e mantidos a temperatura ambiente. Após sete dias de incubação, o micélio de cada isolado foi lavado com tampão tris-citrato 0,2M pH 8,3, secado com papel absorvente e pesado. Proporções iguais de micélio e tampão tris-citrato adicionado de 0,0075% de mercaptanol, foram usados na preparação de cada amostra. A homogeneização foi feita com bastões de vidro esmerilhado em placas de acrílico escavadas. Durante todo o processo de preparação das amostras, a placa foi mantida sobre uma cuba de gelo.

3.6.2. PREPARAÇÕES DOS GÉIS

3.6.2.1. Acrilamida

Para a preparação da solução estoque foram utilizadas 60g de CIANOGLUN 41 (95% acrilamida e 5% bis-acrilamida), 1000ml de tampão tris-citrato 0,2M pH 8,3 e 1 ml de TE-MED (diamina de N, N,N,N'-tetrametileno-diamina). Retirou-se

70ml da mesma e adicionou-se 0,7ml de persulfato de amônia a 10% para a preparação de gel para ser vertido em canaleta de vidro de 18 x 15 x 0,2cm. Após a cobertura da canaleta com placa de vidro, o gel foi mantido por 20 minutos à temperatura ambiente para ocorrer a polimerização e depois foi armazenado em câmara fria até sua utilização. Poucos minutos antes da aplicação das amostras, a tampa da placa foi retirada. O gel sobre o suporte foi então perfurado a 3cm da extremidade, com o auxílio de um pente de aço com dentes de 4mm de largura. O gel foi coberto com plástico "ZAP" para evitar a dessecação até a aplicação das amostras.

3.6.2.2. Amido

Foram utilizadas 9g de amido hidrolizado de batata acrescidos de 100ml de tampão lítio borato 0,2M pH 8,3 e tris-citrato 0,2M pH 8,3 (1:9). Foi feito cozimento em frasco Kitasato (500 ml) sobre bico de Bunsen até que a mistura ficasse transparente. As bolhas de ar surgidas foram eliminadas pela aplicação de vácuo por aproximadamente um minuto. A solução foi imediatamente vertida no suporte que, por sua vez, foi coberto com a tampa de vidro. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente, sendo posteriormente mantido sob refrigeração por cerca de doze horas. Após a solidificação, foi feito descolamento do gel das paredes do suporte e, na parte de cima

foi posta uma tira de papel absorvente para evitar que o gel partisse. Em seguida, o mesmo pente metálico acima citado, foi usado para marcar o gel e, o plástico ZAP foi utilizado para cobri-lo.

3.6.3. APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizados os retângulos de papel Whatman 3 MM com dimensões de 4,0 x 1,5mm para aplicar o extrato dos fungos dos orifícios da placa escavada, para os orifícios do gel. Com o objetivo de acompanhar a corrida eletroforética foi colocado um retângulo de papel embebido em solução de azul de bromofenol à 0,1%. O procedimento para a aplicação das amostras no gel de amido foi o mesmo que o citado acima.

3.6.4. MIGRAÇÃO

Após a aplicação das amostras, procedeu-se a corrida eletroforética em cuba horizontal ligada à fonte estabilizadora à temperatura aproximada de 4°C. Inicialmente, a voltagem foi de 90V. Alguns minutos após foi ajustada para 120V (10V por cm entre as pontes). Empregou-se o tampão lítio borato 0,2M pH 8,3 nos eletródios. A ponte entre o tampão e o gel foi feita com papel de filtro dobrado cinco vezes. A fonte

foi desligada quando a linha de frente atingiu 9cm do ponto de aplicação das amostras, aproximadamente quatro horas depois.

3.6.5. COLORAÇÃO E FIXAÇÃO DOS GÉIS

A revelação de esterase foi realizada utilizando-se uma solução de 1ml de α -naftil acetato e 1ml de β -naftil acetato a 1%, 80mg de sal Fast Blue RR, 25ml de tampão fosfato pH 4,3 0,3M, 5ml de tampão fosfato pH 9,2 0,2M e 40ml de água destilada. Após cerca de duas horas de incubação a 37°C, o gel foi lavado em água corrente e fixado na solução de álcool etílico, água e ácido acético (5:5:1).

A revelação de leucina amino-peptidase (LAP) foi feita utilizando-se uma solução de 10mg de L-leucil β -naftilamina HCl, 20mg de sal Black-K, 25ml de tampão tris-malato pH 3,3 0,2M, e 10 ml de tampão hidróxido de sódio pH>14 0,2M. Após quatro horas de incubação a 37°C, o gel foi lavado e água corrente e fixado em uma solução de álcool etílico: água:ácido acético (5:5:1).

A revelação da fosfatase ácida (FAC) foi feita utilizando-se uma solução de 100mg de α -naftil ácido fosfatase, 100mg de Fast Garnet GBC, 10 gotas de solução aquosa a 10% de $MgCl_2$, 3ml de etanol e 100ml de tampão acetato pH 4,0 0,2M. Após cerca de três horas de incubação a 37°C, o gel foi

lavado em água corrente e fixado em uma solução de álcool etílico: água: ácido acético (5:5:1).

A revelação da superóxido dismutase (SOD) foi feita utilizando-se uma solução de 0,003g de PMS, 0,01g de NBT, 0,075g de EDTA e 50ml de tampão tris-HCl 0,018M pH 8,6. Após cerca de doze horas de exposição à luz fluorescente, à temperatura ambiente, o gel foi lavado em água corrente e fixado com a solução de álcool etílico: água:ácido acético (5:5:1).

A revelação de malato desidrogenase (MDH) foi feita utilizando-se uma solução pré-banho com 4,9mg de NaCN, 0,1 ml de H_2O_2 e 100 ml de tampão tris-HCl pH 8,3 por trinta minutos. Logo após o gel foi imerso em uma solução corante com 10mg de NBT, 13 mg de NAD, 38mg de L-ácido málico, 3mg de PMS e 50ml de tampão tris-HCl 0,018M pH 8,6. Após cerca de duas a três horas de incubação a 37°C o gel foi lavado com água corrente e fixado em solução de álcool etílico: água:ácido acético (5:5:1) diluída três vezes.

3.6.6. CONDICIONAMENTO DOS GÉIS

Os géis foram plastificados com papel celofane e bastidores de madeira.

3.6.7. ANÁLISE DOS GÉIS

A mobilidade relativa (Mr) foi calculada usando-se a banda mais comum como padrão para cada sistema enzimático. O índice de diversidade foi calculado através da somatória das diferenças isoenzimáticas (carga elétrica, estrutura molecular e atividade) entre todas as combinações de isolados (dois a dois) nos cinco sistemas estudados de acordo com HEIDRICH-SOBRINHO (1974).

3.7. INOCULAÇÃO CRUZADA

A fim de verificar as relações entre isolados de *Pyricularia* e várias espécies de gramíneas e variedades de arroz, foram feitos três experimentos de inoculação cruzada no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF) em Goiânia, GO.

3.7.1. VARIEDADES DIFERENCIAIS DE ARROZ

As variedades diferenciais utilizadas nestes experimentos incluem 16 diferenciais de Kiyosawa e da série Internacional, as quais foram utilizadas por TANAKA (1985), além de duas variedades nativas brasileiras ou duas variedades

cultivadas, dependendo do experimento (Tabela 7).

3.7.2. GRAMÍNEAS

Foram coletadas sementes de gramíneas não cultivadas na região de Goiânia, GO. Outras sementes foram obtidas do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Área de Sementes. A Tabela 10 mostra as espécies utilizadas no experimento 1, 2 e 3.

3.7.3. PLANTIO E MATERIAL EXPERIMENTAL

Sementes de arroz e outras gramíneas foram semeadas em bandejas de plástico (28 x 16 x 12cm) contendo solo adubado. Cada sete quilos de solo peneirado de banco de rio foram adubados com 2g de zinco, 3g de KCl, 5g de NH_4SO_4 , 15g de superfosfato simples e 25g de calcário. O plantio das gramíneas foi feito cinco dias antes do plantio de variedades de arroz. O número de sementes semeadas variou com a germinação de cada espécie de gramínea não cultivada. Entretanto, em alguns casos mesmo tendo semeado mais sementes para as espécies com má germinação, não foi obtido um bom "stand". Em vista disso, algumas espécies foram trocadas por outras. Oito a

Tabela 10. Espécies de plantas não cultivadas utilizadas nos experimentos de inoculação cruzada de *Pyricularia* spp. Goiânia, GO, 1985.

Identificação	Nome científico	Nome comum	Procedência
1	<i>Cenchrus echinatus</i> L.	Capim carrapicho	Goiânia, GO.
2	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn	Capim pê-de-galinha	Goiânia, GO.
3	<i>Panicum maximum</i> Jacq. *1	Capim colônia	Goiânia, GO
4	<i>Panicum maximum</i> Jacq.	Tobiata	Londrina, PR.
5	<i>Digitaria horizontalis</i>	Capim colchão	Goiânia, GO.
6	<i>Cyperus rotundus</i> L. *2	Tiririca	Londrina, PR.
7	<i>Paspalum paniculatum</i>	Capim-de-burro	Goiânia, GO.
8	<i>Paspalum notatum</i> Flugge	Grama batatais	Goiânia, GO.
9	<i>Brachiaria plantaginea</i> (Link) Hitch	Capim marmelada	Goiânia, GO.
10	<i>Eragrostis pilosa</i>	Capim panasco	Goiânia, GO.
11	<i>Paspalum paniculatum</i>	Capim-de-burro	Goiânia, GO.
12	<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) *1 Beauv.	Capim arroz	Goiânia, GO.
13	<i>Setaria geniculata</i> (Lam.) Beauv. *3	Capim rabo-de-gato	Goiânia, GO.
14	<i>Rhynchosyris roseum</i> (Nees) Stapf. et Hubb	Capim favorito	Goiânia, GO.
15	<i>Digitaria horizontalis</i> (L.) Scop *4	Capim colchão	Londrina, PR.
16	<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers. *5	Capim massambarã	Londrina, PR.
17	<i>Hyparrhenia rufa</i> (Nees) Stapf	Capim jaraguã	Goiânia, GO.
18	<i>Acanthospermum australe</i> (Loef) O. Kuntze *6	Carrapichinho	Londrina, PR.

*1 = Plantio II e III trocado por *Pennisetum setosum* (Swartz) L.; Capim oferecido, Goiânia, GO.

*2 = Plantio II e III trocado por *Panicum maximum* Jacq.; Capim colônia, Goiânia, GO.

*3 = Plantio II e III trocado por *Setaria nigricostis*; Setaria, Londrina, PR.

*4 = Plantio II e III trocado por *Eragrostis pilosa*; Goiânia, GO.

*5 = Plantio II e III trocado por *Andropogon* sp.; Capim andropogon, Londrina, PR.

*6 = Plantio II e III trocado por *Cenchrus echinatus* L.; carrapicho vermelho, Goiânia, GO.

dez sementes de cada variedade de arroz foram semeadas. As bandejas foram então mantidas em casa de vegetação, onde a temperatura variou de 25 a 35°C. As plantas foram irrigadas duas vezes por dia.

3.7.4. INOCULAÇÃO

O inóculo foi preparado utilizando-se, duas a três placas de cada isolado (item 3.5.1) as quais foram lavadas com pincel e água destilada adicionada de TWEEN 80 a 0,01%. Posteriormente 50ml da referida suspensão contendo 10^4 esporos/ml foram pulverizados nas plantas quando o arroz chegou no estágio 4-5 folhas (20 dias após a semeadura). Para tal, utilizou-se pulverizador acoplado ao compressor (Bullcraft 85W, Japão) e câmara de pulverização de plástico grosso. Em seguida, as bandejas foram colocadas em câmara úmida à 25-30°C por 24 horas. Após esse período, as mesmas foram transferidas para estufa com temperatura ambiente (25-35°C) até que pudessem ser avaliadas, sete dias após.

3.7.5. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES DOS HOSPEDEIROS

A patogenicidade dos treze isolados às gramíneas não cultivadas foi avaliada de acordo com o aparecimento de lesões nas folhas. Estas folhas afetadas foram postas em câmara úmida durante cerca de 24 horas, quando foi verificada a existência de esporulação. Em caso afirmativo, o isolado ensaiado foi considerado patogênico à espécie afetada (+). As lesões que não esporularam após permanecerem em câmara úmida, foram consideradas reações de hipersensibilidade (R). Quando não houve lesões nas plantas, considerou-se que o isolado inoculado não foi patogênico (-) nas condições ensaiadas, e M quando apresentaram lesões esporulantes e pequenas em poucas plantas.

A virulência dos treze isolados de *Pyricularia* às dezoito variedades diferenciais de arroz foi determinada de acordo com a metodologia utilizada por TANAKA (1985) modificada. As lesões foram classificadas em quatro tipos: a) mancha marron; b) lesão pequena branca ou cinza com margem marrom; c) lesão grande branca ou cinza com margem marrom e d) lesão grande ou cinza com margem púrpura ou descolorida. De acordo com o número de cada tipo de lesão em cada folha, os isolados tiveram sua virulência determinada: "-" folhas sem lesão, "+" folhas com lesões do tipo c e d, "R" folhas com lesões do tipo A, "M" folhas com lesões do tipo a e b.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE COLÔNIA

4.1.1. MORFOLOGIA

Os resultados das análises dos caracteres de morfologia de colônia (presença e coloração de micélio aéreo, coloração de micélio submerso, presença de setores e zonação e intensidade de esporulação) dos treze isolados de *Pyricularia* s-p., nos três meios ensaiados, de acordo com o item 3.4.1., aparecem nas Tabelas 11, 12 e 13 e Figura 2.

Foi observado que no meio definido B, o micélio aéreo de todos os isolados foi mais evidente que no meio de aveia e escasso ou pouco evidente no meio BDA. A coloração cinza do micélio aéreo e textura aveludada foi típica para

Tabela 11 - Características de colônia de 13 isolados de *Pyricularia* spp. em meio de aveia.

Isolados	Características de colônia				
	Presença de micélio aéreo ¹	Coloração de micélio aéreo	Coloração de micélio submerso	Presença de setores ²	Presença de esporulação ²
39	+	Branca	Preto oliváceo (108)	-	++
303	+++	Cinza fumaça (105)	Verde oliváceo (90)	+	++
11	+++	Cinza fumaça (105)	Preto oliváceo (1080)	+	++
		Branca			
240	+++	Cinza fumaça (105)	Preto oliváceo	+	+++
		Branca			
431	+++	Cinza fumaça (105)	Preto oliváceo	+	+++
E-107	+++	Cinza fumaça (105)	Oliváceo (48)	+	+
		Branca			
E-105	+++	Cinza fumaça (105)	Mel (64)/Oliváceo (48)	+	+
		Branca			
E-104	+	Cinza fumaça (105)	Preto oliváceo (108)	+	++
		Branca			
4	+++	Cinza fumaça (105)	Preto oliváceo (108)	+	+++
		Branca			
3	+++	Cinza fumaça (105)	Preto oliváceo (108)	+	+++
		Branca			
5	-	-	Verde oliváceo (90)	+	-
CO-100	+++	Cinza fumaça (105)	Verde oliváceo (90)	-	++
		Branca			
C-104	++	Cinza fumaça (105)	Verde oliváceo (90)	-	++

¹ Abundante +++, Regular ++, Escassa +, Ausente -.² Presença +, Ausência -.

Tabela 12. Características de colônia de 13 isolados de *Pyricularia* spp. em meio definido B.

Isolados	Características de Colônia				
	Presença de micélio aéreo 2/	Coloração de micélio aéreo	Coloração de micélio submerso	Presença de setores 2/	Presença de Esporulação
39	+++	Branca	Preto oliváceo (108)	-	+
303	+++	Branca	Primrose (66)	-	++
11	+++	Cinza fumaca (106)	Preto oliváceo (108)	-	+
240	+++	Branca	Verde grana escuro (09)	-	++
431	+++	Cinza fumaca (105)	Preto oliváceo (108)	+	++
E-107	+++	Branca	Cinza oliváceo (107)	+	+
			Branca		
E-105	+++	Branca	Cinza oliváceo (107)	+	+
			Branca		
E-104	+++	Cinza fumaca (105)	Preto oliváceo (108)	+	+
		Branca			
4	+++	Cinza fumaca (105)	Preto oliváceo (108)	-	++
		Amarelo			
3	+++	Cinza fumaca (105)	Preto oliváceo (108)	+	+
		Amarelo			
5	+++	Cinza fumaca (105)	Mel (64)	-	+
		Branca			
CO-100	+++	Branca	Primrose (66)	-	+
C-104	+++	Branca	Mel (64)	-	-

1/ Abundante: +++, Regular: ++, Escassa: +, Ausente: -.

2/ Presença: +, Ausência: -

Tabela 13. Características de colônia de 13 isolados de *Pyricularia* spp. em meio BDA.

Isolados	Características de Colônia				
	Presença de micélio aéreo 1/	Coloração de micélio aéreo	Coloração de micélio submerso	Presença de setores 2/	Presença de zonação 2/
39	++	Branca	Preto oliváceo (108)	-	-
303	+	Branca	Citrino (13)	+	+
11	+	Cinza Fumaça (105)	Preto oliváceo (108)	+	+
240	+	Branca	Preto oliváceo (108)	+	+
431	-	-	Citrino (13)	-	+
			Mel (64)	-	+
E-107	+	Branca	Preto oliváceo (108)	-	+
E-105	+	Branca	Mel (64)	-	+
			Preto oliváceo (108)	-	+
E-104	+	Branca	Mel (64)	+	-
			Preto oliváceo (108)	+	+
4	+	Branca	Mel (64)	-	++
			Citrino (13)	-	+
3	+	Branca	Mel (64)	-	++
			Citrino (13)	-	+
5	+	Branca	Verde oliváceo (90)	-	+
CO-100	+	Branca	Branca	-	+
C-104	-	-	Citrino (13)	+	+

1/ Abundante: +++, Regular: ++; Escassa: +; Ausente: -

2/ Presença: +, Ausência: -

quase todos os isolados no meio de aveia, enquanto no meio de finido B, o micélio aéreo branco algodinoso foi mais comum.

O micélio submerso nos três meios considerados apresentou gradações de oliváceo, especialmente preto oliváceo, embora aparecessem também as cores: mel, citrine e primrose, segundo dicionário de cores de Rayner (1970). A variação dessa característica dentro do grupo de isolados dos mesmos hospedeiros (*O. sativa*, *E. indica* e *P. maximum*), foi constatada, assim como a similaridade entre isolados de *H. rufo* e *P. setosum* e a raça 431 de *O. sativa*.

Em dez dos treze isolados ensaiados foi evidenciada a presença de setores no meio de aveia seguindo-se o meio definido B e o meio BDA.

O aparecimento de zonação entre todos os isolados foi mais comum nos meios BDA e definido B e raro (apenas um isolado) em meio de aveia.

De maneira geral, o meio de aveia favoreceu a esporulação dos isolados; o meio definido B favoreceu medianamente e, no meio BDA ela foi escassa para a maioria dos isolados ensaiados.

Dois isolados de *E. indica* (E-105 e E-104) revelaram diferenças morfológicas entre as três repetições utilizadas neste experimento.

Figura 2. Morfologia de colônia de isolados de *Pyricularia* spp. em meio de aveia, definido B e BDA.

1. 39	6. E-107	11. C-104
2. 303	7. E-105	12. CO-100
3. 11	8. E-104	13. 5
4. 240	9. 4	
5. 431	10. 3	

4.1.2. CRESCIMENTO

Para a avaliação do crescimento foi realizada análise de variância do diâmetro de colônia, de treze isolados de *Pyricularia* spp. medido nos três meios citados, sete dias após a inoculação, segundo o item 3.4.2., com os resultados que constam na Tabela 14.

A comparação de médias de diâmetro medido sete dias após a inoculação, pelo teste de Duncan ($P > 0,05$), aparece na Tabela 15.

Tabela 14. Análise da variância do diâmetro, sete dias após a inoculação, de treze isolados de *Pyricularia* spp. em meio de aveia, definido B e BDA.

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios de cultura	2	23,0214	11,5107	541,96**
Isolados	12	30,8481	2,5707	121,26**
Meios x isolados	24	14,2216	0,5926	27,95**
Tratamentos	38	68,0910	1,7919	84,52**
Resíduo	71	1,5050	0,0212	
Total	109	69,5960		
Coeficiente de variação: % 2,92				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 15. Comparação de médias de diâmetro sete dias após inoculação de isolados de *Pyricularia* spp., em três meios, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Isolados	Hospedeiro	Média ^{1/}
E-104	<i>Eleusine indica</i>	5,64 a
E-105	<i>Eleusine indica</i>	5,26 b
E-107	<i>Eleusine indica</i>	5,25 b
39	<i>Oryza sativa</i>	5,24 b
240	<i>Oryza sativa</i>	5,21 b
303	<i>Oryza sativa</i>	5,20 b
11	<i>Oryza sativa</i>	5,20 b
3	<i>Pennisetum setosum</i>	5,16 b
4	<i>Hyparrhenia rufa</i>	5,11 b
431	<i>Oryza sativa</i>	4,88 c
CO-100	<i>Panicum maximum</i>	4,71 d
5	<i>Panicum maximum</i>	4,49 e
C-104	<i>Cenchrus echinatus</i>	3,35 f

^{1/} Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente a nível de 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados nos Apêndices 1, 2 e 3 mostram a análise da variância do padrão de crescimento, dos treze isolados em cada meio de cultura, ao longo do tempo, admitindo-se o modelo de regressão linear, como visto, no item 3.4.3.

A tabela 16 apresenta as velocidades médias de crescimento dos treze isolados, através do coeficiente de regressão (b), e comparações das mesmas pelo teste F da análise da variância ponderada, segundo o procedimento preconizado por STEEL e TORRIE (1980).

Tabela 16. Coeficiente de regressão entre diâmetro de colônia (mm) e tempo de incubação. Meios de cultura, agrupamentos de isolados, média dos coeficientes de regressão ($\bar{b}$), respectivas variâncias estimadas e significâncias.

Meios	Agrupamentos	$\bar{b}$	$S^2_{\bar{b}}$	$S^2_{\bar{r}}$	F
Aveia	A + G	6,8	0,79	0,06	13,17**
	A	7,2	0,05	0,04	1,25 ^{ns}
	G	6,4	1,13	0,07	16,14**
	G - 3 e 4	6,2	1,30	0,08	16,25**
	A + 3 e 4	7,2	0,04	0,04	1,00 ^{ns}
BDA	A + G	6,9	0,45	0,04	11,25**
	A	6,9	0,06	0,02	3,00**
	G	6,9	0,77	0,05	15,40**
	G - 3 e 4	6,8	0,94	0,06	15,67**
	A + 3 e 4	7,0	0,08	0,02	4,00**
B	A + G	6,4	0,68	0,04	17,00**
	A	6,6	0,08	0,02	4,00**
	G	6,2	1,16	0,05	23,20**
	G - 3 e 4	5,3	0,83	0,06	13,83**
	A + 3 e 4	6,8	0,10	0,02	5,00**

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

ns = não significativo

1/. A = arroz

. G = gramíneas não cultivadas

. 3 e 4 = isolados de gramíneas não cultivadas

A Figura 3 mostra crescimento diferencial (diâmetro) de cada isolado nos três meios ao longo do tempo de incubação.

Figura 3. Curva de crescimento de 13 isolados de *Pyricularia* spp. nos meios - aveia, BDA e definido B.

4.2. CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS

4.2.1. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE NÚCLEOS

Adotando a técnica previamente descrita no ítem 3.5.2., cada célula dos cinquenta conídios observados de cada isolado apresentou-se uninucleada, como mostra a Figura 4.

Figura 4. Conídios de treze isolados de *Pyricularia* spp. sem e com tratamento com GIEMSA, respectivamente.

1. 39	4. 431	7. 3	10. E-107	13. C-104
2. 303	5. 11	8. E-104	11.5	
3. 240	6. 4	9. E-105	12. CO-100	

4.2.2. DIMENSÃO DOS CONÍDIOS

Os isolados de *Pyricularia* spp. ensaiados tinham conídios piriformes, tricelulares, hialinos com apêndice basal conforme a descrição das espécies deste gênero (Figura 4). As dimensões médias do comprimento (C), largura (L) dos conídios coloridos de cada isolado obtidos de acordo com o item 3.5.2. assim como seus desvios padrões e amplitudes, e também o coeficiente (C/L) seus respectivos desvios padrões aparecem na Tabela 17.

A análise da variância e respectivo teste F do comprimento (C), largura (L) e coeficiente (C/L) estão no Apêndice 4. A comparação das médias destas dimensões através do teste de Tukey ($P > 0,05$) aparece na Tabela 18.

4.3. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

4.3.1. ZIMOGRAMAS

Técnicas eletroforéticas têm sido empregadas objetivando um melhor entendimento de processos genético-bioquímicos. Neste estudo, seguindo-se técnicas descritas anteriormente (item 3.6.) foram obtidos os zimogramas das esterases (EST), leucina aminopeptidase (LAP), fosfatase ácida (FAC) superóxido dismutase (SOD) e malato desidrogenase, os quais podem ser observados nas figuras 5, 6, 7, 8 e 9.

Tabela 17. Médias, desvios padrões e amplitude de comprimento, largura e média e desvio padrão do coeficiente de conídios de isolados de *Pynicularia* spp.

Linhagens	Medidas em micrômetros							
	Comprimento	Amplitude	Largura	Amplitude	Coeficiente (C/L)			
	m ± s		m ± s		m ± s			
3	33,06	3,13	26,4-45,2	11,14	1,03	8,4-12,0	2,99	0,34
431	32,02	3,39	24,0-38,4	10,78	0,89	9,6-12,0	2,99	0,38
39	31,09	3,31	24,0-36,0	8,86	0,87	7,2- 9,6	3,55	0,54
4	30,24	4,02	21,6-39,6	9,53	1,44	7,2-12,0	3,23	0,60
240	27,70	3,32	21,6-36,0	10,56	1,26	7,2-12,0	2,66	0,44
303	27,57	3,04	22,8-36,0	10,25	1,14	7,2-12,0	2,71	0,35
E-105	27,17	2,18	22,8-33,6	8,46	0,90	7,2- 9,6	3,19	0,44
E-104	26,14	2,19	21,6-31,2	8,56	1,05	7,2-10,8	3,09	0,36
C-104	25,39	1,98	21,6-30,0	7,97	0,72	7,2- 9,6	3,21	0,35
5	25,38	1,85	21,6-31,2	7,73	0,65	7,2- 9,6	3,31	0,28
E-107	25,15	1,78	21,6-28,8	8,11	0,89	7,2-10,8	3,13	0,37
11	24,43	2,28	18,0-31,2	9,30	0,81	7,2-10,8	2,64	0,35
CO-100	20,50	1,98	16,8-26,4	7,13	0,66	6,0-8,4	2,90	0,41

Tabela 18. Comparação de médias de comprimento (C), largura (L) e quociente (C/L) de 13 isolados de *Pyricularia* spp. pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Isolados	Médias ^{1/}		
	Comprimento (C)	Largura (L)	Quociente (C/L)
3	33,06 a ^{2/}	11,14 a	2,99 cd
431	32,02 ab	10,78 ab	2,99 cd
39	31,09 b	8,86 de	3,55 a
4	30,24 b	9,53 c	3,23 bc
240	27,70 c	10,56 ab	2,66 e
303	27,57 c	10,25 b	2,71 e
E-105	27,17 cd	8,62 ef	3,19 bc
E-104	26,14 cde	8,54 efg	3,09 bcd
C-104	25,39 de	7,97 gh	3,21 bc
5	25,38 de	7,70 hf	3,31 ab
E-107	25,15 e	7,97 fgh	3,13 bcd
11	24,43 e	9,34 cd	2,64 e
CO-100	20,50 f	7,13 i	2,90 de

2/ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a nível de 5% de probabilidade.

1/ Médias de 50 esporos.

Figura 5. Zimograma de esterasas de treze isolados de *Pyricularia* spp.

1. E-104	4. C-104	7. 4	10. 431	13. 303
2. E-105	5. CO-100	8. 5	11. 240	
3. E-107	6. 3	9. 39	12. 11

Figura 6. Zimograma de leucina aminopeptidase de treze isolados de *Pyricularia* spp.

1. E-104	4. C-104	7. 4	10. 431	13. 303
2. E-105	5. CO-100	8. 5	11. 240	
3. E-107	6. 3	9. 39	12. 11

Figura 7. Zimograma de fosfatase ácida de treze isolados de *Myricinularia* spp.

1. E-104 4. C-104 7. 4 10. 431 13. 303
 2. E-105 5. CO-100 8. 5 11. 240
 3. E-107 6. 3 9. 39 12. 11

Figura 8. Zinograma de superóxido dismutase de treze isolados de *Pynicularia* spp.

1. E-104	4. C-104	7. 4	10. 431	13. 303
2. E-105	5. C0-100	8. 5	11. 240	
3. E-107	6. 3	9. 39	12. 11	

Figura 9. Zimogramas de malato desidrogenase de treze isolados de *Pyricularia* spp.

1. E-104	4. C-104	7. 4	10. 431 - 13. 303
2. E-105	5. CO-100	8. 5	11. 240
3. E-107	6. 3	9. 39	12. 11

4.3.2. DIVERSIDADE ENZIMÁTICA

O índice específico de diversidade enzimática, calculado de acordo com o item 3.6.7., é apresentado na Tabela 19.

Tabela 19. Índice de diversidade (ID) dos treze isolados de *Pyricularia* spp. tomados dois a dois.

Isolados	ID	Isolados	ID	Isolados	ID
E-105 x E-104	0	E-104 x E-107	0	E-107 x CO-100	13
E-105 x E-107	0	E-104 x C-104	15	E-107 x 431	8
E-105 x C-104	15	E-104 x CO-100	13	E-107 x 303	8
E-105 x CO-100	13	E-104 x 431	8	E-107 x 240	8
E-105 x 431	8	E-104 x 303	8	E-107 x 39	8
E-105 x 303	8	E-104 x 240	8	E-107 x 11	8
E-105 x 240	8	E-104 x 39	8	E-107 x 3	8
E-105 x 39	8	E-104 x 11	8	E-107 x 4	8
E-105 x 11	8	E-104 x 3	8	E-107 x 5	8
E-105 x 3	8	E-104 x 4	8	C-104 x CO-100	16
E-105 x 4	8	E-104 x 5	8	C-104 x 431	16
E-105 x 5	8	E-107 x C-104	15	C-104 x 303	16
C-104 x 240	16	431 x 303	0	240 x 11	0
C-104 x 39	16	431 x 240	0	240 x 3	0
C-104 x 11	16	431 x 39	0	240 x 4	0
C-104 x 3	16	431 x 11	0	240 x 5	0
C-104 x 4	16	431 x 3	0	39 x 11	0
C-104 x 5	16	431 x 4	0	39 x 3	0
CO-100 x 431	14	431 x 5	0	39 x 4	0
CO-100 x 303	14	303 x 240	0	39 x 5	0
CO-100 x 240	14	303 x 39	0	11 x 3	0
CO-100 x 39	14	303 x 11	0	11 x 4	0
CO-100 x 11	14	303 x 3	0	11 x 5	0
CO-100 x 3	14	303 x 4	0	3 x 4	0
CO-100 x 4	14	303 x 5	0	3 x 5	0
CO-100 x 5	14	240 x 39	0	4 x 5	0

A somatória dos índices específicos dá origem ao índice de diversidade geral apresentado na Tabela 20.

Tabela 20. Índice de diversidade (ID) geral de treze isolados de *Pyricularia* spp.

Isolados	ID
C-104	189
CO-100	167
E-105	92
E-104	92
E-107	92
431	54
303	54
240	54
39	54
11	54
3	54
4	54
5	54

4.4. INOCULAÇÃO CRUZADA

4.4.1. ISOLADOS

A reação das dezoito variedades de arroz e de outras gramíneas à inoculação das raças de brusone do arroz (431, 240, 11, 39 e 303) e isolados de espécies de gramíneas (E-107, E-104, E-105, C-104, CO-100, 3, 4 e 5) segundo a metodologia do item 3.7. e Figura 10 aparecem nas Tabelas 21, 22 e 23 e Figura 11.

Figura 10. Procedimentos dos experimentos de inoculação de isolados de *Pyricularia* spp. Goiânia, 1985.

1. Produção de esporos sob luz fluorescente
2. Bandejas de arroz e gramíneas em casa de vegetação.
3. Bandejas com plantas inoculadas em câmara úmida.
4. Bandejas com plantas inoculadas, após a câmara úmida.
5. Sintomas de brusone do arroz.
6. Sintomas de brusone em gramíneas.

Figura 11. Sintomatologia da inoculação de alguns isolados de *Pyricularia* spp. em algumas espécies de gramíneas, Goiânia, GO, 1985.

1. Isolado E-105 (*Eleusine indica*) em *E. indica*
2. Isolado CO-100 (*Panicum maximum*) em *P. maximum*
3. Isolado 4 (*Hyparrhenia rufa*) em *Paspalum paniculatum*
4. Isolado E-104 (*E. indica*) em *Paspalum notatum*
5. Isolado CO-100 (*P. maximum*) em *Eragrostis pilosa*
6. Isolado C-104 (*Cenchrus echinatus*) em *C. echinatus*

Tabela 21. Padrões de reação de cinco raças de *Puccinia* spp. provenientes do arroz e oito isolados de outras gramíneas à série diferencial de variedades de arroz e outras gramíneas. Goiânia, GO, 1985.

Variedade	Raça 1/					Isolado 2/							
	39	303	240	431	11	4	3	5	E-105	E-104	E-107	C-104	CO-100
Shin 2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Aichi Asahi	+	+	+	+	+	+	+	R	-	-	-	-	-
Fujisaka	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Kanto 51	+	-	+	+	+	+	+	R	-	-	-	-	-
Tsuyuake	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fukunishiki	R	R	-	+	R	R	+	-	-	-	-	-	-
K 1	+	+	+	+	+	R	+	-	-	-	-	-	-
Pi nº 4	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toride 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K 60	+	R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
BL 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K 59	+	+	R	R	+	-	R	-	-	-	-	-	-
K 3	R	R	+	R	-	-	R	-	-	-	-	-	-
Kusabue	R	-	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Zenith	+	R	R	R	+	-	R	-	-	-	-	-	-
K 2	+	R	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Matão	+	-	R	R	-	-	R	-	-	-	-	-	-
Pérola	+	-	+	R	-	-	R	-	-	-	-	-	-
Gramíneas													
C. Carrapicho	R	-	R	+	-	-	+	-	R	-	R	+	-
C. Pé-de-galinha	R	R	R	R	-	-	R	R	+	R	+	-	-
C. colônia	R	R	-	R	-	+	R	-	R	-	+	-	+
C. colônia	R	R	-	R	-	+	+	-	R	0	-	0	-
C. colchão	-	R	-	-	-	+	+	-	+	-	R	-	-
Tizirica	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
C. de burro	-	R	+	R	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Gram. batatais	+	R	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
C. marmelada	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C. panasco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. de burro	-	R	+	R	-	+	+	-	-	-	-	+	-
C. arroz	R	R	-	+	-	R	+	R	-	-	R	R	-
C. rabo de gato	0	0	-	R	-	R	+	+	-	-	R	R	-
C. favorito	R	-	R	R	-	-	+	-	-	R	-	+	-
C. colchão	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
C. Massambará	R	R	R	R	0	R	R	-	R	R	R	R	-
C. jaraguá	0	R	-	R	-	+	+	-	-	0	0	-	0
Carrapichinho	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
esporos/el x 10 ³	55	60	54	53	45	60	75	77	171	60	50	58	0

1/ "+" folhas sem lesões; "-" folhas com lesões do tipo c e d, "R" folhas com lesões do tipo a e "M" folhas com lesões do tipo a e b.

2/ "+" plantas sem lesões; "-" plantas com lesões esporulantes; "M" lesões esporulantes pequenas em poucas plantas e "R" plantas com lesões de hipersensibilidade.

Tabela 22. Padrões de reação de raças de *Pyricularia* provenientes do arroz e oito isolados de *Pyricularia* de outras gramíneas à série diferencial de variedades de arroz e outras gramíneas. Goiânia, GO. 1985.

Variedade	Raça 1/					Isolado 2/							
	39	303	240	431	11	4	3	5	E-105	E-104	E-107	C-104	CO-100
Shin 2	+	+	M	-		+	+	-	-	-	-	-	-
Aichi Asahi	+	+	+	-		+	+	-	-	-	-	-	-
Fujisaka	+	+	+	-		+	+	-	-	-	-	-	-
Fanto 51	+	-	+	-		+	+	-	-	-	-	-	-
Tanyake	R	-	+	-		R	R	-	-	-	-	-	-
Fukushiki	+	-	-	-		+	+	-	-	-	-	-	-
K 1	+	+	M	-		+	+	-	-	-	-	-	-
Pl nº 4	-	M	-	-		R	-	-	-	-	-	-	-
Toride 1	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
K 60	+	R	-	-		+	+	-	-	-	-	-	-
BL 1	R	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
K 59	+	+	-	-		R	M	-	-	-	-	-	-
K 3	R	R	-	-		M	R	-	-	-	-	-	-
Kusabue	M	R	-	-		+	+	-	-	-	-	-	-
Zenith	+	R	-	+		+	+	-	-	-	-	-	-
K 2	+	R	+	-		+	+	-	-	-	-	-	-
IAC - 25	M	R	-	-		R	R	-	-	-	-	-	-
IAC - 47	M	R	-	+		R	R	-	-	-	-	-	-
Gramíneas													
C. carrapicho	-	-	-	-		-	-	+	R	R	O	+	+
C. pã-de-galinha	-	-	-	-		R	R	R	+	+	+	R	R
C. custódio	-	O	-	-		O	O	O	O	O	O	O	O
C. colônia	R	O	-	-		R	O	-	R	R	O	O	R
C. colchão	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
Co. colônia	-	-	-	-		R	R	-	R	R	R	R	R
C. de burro	-	R	-	R		R	+	-	-	-	R	-	-
Grana batataia	+	+	-	+		R	R	-	+	+	+	R	R
C. sarrelada	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
C. panasco	-	-	-	-		-	-	-	R	-	-	-	+
C. de burro	-	-	-	R		R	R	-	R	R	-	R	-
C. arroz	-	-	-	O		R	R	R	R	R	R	-	-
Setária	-	R	-	R		R	O	R	R	+	R	+	R
C. favorito	-	R	-	-		R	R	-	R	R	-	-	R
C. panasco	O	-	-	-		O	+	-	R	O	R	O	O
Andropogon	O	R	-	-		-	-	-	-	O	O	-	O
C. jaraguá	-	R	-	-		+	-	-	R	-	-	-	-
C. carrapicho II	R	R	-	-		R	R	+	R	R	R	R	R
esporos/ml x 10 ³	20	19	25	30		40	30	3	50	60	50	45	2

1/ "+" folhas sem lesões; "+" folhas com lesões do tipo c e d, "P" folhas com lesões do tipo a e "M" folhas com lesões do tipo a e b.

2/ "-" plantas com lesões; "+" plantas com lesões esporulantes, "M" lesões esporulantes pequenas em poucas plantas e "R" plantas com lesões de hipersensibilidade

Tabela 23. Padrões de reação de cinco raças de *Pyricularia* provenientes do arroz e oito isolados de *Pyricularia* provenientes de outras gramíneas à série de variedades diferenciais de arroz e outras gramíneas. Colônia, GO. 1985.

Variedade	Raça ^{1/}					Isolado ^{1/}							
	39	303	240	431	11	4	3	5	E-105	E-104	E-107	C-104	CO-100
Shin 2	+	+	+	+	+	+	+	R	-	-	-	-	-
Aichi Asahi	+	+	+	+	+	+	+	R	-	-	-	-	-
Fujisaka	M	+	+	+	R	+	+	R	-	-	-	-	-
Kanto 51	M	-	+	M	+	+	M	R	-	-	-	-	-
Tsuyake	R	-	+	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-
Fukunishiki	M	R	-	+	R	+	+	-	-	-	-	-	-
K 1	+	+	+	+	+	+	+	R	-	-	-	-	-
PI nº 4	-	M	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-
Toride 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K 60	+	R	R	+	+	+	+	M	-	-	-	-	-
EL 1	R	R	-	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-
K 59	+	R	R	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-
K 3	R	R	+	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-
Kusabie	M	-	+	+	M	+	+	-	-	-	-	-	-
Zenith	+	R	R	+	+	+	+	R	-	-	-	-	-
K 2	+	R	+	+	+	+	+	R	-	-	-	-	-
IAC - 25	M	M	+	R	M	R	R	R	-	-	-	-	-
IAC - 47	M	M	+	M	M	M	R	R	-	-	-	-	-
Gramíneas													
C. carrapicho	R	R	R	R	R	R	R	-	+	-	R	+	-
C. pé-de-galinha	-	-	-	-	-	-	-	-	M	+	+	-	-
C. custódio	0	0	0	0	0	R	R	-	0	0	0	0	-
C. colônio	-	-	0	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-
C. colchão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co. colônio	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
C. de burro	+	+	M	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Gram. batatais	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
C. pamelada	0	0	0	0	-	0	0	-	0	-	0	-	-
C. panasco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. de burro	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-
C. arroz	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Setária	R	-	R	R	-	R	R	R	-	R	-	-	-
C. favorito	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
C. panasco	-	0	-	0	-	0	+	-	-	0	0	0	-
Andropogon	-	-	0	-	-	-	+	-	-	-	0	-	-
C. jaraguá	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
C. carrapicho II	-	R	R	R	-	R	R	-	+	-	-	R	-
Esporos/ml x 10 ³	21	12	21	18	5	36	30	13	6	20	15	7	-

^{1/} "-" folhas sem lesões; "+" folhas com lesões do tipo c e d, "R" folhas com lesões do tipo a e "M" folhas com lesões do tipo a e b.

^{2/} "-" plantas com lesões; "+" plantas com lesões esporulantes, "M" lesões esporulantes pequenas em poucas plantas e "R" plantas com lesões de hipersensibilidade.

4.4.2. REISOLAMENTOS

Foram feitos dezesseis reisolamentos (Tabela 28) de lesões de plantas infectadas nos experimentos um e dois segundo metodologia do item 3.3. As reações das variedades diferenciais de arroz e outras gramíneas à inoculação dos mesmos aparecem na Tabela 24 e 25.

Tabela 28. Reisolamentos. Número de reisolado, hospedeiro, isolado inoculado do qual foi obtido o reisolado.

Nº de reisolado	Hospedeiro	Isolado Inoculado
R ₁	Capim de burro	240
R ₂	Gramma batatais	39
R ₃	Gramma batatais	39
R ₄	Gramma batatais	39
R ₅	Capim de burro	303
R ₆	Arroz	4
R ₇	Arroz	4
R ₈	Arroz	431
R ₉	Capim pé-de-galinha	E-104
R ₁₂	Arroz	R ₁
R ₁₃	Arroz	4
R ₁₄	Arroz	R ₃
R ₁₅	C. Andropogon	E-105
R ₁₆	Arroz	3
R ₁₇	C. panasco	3
R ₁₈	Gramma batatais	303

Tabela 24. Padrões de reação de nove reisolamentos de *Panicum* provenientes de vários hospedeiros, a série diferencial de variedades variedades de arroz e outras gramíneas, Goiânia, GO, 1985.

Variedade	Peisolado ^{1/}								
	R ₁ ^{1/}	R ₂ ^{1/}	R ₃ ^{1/}	R ₄ ^{1/}	R ₅ ^{1/}	R ₆ ^{1/}	R ₇ ^{1/}	R ₈ ^{1/}	R ₉ ^{1/}
Shin 2	-	+	+	-	+	-	+	-	-
Aichi Asahi 1	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Fujisaka	-	+	M	-	-	-	-	+	-
Kanto 51	M	+	+	-	-	-	-	+	-
Tsuyake	-	R	-	-	-	-	-	-	-
Fukunishiki 1	-	M	M	-	R	-	-	+	-
K 1	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Pl nº 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toride 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K 60	-	-	R	-	R	-	-	+	-
BL 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K 59	R	-	M	-	+	-	-	+	-
K 3	-	-	R	R	-	R	R	+	-
Kusabue	R	M	-	-	-	-	-	+	-
Zenith	R	M	M	-	-	+	-	+	-
K 2	R	M	S	-	-	+	M	+	-
IAC - 25	+	M	M	-	-	R	-	-	-
IAC - 47	+	-	R	-	-	-	-	-	-
Gramíneas									
C. carrapicho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. pé-de-galinha	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C. custódio	0	-	-	-	-	R	-	-	0
C. colônia	-	0	-	-	0	-	-	-	-
C. colchão	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co. colônia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. de burro	R	-	-	-	-	R	R	R	M
Gram. batatais	-	M	M	-	-	R	R	R	-
C. mamelada	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. panasco	-	-	-	-	-	-	R	-	-
C. de burro	-	-	-	-	-	-	R	-	-
C. arroz	-	-	-	-	R	+	+	-	R
Setária	R	R	R	-	-	-	R	R	-
C. favorito	-	-	-	-	-	-	R	-	-
C. panasco	-	-	M	-	-	-	-	-	0
Andropogon	-	-	-	-	-	-	0	0	-
C. jaraguá	-	-	M	-	-	-	-	R	R
C. carrapicho II	R	-	-	-	-	-	-	R	R
esporos/ml x 10 ³	20	15	20	3	20	35	30	40	45

^{1/} "-" folhas sem lesões; "+" folhas com lesões do tipo c e d; "R" folhas com lesões do tipo a e "M" folhas com lesões do tipo a e b^{2/} "-" plantas sem lesões; "+" plantas com lesões esporulantes; "M" lesões esporulantes pequenas em poucas plantas e "R" plantas com lesões de hipersensibilidade.

Tabela 25. Padrões de reação de sete reisolamentos de *Pyricularia* provenientes de vários hospedeiros, à série diferencial de variedades de arroz e outras gramíneas. Goiânia, GO. 1985.

Variedade	Reisolado ^{1/}						
	R ₁₂ ^{1/}	R ₁₃ ^{1/}	R ₁₄ ^{1/}	R ₁₅ ^{1/}	R ₁₆ ^{1/}	R ₁₇ ^{1/}	R ₁₈ ^{1/}
Shin 2	M	+	+	+	+	+	M
Aichi Asahi	+	+	+	+	+	+	R
Fujisaka	+	M	+	+	M	M	R
Kanto 51	+	M	+	M	+	R	-
Tsuyake	+	R	R	-	-	R	-
Fukushimaiki	-	+	M	+	+	M	-
K 1	+	+	+	M	M	+	+
PI n° 4	-	-	-	-	-	-	M
Toride 1	-	-	-	-	-	-	-
K 60	+	+	+	+	+	+	-
Bl. 1	-	R	R	-	R	-	-
K 59	R	M	R	R	R	R	-
K 3	+	R	R	R	R	R	-
Kusabae	+	+	+	+	+	M	-
Zenith	R	M	+	+	M	M	-
K 2	+	+	+	+	+	+	-
IAC - 25	R	R	M	R	R	R	R
IAC - 47	M	M	M	R	M	M	M
Gramíneas ^{2/}							
C. carrapicho	R	R	-	R	R	R	-
C. pé-de-galinha	-	R	R	-	-	-	R
C. custódio	O	O	O	O	O	O	O
C. colunção	-	-	-	R	O	R	O
C. colchão	-	-	-	-	-	-	-
Co. colunção	-	-	-	O	R	R	-
C. de burro	-	+	-	M	M	+	R
Grana batatais	+	+	+	+	+	+	-
C. mamelada	O	-	-	O	-	O	-
C. panasco	-	-	-	-	-	-	-
C. de burro	-	-	-	R	-	-	-
C. arroz	R	-	-	R	R	-	-
Setária	R	R	-	R	R	R	-
C. favorito	-	-	-	-	-	-	-
C. panasco	O	-	-	O	M	+	-
Andropogon	-	-	-	-	-	+	-
C. jaraguá	-	-	-	-	-	+	-
C. carrapicho II	-	R	-	-	R	R	-
esporos/ml x 10 ³	75	43	2	75	20	43	9

^{1/} "-" folhas sem lesões; "+" folhas com lesões do tipo c e d; "R" folhas com lesões do tipo a e "M" folhas com lesões do tipo a e b

^{2/} "-" plantas sem lesões; "+" plantas com lesões esporulantes; "M" lesões esporulantes pequenas em poucas plantas e "R" plantas com lesões de hipersensibilidade.

5. DISCUSSÃO

5.1. CARACTERÍSTICAS DE COLÔNIA

5.1.1. MORFOLOGIA

Todas as características de colônia observadas nos treze isolados (Tabelas 11, 12 e 13 e Figura 2), contribuem para evidenciar a variabilidade morfológica existente entre isolados do gênero *Pyricularia*, e em alguns casos entre isolados do mesmo hospedeiro (*E. indica*, *P. maximum* e *O. sativa*) confirmando consequentemente as observações de OU (1972), LATTERELL (1975) e YAEGASHI (1981).

A esporulação na maioria dos isolados foi favorecida no meio de aveia corroborando com as observações de TANAKA (1982), MUNIBHUSHANRAO (1971) e NAMAI e YAMANAKA (1985),

os quais constaram um estímulo de esporulação de *P. oryzae* neste meio para seus isolados. Segundo NAMAI e YAMANAKA (1983) a prolamina contida na aveia é uma das substâncias responsáveis por este estímulo. O meio B favoreceu a produção de micélio aéreo do tipo algodinoso, apresentando esporulação reduzida conforme OU (1972) havia relatado. OTSUKA *et alii* (1965) e NAMAI e YAMANAKA (1985) relataram que o meio BDA favoreceu o crescimento mas não a formação de micélio aéreo e esporulação, tal qual foi também observado nos trabalhos de SOAVE (1972) e CRUZ (1978).

A caracterização de morfologia de colônia foi adequada para revelar a semelhança dos isolados 3 e 4 (*P. seto*
sum e *H. rufo*) com a raça 431 do arroz.

Os isolados E-104 e E-105 (*E. indica*) apresentaram variação morfológica entre as repetições de um experimento e também nas sub-culturas, enquanto as raças de arroz e os outros isolados não evidenciaram esta variação. A estabilidade das características morfológicas, entre outros aspectos, das raças do arroz se deve a seleção a que foram submetidos com a análise de aproximadamente mil isolados brasileiros sob o ponto de vista de patogenicidade (TANAKA, 1982).

A raça 11 do arroz, a qual foi a mais virulenta à série de variedades diferenciais de TANAKA (Tabela 7), apresentou esporulação regular e micélio interno mais escuro. Por outro lado, a raça 303 do arroz a qual foi menos virulenta à mesma série diferencial mostrou micélio interno mais cla-

ro. No entanto, as raças 240 e 431 do arroz (virulência intermediária a mesma série diferencial) apresentaram abundante esporulação em meio de aveia e micélio interno com colorações escuras, sendo que em alguns meios, eram mais claras. A correlação entre pigmentação de colônias e patogenicidade foi observada por MANIBHUSHANRAO (1971), WOLOSHUK *et alii* (1980) e TREVATHAN (1982), sendo que Ling e Chinte-Sanchez (1968) citados por LATTERELL (1975) sugeriram que morfologia de colônia num sentido mais amplo também relaciona-se com patogenicidade. Por outro lado LATTERELL (1975) usando um grande número de isolados não encontrou esta correlação. Portanto há que se considerar que tamanho da amostragem e a composição variável de meios de cultura complexos podem ser responsáveis por resultados adversos.

5.1.2. CRESCIMENTO

O crescimento ao longo do tempo para todos os isolados ensaiados em todos os meios apresentou-se linear como pode ser observado graficamente na Figura 3 e estatisticamente nos Apêndices 1, 2 e 3. O coeficiente de determinação oscilando em torno de 0,80 - 1,00 em meio de aveia, 0,94 - 1,00 em meio BDA e 0,77 - 1,00 em meio definido B corroborou com os resultados acima mencionados. Para GRIFFIN (1981), o crescimento de uma colônia de fungo por um período de tempo, obedece a uma curva sigmoideal típica, a qual pode ser dividida em várias fa-

ses: fase de crescimento não mensurável, fase de crescimento rápido (fase exponencial), fase de constância ou declínio e finalmente a morte (autólise). Os dados obtidos neste estudo (Figura 3) se ajustam a descrição de algumas destas fases tais como a fase de crescimento rápido e o período de constância ou declínio discreto. As outras fases não foram detectadas em decorrência ou intervalo de leitura considerado (três a onze dias). O isolado C-104 (*C. echinatus*) apresentou fase exponencial curta. Segundo COSTA (1983), o mecanismo que controla o crescimento microbiano ainda não está claro embora existam duas hipóteses sendo que na primeira, nutrientes diferentes podem ser metabolizados em taxas diferentes consequentemente fornecendo diferentes quantidades de substrato para a síntese de macromoléculas; na segunda, os nutrientes ou seus produtos podem interagir com o mecanismo de controle da biossíntese das macromoléculas. De qualquer maneira, tal mecanismo deve ser controlado geneticamente.

A apreciação dos resultados da análise da variância apresentados no Apêndice 4, evidencia diferenças entre os meios de cultura utilizados (aveia, definido B e BDA), entre os treze isolados e na interação meio versus isolados uma vez que o teste F revelou significância ($P > 0,01$) para todos esses efeitos. O coeficiente de variação baixo (2,92%) sugere precisão do experimento. A comparação das médias de diâmetro das colônias nos três meios de cultura, após sete dias de inoculação, feita pelo teste de Duncan ($P > 0,05$) (Tabela 10), indi

ca a existência de seis grupos estatisticamente diferentes. A análise dos dados mostra que houve variação de crescimento entre os isolados do mesmo hospedeiro (*E. indica* e *P. maximum*). Por outro lado, as raças de arroz, à exceção da raça 431, isolados 3 e 4 de *P. setosum* e *H. rufo*, respectivamente, apresentaram-se no mesmo grupo. O isolado E-104 (*E. indica*) foi o que cresceu mais e o isolado C-104 (*C. echinatus*) o que cresceu menos nos três meios ensaiados. Ficou evidenciado a reduzida variabilidade no que se refere ao crescimento total das raças de arroz. Entretanto, o crescimento dos isolados dos hospedeiros silvestres mostrou ter uma variabilidade maior, o que já era esperado, uma vez que os isolados são provenientes de diferentes espécies de plantas.

Os resultados da Tabela 16, mostram comparações entre os coeficientes de regressão, através do teste F da análise da variância ponderada. Considerando todos os isolados o meio BDA evidenciou maior velocidade média de crescimento da do pelo coeficiente de regressão médio ($\bar{b} = 6,8$) e meio definido B ($\bar{b} = 6,4$) a menor velocidade. O grupo de isolados formado pelas raças de arroz apresentou maior velocidade de crescimento em meio de aveia ($\bar{b} = 7,2$), enquanto que para o grupo de isolados de outras gramíneas, isto ocorreu no meio BDA ($\bar{b} = 6,9$). Este meio proporcionou menores diferenças ($F=11,25$) entre os isolados quando comparado com o meio de aveia ($F=13,17$) e o meio definido B ($F=17,00$), o qual diferenciou melhor os isolados ensaiados. Houve uma tendência geral dos isolados provenientes de

outras gramíneas apresentarem crescimento mais lento no meio definido B provavelmente em decorrência de alguma auxotrofia comum, uma vez que este meio contém apenas dois fatores de crescimento, biotina e tiamina, necessários ao desenvolvimento deste fungo. A média dos coeficientes de regressão dos isolados de arroz são estatisticamente iguais, sendo que no meio BDA e no meio definido B as mesmas foram diferentes ($P > 0,05$) e ($P > 0,01$) respectivamente. A inclusão no grupo de raças do arroz de dois isolados provenientes de outras gramíneas (3 e 4), os quais também apresentaram morfologia de colônia (Tabelas 11, 12 e 13) e crescimento total (Tabela 15) semelhantes à raça 431 do arroz, não alterou a nível de significância ($F = 1,0$ ns) do grupo do arroz e consequentemente a homogeneidade do mesmo. Embora tenha havido um aumento da significância do teste F nos meios BDA ($F = 4,00^{**}$) e definido B ($F = 5,00^{**}$), este aumento foi de magnitude pequena.

Esses dados, adicionados aos resultados de crescimento total, aos de comparação de médias de crescimento nos três meios e a análise da Figura 3, sugerem que os isolados 3 e 4 apresentam características fisiológicas muito semelhantes as das raças de arroz indicando um estreito relacionamento entre esses isolados.

5.2. CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS

5.2.1. NÚMERO DE NÚCLEOS

Embora o número de células conidiais observadas tenha sido reduzido, foi constatada a natureza mononucleada dos conídios (Figura 4), algumas vezes discutida na literatura (SUZUKI, 1965). Observações realizadas por YAMASAKI e NIIIZEKI (1965) em vinte e oito isolados de *Pyricularia oryzae* provenientes do arroz e outras espécies, mostram a predominância de células mononucleadas nos conídios, conidióforos, e tubos germinativos além do micélio, sugerindo também que a frequência de células multinucleadas seja determinada geneticamente e não afetada por condições ambientais. GIATGONG e FREDERIKSEN (1969) e YAEGASHI e HEBERT (1976) concordaram com estas observações sendo que LEUNG (1984) constatou que os isolados brasileiros por ele utilizados apresentaram taxas maiores de células de hifa com mais de um núcleo, em comparação com isolados de outras regiões geográficas. O autor considerou que o número de isolados brasileiros foi reduzido (oito) para inferir que a variação do número de núcleos seja responsável pela variabilidade patogênica entre isolados regionais (Brasil, EUA, Filipinas, Japão, etc). Sendo o Brasil um país de clima tropical, sua agricultura difere das zonas temperadas pois pressões de seleção sofridas pela população de patógenos tropicais são dife

rentes (BUDDENHAGEN, 1977). No Brasil, o arroz é cultivado em vários sistemas de produção (sequeiro, várzea úmida, irrigado, sequeiro favorecido, entre outros), proporcionando boas condições ecológicas para estes estudos citológicos. Assim, população de *P. oryzae* de arroz e de outras gramíneas poderiam ser estudados sob este ponto de vista para verificar o efeito regional (ecológico) na patogenicidade deste fungo, tal qual LEUNG (1984) constatou inicialmente.

5.2.2. DIMENSÃO DOS CONÍDIOS

Através da análise da Tabela 17, observa-se que o comprimento (C) médio de conídios variou de 20,50 μ -33,06 μ , a largura (L) média variou de 7,13 μ - 11,4 μ e o coeficiente (C/L) ficou entre 2,64 - 3,55. Embora tenham sido constatadas diferenças entre as dimensões analisadas, C, L e C/L (Apêndice 4), a dispersão dos dados medida pelo coeficiente de variação mostrou outros efeitos significativos, além do efeito de isolados. KULKARANI e PATEL (1956) estudando o efeito de meios de cultura naturais e temperaturas de incubação na dimensão de esporos de *P. setariae*, encontrou um aumento significativo no comprimento e largura de esporos produzidos no próprio hospedeiro, explicando algumas discrepâncias na literatura referente a dimensões de conídios (Tabela 5), e a tendência geral daqueles produzidos e ensaiados neste experimento (Tabela 18) mos

trarem suas dimensões significativamente maiores.

Prasada *et alii* (1970) citados por YAMASAKI e KOZAKA (1980) observaram que a média do comprimento e largura de conídios de *Pennisetum typhoides* era de 27,5 μ e 9,2 μ respectivamente, sendo que o coeficiente calculado fica sendo 2,99 o que concorda com o coeficiente obtido entre comprimento e largura de conídios de *P. setosum* deste experimento. No entanto conídios de isolados de *Pyricularia* sp. provenientes de outra espécie de planta *Pennisetum polystachyon* Schultz apresentaram-se, mais alongados (HASHIOKA, 1973). Dada a controvérsia encontrada e a semelhança das dimensões de C, L e C/L de isolados de *P. setosum* a raça 431 do arroz (Tabela 18), sugere-se uma possível identidade entre esses dois isolados. Medidas de conídios provenientes de lesões do hospedeiro seriam necessárias para verificar a real posição taxonômica destes isolados.

O isolado 4 de *H. rufo* foi o mais variável (Tabela 17) nas três dimensões avaliadas (C e L e C/L). Não há dados na literatura com os quais se possa fazer alguma comparação, pois este é o primeiro relato de ocorrência de *Pyricularia* sp. neste hospedeiro.

Os dois isolados de *Panicum maximum* (5 e CO-100) apresentaram médias de C, L e C/L (Tabela 18) diferentes entre si. Giatgong (1961) citado por YAMASAKI e KOZAKA (1980) descreveu que conídios de isolados de *Panicum repens* apresentaram coeficiente médio (C/L = 2,98) coincidente aos dados obtidos neste experimento para o isolado CO-100 (C/L = 1,90) de *P. maxi-*

mum. O isolado 5 por sua vez não se mostrou semelhante a nenhum caso na literatura consultada neste gênero de hospedeiros.

Embora o isolado E-107 (*E. indica*), tenha tido média de largura (Tabela 18) menor que os outros dois isolados do mesmo hospedeiro, E-104 e E-105, o coeficiente C/L foi semelhante revelando certa homogeneidade ao se analisar conídios do mesmo hospedeiro.

As raças de arroz mostraram tendências de terem conídios mais longos que os outros isolados, a exceção da raça 11, a qual apresentou uma das menores médias de comprimento e coeficiente (C/L).

A análise conjunta dos dados mostrou que houve variação acentuada nas dimensões de conídios dos treze isolados de *Pyricularia* spp. utilizados neste experimento. Embora tenham sido feitas algumas comparações com dados de literatura, conclusões mais definitivas sobre a taxonomia do gênero não foram feitas, baseando-se somente em forma e tamanho dos conídios.

5.3. CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA

5.3.1. ZIMOGRAMAS

A análise do zimograma das esterases (Figura 5) possibilitou a identificação de três grupos de isolados: o grupo um envolvendo onze isolados, os quais seis (E-104, E-105, E-107, 3, 4 e 5) eram provenientes de outras gramíneas e cinco provenientes do arroz (303, 431, 240, 39, 11); o grupo dois envolvendo o isolado de *C. echinatus* (C-104) e o grupo três incluindo o isolado de *P. maximum* (CO-100). Inicialmente MATSUYAMA e KOZAKA (1971) usando o mesmo sistema enzimático na análise de vários isolados de *P. oryzae* de diversas regiões geográficas observaram diferenças dentro deste grupo. Três tipos de zimogramas foram obtidos e relacionados com patogenicidade diferencial dos isolados. Posteriormente MATSUYAMA *et alii* (1977) encontraram padrões de bandas de isolados de *O. sativa* similares entre si e aos padrões de isolados de *E. indica* e diferentes dos padrões de *P. miliaceum* concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

As observações dos zimogramas para fosfatase ácida (Figura 7), superóxido dismutase (Figura 8) e malato desidrogenase (Figura 9) mostraram padrões de bandas distintos daqueles do sistema esterase, sendo possível detectar a presença de quatro grupos diferentes. O primeiro envolvendo as raças 303, 240, 39, 431 e 11 do arroz e isolados 3, 4 e 5 (*P. setosum*

H. rufo e *P. maximum*); o segundo incluindo os isolados E-104, E-105 e E-107 de *E. indica*, o terceiro e quarto grupos envolvendo respectivamente os isolados CO-100 (*P. maximum*) e E-104 (*C. echinatus*). Deste modo, o uso destes sistemas enzimáticos possibilitou mostrar que os isolados de *E. indica* são distintos do grupo de raças de arroz. Portanto, a sugestão de MATSUYAMA *et alii* (1977) em classificar isolados de *E. indica* como forma specialis de *P. oryzae* ou *P. grisea* é discutível. Embora os padrões de bandas das esterases do isolado (CO-100) sejam distintos do grupo maior de isolados de arroz, não há dados suficientes para classificar este isolado como *P. panici-miliaris* como sugeriram MATSUYAMA *et alii* (1977).

Dos sistemas utilizados neste trabalho, o sistema esterase apresentou melhor resolução de bandas. O sistema fosfatase ácida foi estudado numa faixa mais nítida, no entanto observou-se que havia regiões superiores de gel as quais sugeriram diferenças adicionais entre os isolados. Tais observações sugerem que o sistema fosfatase ácida seja estudado com mais detalhe em razão das possíveis diferenças detectadas relacionarem-se às raças de arroz. Assim seria possível distinguir-se raças de arroz baseando-se em padrões eletroforéticos como proposto por MATSUYAMA e KOZAKA (1971) para *Pyricularia o*
ryzae e vários autores para outros fungos (ALFENAS *et alii* (1984) e GILL e POWELL (1968)).

5.3.2. DIVERSIDADE ENZIMÁTICA

A Tabela 20 mostra os índices de diversidade gerais os quais permitiram classificar os treze isolados de *Pyricularia* spp. em quatro grupos distintos: 1) 431, 303, 240, 39, 11, 3, 4 e 5, 2) E-104, E-105 e E-107, 3) CO-100 e 4) C-104. Estes agrupamentos são os mesmos sugeridos pelos zimogramas de fosfatase ácida, superóxido dismutase e malato desidrogenase, no entanto o índice de diversidade enzimática também mostra a distância relativa entre estes isolados. Assim o isolado E-104 de *C. echinatus* é o mais diferente dos demais, vindo a seguir o isolado CO-100 de *P. maximum*, isolados E-104, E-105 e E-107 de *E. indica* e finalmente aqueles das raças de arroz 431, 303, 240, 39 e 11 e isolados 3, 4 e 5 de *P. seto*, *H. rufo* e *P. maximum*, respectivamente.

A técnica de calcular índice de diversidade tem sido utilizada na distinção de genótipos de plantas superiores. HEIDRICH-SOBRINHO (1974) usou o índice de diversidade alélica considerando cinco sistemas enzimáticos de linhagens de milho para correlacionar com a produção de grãos obtida. Desta maneira o autor pode determinar as linhagens distintas geneticamente e consequentemente prever a produção de híbridos provenientes de cruzamento entre elas. Esse estudo com isolados de *Pyricularia* spp. não chegou a identificar alelos, mas determinar número, intensidade e posição de bandas, em razão do número reduzido de isolados e de repetições utilizadas. Por

tanto a metodologia de análise de zimogramas adaptada de HEIDRICK-SOBRINHO (1974) foi relativamente simples e eficiente no sentido de medir o grau de similaridade ou diversidade entre os isolados do gênero *Pyricularia*. Sugere-se o emprego do índice de diversidade na análise dos géis em estudos onde não se exija sofisticação de técnica e análise de proteínas e enzimas de fungos.

Embora tendo utilizado somente cinco isolados de *P. oryzae* e cinco sistemas enzimáticos, a similaridade encontrada entre as raças de arroz, contrasta-se com a alta variabilidade morfológica, fisiológica e patogênica reportada muito frequentemente neste fungo. LEUNG (1984) utilizando cerca de trezentos isolados de *P. oryzae* de várias regiões geográficas onde o arroz é produzido e dezoito sistemas enzimáticos, encontrou também considerável uniformidade entre eles. Sugere esse autor que populações individuais do patógeno tenham sido originadas de poucos isolados pioneiros os quais foram originados de uma população ancestral comum, e portanto carregaram uma fração da variabilidade que existia na espécie. De acordo com Chang (1976) citado por LEUNG (1984), a maioria das variedades de arroz cultivadas na América do Norte, América do Sul e África foram introduzidas tanto da Ásia tropical como da temperada. Se a disseminação de *P. oryzae* foi efetuada através da disseminação do germoplasma de arroz, os isolados de diversas regiões geográficas podem ter se originado de poucas populações ancestrais comuns. Além disso, o uso de cultivares

resistentes de arroz pode ter causado reduções drásticas no tamanho da população dentro de uma região levando a uma redução posterior na variabilidade genética desta população.

Mesmo dentro de populações pioneiras, a tendência é que com o crescimento posterior e a heterogeneidade de ambientes restaurar-se-ia a maioria da variabilidade ao longo do tempo. De acordo com a taxa de mutação média por locus enzimático estimado para várias espécies de organismos (10^6 /locus/geração), o fungo *Pyricularia oryzae* que produz 4000 conídios/leção/noite deveria ter considerável variabilidade enzimática. Este fato, segundo os mesmos autores, sugere que os variantes eletroforéticos sejam deletérios ou que um grupo de loci enzimáticos coadaptados neste fungo tenha sido selecionado sob a influência do arroz. BURDON *et alii* (1982) também não encontraram variação enzimática entre isolados de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* e no entanto essas duas populações são patogenicamente diferentes. Em estudos com outros animais e espécies de plantas, houve evidências indicando divergência ecológica para características morfológicas na ausência de acentuada diferenciação enzimática. Essas observações sugerem que um locus enzimático pelo menos em alguns casos poderia representar um grupo de características que estariam sujeitas a diferentes modos de seleção e portanto exibindo diferentes padrões de variabilidade. Se esta variância entre os níveis de heterogeneidade nos loci enzimáticos e a patogenicidade em *P. oryzae* refletem diferenças fundamentais na

evolução dos dois grupos de caracteres, então a análise de variabilidade enzimática para prever a variação patogênica neste fungo não seria de muito valor. LEUNG (1984) conclui que seria necessário uma análise da variabilidade patogênica de isolados os quais são conhecidos os fenótipos enzimáticos a fim de que conclusões mais definitivas possam ser obtidas.

A análise dos padrões de bandas e dos índices de diversidade de isolados de *Pyricularia* spp. provenientes de outras gramíneas mostrou a alta variabilidade enzimática, o que era de se esperar considerando a diversidade de hospedeiros dos quais estes isolados foram provenientes. Não foram observados variantes eletroforéticos comuns entre os isolados de arroz e isolados dessas outras gramíneas, considerando-se que o isolado 3 e 4 (*P. setosum* e *H. rufo*) sejam raças do arroz. Isso talvez devido ao uso de poucos isolados. Corroborando com esses dados, os resultados de LEUNG (1984) mostraram que a variação genética encontrada entre isolados de *Pyricularia* spp. era comparada à populações naturais de outras espécies de organismos. Sugere-se que sejam feitas amostragens sistemáticas de isolados de arroz e outras espécies de plantas durante o ano agrícola de regiões produtoras de arroz e posterior avaliação de seus padrões eletroforéticos.

5.4. INOCULAÇÃO CRUZADA

5.4.1. RAÇAS DE *P. oryzae* DE ARROZ E ISOLADOS DE OUTRAS GRAMÍNEAS

A variação patogênica das raças de arroz usando a série de variedades diferenciais foi constatada através dos três experimentos de inoculação (Tabelas 21, 22 e 23). Uma vez que não se utilizou exatamente, a metodologia de avaliação de TANAKA (1982), por inadequação, não foi possível a comparação com os padrões por ele descritos para essas raças. Desta maneira as raças de arroz foram comparadas entre si nas três repetições do mesmo experimento. Nestas comparações foi observado que de uma maneira geral houve estabilidade patogênica. Certos loci gênicos, tais como: Pi-i, Pi-a, Pi-z, Pi-ta e Pi-k (Tabela 7) nas variedades utilizadas mostraram variação em pelo menos um experimento. Tal observação pode ser explicada, em parte, por diferentes tipos de reações provocadas pelas variedades que contêm estes alelos, dependendo do isolado e da genética do hospedeiro diferencial. A variedade Kusbue, por exemplo, embora tenha o mesmo alelo (Pi-k) que a variedade Kanto-51, apresentou reações diferentes (TANAKA, 1982), revelando que talvez existam outros genes afetando a resistência de Kusbue (maior nível de resistência horizontal) consequentemente modificando o tipo e número de lesões encontradas. As varie

dades diferenciais utilizadas neste experimento foram selecionadas de acordo com a estabilidade e nitidez de reações a diversos isolados brasileiros, no entanto, as mesmas não chegaram a ser isogênicas, o que podem comprometer a avaliação de resistência do tipo intermediária (MR, M e MS) de certos isolados inoculados. A variedade Fukunishiki (Pi-z) também apresentou ambiguidade nas reações entre os três experimentos para a raça 11, o que segundo TANAKA (1982) se deve ao nível de resistência horizontal da mesma. O gene Pi-ta² da variedade Pi n° 4 mostra reações do tipo M para a raça 303, fato que já havia sido observado também por TANAKA (1982). A raça 11 durante o experimento 3, exibiu reações menos evidentes o que provocou variação nos padrões finais obtidos. Tal fato explica-se pela baixa concentração de esporos obtida, a qual segundo KOZAKA (1975) influencia o número de lesões dependendo do isolado e variedade na qual ele é inoculado. O mesmo autor estudou o efeito da temperatura do ar no momento e após a inoculação. Algumas variedades mostraram número de lesões diferenciais entre temperaturas de 22^o a 32^oC na época de inoculação. Do mesmo modo a temperatura do ar, após a inoculação, exerceu influência no número de lesões, sendo que houve diferenças varietais de isolados e tendência de temperaturas de cerca de 30^oC diminuir o número das mesmas e temperaturas mais amenas favoreceram-nas. Uma vez que os três experimentos foram ensaiados em três condições climáticas diferentes: Agosto (Tmédia = 22,5^oC;

UR= 44,7% e temperaturas noturnas 15,5°C), outubro (T média 23,6°C; UR = 75,9% e temperatura noturna 18,6°C) e novembro-dezembro (T média 22,5°C; UR = 76,6% e temperatura noturna 19,6°C) esperar-se-iam alterações na expressão da doença. As baixas temperaturas noturnas ocorridas no mês de agosto talvez expliquem o melhor desenvolvimento da doença neste período (CRUZ, 1978). Desde que a especialização patogênica do fungo *P. oryzae* Cav. foi identificada por Latterell em 1952 citada por OU (1972), estudos intensivos têm sido feitos sobre raças fisiológicas em vários países produtores de arroz, inclusive no Brasil (AMARAL *et alii*, 1979; BEDENDO *et alii*, 1979, RIBEIRO *et alii*, 1980 e RIBEIRO *et alii*, 1984). A variabilidade patogênica do fungo também constatada neste estudo não tem sido discutida, no entanto, a instabilidade de raças (OU, 1972), ainda é um assunto controvertido na literatura (SINGH, 1983). Por exemplo, KIYOSAWA (1976), LATTERELL (1975), Nakamura (1972) citado por KIYOSAWA (1976), TANAKA (1982 e 1985) observaram estabilidade das raças através dos experimentos no decorrer do tempo. KIYOSAWA (1976) nunca obteve, durante quinze anos, dois ou mais mutantes simultaneamente de um experimento de inoculação com uma única raça. Tal observação viabiliza análise genética da resistência à brusone do arroz. DAY (1974) sugere que as discrepâncias encontradas nos testes de inoculação de *P. oryzae* são decorrentes de diferentes interpretações das variações nas características de lesão da folha. Tais discrepâncias podem ser atribuídas a diferenças fisiológicas e de desenvolvi

mento entre diferentes partes da folha ou então a diferenças no micro-clima como sugere LEUNG (1984). Acrescentando, KIYOSAWA (1976) reportou que a inconsistência do número de raças i dentificadas até hoje deveu-se a diferentes critérios de avaliação da doença, exemplificando com o trabalho de Ou o qual considerava uma variedade resistente quando menos de 20% das plântulas eram afetadas. KIYOSAWA (1976), no entanto considerava que lesões do tipo sensível eram formadas na maioria das plântulas inoculadas com um isolado virulento, mas elas não eram formadas por um isolado não virulento quando não havia mutantes. O uso de diferentes métodos de inoculação e a contaminação também são sugeridos como causas de variações na patogenicidade de isolados. Nosso estudo no entanto incluiu bandejas as quais foram inoculadas com água como testemunha revelando contaminações insignificantes nas condições ensaiadas. TANAKA* realça que as variedades diferenciais deveriam ter sua genética bem conhecida assim como seus padrões de reação a vários isolados.

Todas as raças de arroz foram patogênicas a pelo menos uma espécie de planta não cultivada como pode ser visto nas tabelas 21, 22 e 23. A grama batatais (*P. notatum*) é a mais constantemente afetada vindo a seguir o capim-de-burro (*P. paniculatum*). No entanto Kato (1978) citado por YAMASAKI e KOZAKA (1980) não encontrou patogenicidade das raças de

* Comunicação Pessoal

arroz por ele utilizadas a *P. notatum*. Portanto pela primeira vez esta espécie foi identificada como hospedeira de *P. oryzae* provenientes de arroz. Este fato reveste-se de importância uma vez que estas gramíneas são muito comuns em áreas produtoras de arroz da região centro-oeste do Brasil. Elas permanecem durante a entre safra podendo constituir-se importante fonte de inóculo primário de *P. oryzae* nestas regiões.

Embora tenha havido variações entre as reações observadas nos experimentos, ficou clara a grande variação de hospedeiros que as espécies patogênicas deste fungo possuem, como foi revisado por ASUYAMA (1965), OU (1972) e YAMASAKI e KOZAKA (1980). Das vinte e quatro espécies ensaiadas (Tabela 10) em pelo menos um experimento, vinte e uma (Tabela 21, 22 e 23) foram susceptíveis às espécies de *Pyricularia* utilizadas. *E. pilosa*, *P. maximum*, *P. paniculatum*, *P. notatum*, *B. plantaginea*, *H. rufa* e *Andropogon* sp. não tinham sido descritos como hospedeiros destes fungos de acordo com YAMASAKI e KOZAKA (1980), mas foram susceptíveis ao mesmo em algumas condições. As avaliações envolvendo hospedeiros tais como: *B. plantaginea* e *Andropogon* sp. devem ser refeitas dada a reação dúbia apresentada nestes experimentos. Como foi observado, as avaliações aqui realizadas não levaram em conta a porcentagem de plantas afetadas, mas sim a ocorrência ou não da patogenicidade, em decorrência do alto número e tipo de desenvolvimento diferencial das plantas não cultivadas ensaiadas.

De qualquer maneira, os isolados de *E. indica*

(E-104, E-105 e E-107) e o isolado de *C. echinatus* (C-104) mostraram reações características nos seus próprios hospedeiros nos três experimentos. Enquanto que os isolados 3 e 4 (*P. setosum* e *H. rufo*) não as ocasionaram em seus próprios hospedeiros, levando a crer que estes não sejam seus hospedeiros especializados.

Todos os isolados de espécies não cultivadas comprovaram sua patogenicidade quando foram inoculados em seus hospedeiros originais, com exceção do isolado 5 (*P. maximum*), talvez em razão do baixo número de esporos, produzidos por ele. A morfologia de sua colônia lembra o tipo não patogênico, citado por LATTERELL (1975) apresentando colônias úmidas de coloração marrom. Os isolados 3 e 4 (*P. setosum* e *H. rufo*) foram patogênicos a um maior número de espécies, além de seus hospedeiros originais. Os isolados de *E. indica* foram patogenicamente diferentes entre si, confirmando as diferenças morfológicas e fisiológicas já descritas anteriormente. A gama de hospedeiros de cada isolado ensaiado foi determinada levando-se em consideração a patogenicidade confirmada em pelo menos dois dos experimentos. Assim, os isolados E-104 e E-107 apresentaram como hospedeiros somente a espécie original *E. indica* enquanto que o isolado E-105 foi patogênico a *E. indica* e *P. notatum*. Os isolados C-104 e CO-100 foram patogênicos somente ao seus hospedeiros originais, *C. echinatus* e *P. maximum* respectivamente.

O isolado 4 foi patogênico a *P. paniculatum*, *P. notatum* e a seu hospedeiro original *H. rufo* enquanto o iso-

lado 3 o foi às mesmas espécies e também a *D. horizontalis*.

As inoculações dos isolados provenientes de gramíneas nas variedades diferenciais de arroz (Tabelas 21, 22 e 23) evidenciou a não patogenicidade dos isolados de *E. indica* concordando com Kato (1977) citado por YAMASAKI e KOZAKA (1980). De acordo com a revisão de YAMASAKI e KOZAKA (1980), nove autores observaram que os isolados de *Panicum* spp. não foram patogênicos ao arroz conforme o observado neste estudo para o isolado de *P. maximum* (CO-100), sendo que dois dos autores constataram patogenicidade a variedades de arroz. Ainda, de acordo com a mesma revisão, apenas dois dos seis trabalhos que estudaram a patogenicidade de isolados de *Pennisetum* spp., detectaram-na para *Pennisetum purpureum*. Embora proveniente de espécie hospedeira diferente (*P. setosum*), o isolado 3 utilizado neste experimento também foi obtido por CRUZ (1978). Tanto o isolado 3 como o isolado 4 de *H. rufo* mostraram um comportamento patogênico semelhante ao da raça 431 do arroz, além da morfologia de colônia, de conídios, tipo e velocidade de crescimento e padrões eletroforéticos. Estas observações sugerem que este seja um isolado de *P. oryzae* com especialização patogênica a algumas gramíneas entre elas as espécies em que foram feitos os isolamentos, *P. setosum* e *H. rufo*. Não foi encontrado na literatura nenhum relato desta última espécie de planta como hospedeira natural deste fungo.

Estas evidências sugerem que raças de *Pyrícula*

ria oryzae do arroz podem se especializar ou se adaptar a outros hospedeiros, sem no entanto perder a patogenicidade ao arroz. Segundo KIYOSAWA (1977), a ocorrência de epidemias pode ser explicada como resultado de mudanças genéticas na população do patógeno e/ou hospedeiro. Estas mudanças abrangem a introdução de novos patógenos de outros países, mudanças na virulência ou amplitude de hospedeiros e tolerância a pesticidas. Por outro lado, mudanças genéticas na população do hospedeiro abrangem o uso de uma variedade com baixo nível de resistência e mudanças na população de um hospedeiro alternativo. Frequentemente, essas mudanças estão combinadas, mas qualquer uma delas pode levar à sérias perdas. Exemplificando, o mesmo autor menciona que uma doença em citrus causada por *Ascochyta fabae* atingiu 20%, 50% e 70% nos pomares japoneses em 1965, 1966 e 1967, respectivamente e em 1968 causou uma epidemia a qual só pode ser explicada pela dispersão anual através da ervilha e feijão plantados sob as árvores de citrus. Assim, as plantas hospedeiras alternativas, tais como, *Pennisetum setosum* e *H. rufo*, podem servir de hospedeiros alternativos a *P. oryzae* na época de entre safra e fonte de inóculo primário considerável, uma vez que estas espécies são muito difundidas nas regiões produtoras de arroz do centro-oeste brasileiro. A prevalência de *Pyricularia* em gramíneas não cultivadas pode explicar a infestação de brusone em áreas onde não se plantava arroz, anteriormente.

5.4.2. REISOLAMENTOS

Os reisolamentos feitos neste estudo permitiram confirmar a patogenicidade dos isolados 3 e 4 (*P. setosum* e *H. rufo*) aos seus hospedeiros originais e ao arroz (Tabela 24 e 25). Cruz (1978) também obteve os mesmos resultados através da inoculação por ferimento de reisolados de *P. setosum* no arroz e no próprio hospedeiro. Muito embora a mesma autora não tenha conseguido isolar fungos do gênero *Pyricularia* de *H. rufo*, neste estudo foi feito um isolamento positivo (Tabela 6), o qual foi patogênico ao arroz, ao seu hospedeiro original (Tabelas 21, 22 e 23) e pode ser reisolado de ambos (Tabela 24 e 25), confirmando a ocorrência deste fungo nesta espécie de planta.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

. Os isolados de *Pyricularia* spp. utilizados no trabalho apresentaram ampla variabilidade morfológica, fisiológica, enzimática e patogênica, porém os isolados de *Pyricularia oryzae* Cav. provenientes do arroz apresentaram-se similares entre si;

. Os conídios do fungo provenientes do arroz tenderam a ser mais longos que os dos outros isolados de gramíneas não cultivadas e as células conidiais de todos os isolados eram uninucleadas;

. A ocorrência natural de fungos do gênero *Pyricularia* em *Hyparrhenia rufo* e *Panicum maximum* foi pela primeira vez constatada;

. As gramíneas *Paspalum notatum* Flüggé e *Paspalum paniculatum* foram as mais frequentemente afetadas pelas raças do fungo do arroz;

. Os dois isolados provenientes de gramíneas não cultivadas (*Pennisetum setosum* (Swartz) L. e *Hyparrhenia rufo* (Nees) Stapf) foram patogênicos ao arroz, e as caracterizações morfológicas, fisiológicas e enzimáticas dos mesmos sugerem que sejam classificados como *Pyricularia oryzae* Cav., e estas espécies de plantas serem hospedeiras alternativas do fungo causador da brusone do arroz.

7. BIBLIOGRAFIA

ALFENAS, A.C., E. JENG e M. HUBBES, 1984. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. *Can. J. Bot.* Ottawa, 62: 1756-1762.

AMARAL, M.R.M., D.M. de SOUZA, U.M.A. MALAVOLTA e E. ISSA, 1979. Estudos de raças fisiológicas de *Pyricularia oryzae* Cav. In: Reunião de Técnicos em Rizicultura do Estado de São Paulo, 1. *Anais* p. 85-88.

ASUYAMA, H., 1965. Morphology, taxonomy, host range and life cycle of *Pyricularia oryzae*. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *The Rice Blast Disease*. Baltimore, John Hopkins, p. 9-22.

- BEDENDO, I.P., A.S. RIBEIRO e C.O.N. CARDOSO, 1979. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae* Cav. agente da brusone do arroz. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, 5: 106-109.
- BURNIER, L., R.S. JENG e M. HUBBES, 1983. Differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of *Ceratocystis ulmi* by gel electrophoresis of intramycelial enzymes. *Mycotaxon*. Ithaca, 17: 456-472.
- BUDDENHAGEN, I. W., 1977. Resistance and vulnerability of tropical crops in relation to their evolution and breeding. In: DAY, P. R. ed., *The Genetic Basis of Epidemics in Agriculture*. New York, New York Academy of Sciences, 1977. p. 309-326.
- BURDON, J.J. e D.R. MARSHAL, 1981. Isozyme variation between species and formae speciales of the genus *Puccinia*. *Can. J. Bot.* Ottawa, 59: 2628-2634.

BURDON, J.J., D.R. MARSHAL, N.J. LUIG e D.J.S. GOW, 1982.

Isozyme studies on the origin and evolution of *Puccinia graminis* f sp. *tritici* in Australia, *Aust. J. Biol. Sci.* Melbourne, 35: 231-238.

CHEVAUGEON, J. e J. A. MAKOUNZI, 1979. Heterocaryose et parasexualité chez *Pyricularia oryzae* Briose et Cav. *Ann. Phytopathol.* Paris, 11: 31-42.

CHEVAUGEON, J. e J.A. MAKOUNZI, 1981. Variability of *Pyricularia oryzae* Briosi and Cav. in West Africa. In: Symposium of Rice Resistance to Blast, Montpellier. *Proceedings*. Montpellier, IRAT-GERDAT, p.141-151.

COSTA, M.C.M., 1983. Genética de *Trichometasphaeria tursica* LUTT.; I - Morfologia e crescimento; II - Compatibilidade sexual. Porto Alegre, UFRGS, 91 p. (Dissertação de Mestrado).

CRUZ, M.A.P., 1978. Relações *Pyricularia* sp. - arroz (*Oryza sativa* L.) e gramíneas silvestres da região de Jaboticabal. Jaboticabal, UNESP, 140 p. (Tese de Graduação).

DAY, P.R., 1974. *Genetics of Host-parasite Interaction*.

San Francisco, W.H. Freeman. 238 p.

FATEMI, J. e R.R. NELSON, 1977. Intra-isolate heterokaryosis

in *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*. St. Paul,

67: 1523-1525.

FINCHAM, J.R.S., P.R. DAY e A. PADFORD, 1979. *Fungal Genetics*.

4th ed. University of California, Berkeley, 636p.

GENOVESI, A.D. e C.W. MAGILL, 1976. Heterokaryosis and

parasexuality in *Pyricularia oryzae* Cavara. *Can. J.*

Microbiol. Ottawa, 22: 531-536.

GIATGONG, P. e R.A. FREDERIKSEN, 1969. Pathogenic variability

and cytology of monoconidial subcultures of *Pyricularia*

oryzae. *Phytopathology*. St. Paul, 59: 1152-1157.

GILL, H.S. e D. POWELL, 1968. Polyacrylamine Gel (Disc)

electrophoresis of physiologic races A-1 to A-8 of

Phytophthora fragariae. *Phytopathology*. St. Paul, 58:

722-723.

GRIFFIN, D.H., 1981. *Fungal Physiology*. New York, John Wiley

p. 106-118.

HASHIOKA, Y., 1973. Notes on *Pyricularia*; II. Four species and one variety parasitic to Cyperaceae, Gramineae e Commelinaceae. *Trans. Mycol. Soc. Japan. Tokyo*, 14: 256-265.

HEBERT, T.T., 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*. St. Paul, 61: 83-87.

HEIDRICH SOBRINHO, E., 1974. Diversidade enzimática em *Zea mays* L. e sua correlação com a heterose. Porto Alegre, UFRGS, 95 p. (Tese de Doutorado).

IGARASHI, S., C.M. UTIAMADA, L.C. IGARASHI, A.H. KAZUMA e R.S. LOPES, 1986. *Pyricularia* sp. em trigo; I. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, 11: 351-352.

ITOI, S., F. SATO, J. YAMAMOTO, T. UCHITA E C. NODA, 1979. Overwintering of *Pyricularia* on the living bamboo and bamboo grass leaves and pathogenicity of the rice blast fungus, *P. oryzae* Cavara to bamboo and bamboo grass. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan. Tokyo*, 45: 375-385.

- ITOI, S.; T. MISHIMA, S. ARASE e M. NOZU, 1983. Mating behaviour of Japanese isolates of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*. St. Paul, 73: 155-158.
- KATO, H. e T. YAMAGUCHI, 1979. The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. In: International Congress of Plant Protection, 9 of Annual Meeting of American Phytopathological Society. 71., Washington DC.
- KATO, H. e T. YAMAGUCHI, 1982.. The perfect state of *Pyricularia oryzae* from rice plants in culture. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. Tokyo, 48: 607-12.
- KATO, H., T. YAMAGUCHI e N. NISHIHARA, 1976. The perfect stage of *Pyricularia oryzae* in culture. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. Tokyo, 42: 507-510.
- KATO, H., T. YAMAGUCHI e N. NISHIHARA, 1977. Seed Transmission, pathogenicity and control of ragi blast fungus and susceptibility of ragi to *Pyricularia* spp. from grasses, cereals and mioga. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. Tokyo, 43: 292-401.
- KIYOSAWA, S., 1976., Pathogenic variations of *Pyricularia oryzae* and their use in genetic and breeding studies. *SABRAO Journal* 8: 53-67.

KIYOSAWA, S., 1977. Some examples of pest and disease epidemics in Japan and their causes. In: DAY, P., ed. *The Genetic Basis of Epidemics in Agriculture*. New York, New York Academy of Sciences, 1977. p. 35-43.

KOZAKA, T., 1975. Recent advances in studies on horizontal resistance to blast disease of rice in Japan. In: Seminar on Horizontal Resistance to the Blast Disease of Rice, Cali, CIAT, 1971. *Proceedings*. Cali, CIAT, p. 101-116.

KULKARANI, N.B. e M.K. PATEL, 1956. Study of the effect of nutrition and temperature on the size of spores in *Pyricularia setariae*. Nishikado. *Indian Phytopathology*, New Dehli 9: 31-38.

LATTERELL, F.M., 1972. Two views of pathogenic stability in *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*. St. Paul, 62: 771.

LATTERELL, F.M., 1975. Phenotypic stability of pathogenic races of *Pyricularia oryzae*, and its implications for breeding of blast resistance rice varieties. In: Seminar on Horizontal Resistance to the Blast Disease of Rice, Cali, 1971. *Proceedings*. Cali, CIAT, p. 199-234.

LEUNG, H., 1984. Genetic and cytological characterization of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. Madison, Univ. of Wisconsin-Madison, 129 p. (Tese de Doutorado).

MANIBHUSHANRAO, K., 1971. Studies on the cultures of *Pyricularia oryzae* Cav.; I Morphology and pathogenicity. *Riso. Itália*, 20: 283-297.

MATSUYAMA, N., H. KATO e T. YAMAGUCHI, 1977. Comparison of the isozyme patterns of extracellular enzymes in *Pyricularia* strains from gramineous and zingiberaceous plants *Ann. Phytopathol. Soc. Japan. Tokyo*, 43: 419-425.

MATSUYAMA N. e T. KOZAKA, 1971. Comparative gel electrophoresis of soluble proteins and enzymes of rice blast fungus *Pyricularia oryzae* Cav.; *Ann. Phytopathol. Soc. Japan. Tokyo*, 37: 259-265.

NAGAKUBO, T., M. TAGA, M. TSUDA e A. UHEYAMA, 1983. Genetic linkage relationships in *Pyricularia oryzae*. *Memories of College of Agriculture. Kyoto*, 122: 75-83.

NAMAI, T. e S. YAMANAKA, 1983. A component contained in oat meal that favours the sporulation of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan. Tokyo*, 49: 274-276.

NAMAI, T. e S. YAMANAKA, 1985. Studies on the sporulation of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. *Tohoku Journal of Agricultural Research*. Sendai, 35: 69-75.

OLD, K.M., G.F. MORAN e J.C.BILL, 1984. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamoni* from Australia and Papua New Guinea. *Can. J. Bot.* Ottawa, 62: 2016-2022.

OTSUKA, H., T. KINJIRO e O. NAGAHIRO, 1965. Variability of *Pyricularia oryzae* in culture, In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *The Rice Blast Disease*. Baltimore, John Hopkins, 60-109.

OU, S.H., 1972. *Rice Diseases*. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 268 p.

OU, S.H., 1979. Breeding for resistance to rice blast: a critical review. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Rice Blast Workshop*. Los Baños, IRRI, p. 81-137.

OU, S.H., 1980. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* Palo Alto, 18: 167-187.

OU, S.H. e M.R. AYAD, 1968. Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesions and monoconidial cultures. *Phytopathology*. St. Paul., 58: 79-58.

PIMENTEL GOMES, F., 1973. *Curso de Estatística Experimental*, 5ª ed. São Paulo, Livraria Nobel. 430 p.

PRABHU, A.S., 1984. Sistema de Produção de Arroz de Sequeiro Visando Diminuir o Risco Devido a Brusone. Goiânia, EMBRAPA/CNPAP. 20p.

RAYNER, R.W., 1970. *A Mycological Colour Chart*. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 34 p.

RIBEIRO, A.S., 1980. Prevalência de raças de *Pyricularia oryzae* Cav. no Rio Grande do Sul. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília, 15: 175-182.

RIBEIRO, A.S., 1981. Compatibilidade do arroz com isolados de *Pyricularia* sp. obtidos de outras gramíneas. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília, 16: 209-121.

RIBEIRO, A.S., V.V. DAMÉ e E.L.S. DE SÁ, 1984. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae* Cav., no Rio Grande do Sul, 1980-1984. In: *Reunião da Cultura do Arroz Irrigado*, 13. Camboriú. *Anais*. Florianópolis, EMPASC, p. 280-285.

- ROSSETI, V. e R.E.T. MELLO, 1962. Estudo morfológico comparativo das cepas de *Pyricularia oryzae*. Briosi Cav. do Estado de São Paulo. *Ciência e Cultura*. São Paulo, 14: 182
- SCANDALIOS, J.G., 1969. Genetic Control of multiple forms or enzymes in plants: a Review. *Biochem. Genet.* New York, 3: 37-79.
- SINGH, R.A.; K.V.S.R.K. ROW; F.L. NUQUE e J.P. CRILL, 1983. Morphological and cytological studies of two isolates of *Pyricularia oryzae* in relation to their pathogenic variability on rice. *Plant Disease*. Beltsville, 67: 606-605.
- SOAVE, J., 1972. Estudo do crescimento vegetativo e da esporulação em meios de cultura de diferentes composições de *Pyricularia oryzae* Cav., agente do brusone do arroz. Piracicaba, ESALQ/USP 53 p. (Dissertação de Mestrado).
- STEEL, R.G.D. e I.W. TORRIE, 1980. *Principles and Procedures of Statistics*. 2ª ed. New York, McGraw-Hill. 633 p.
- SUZUKI, H., 1965. Origin of variation in *Pyricularia oryzae*. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. The Rice Blast Disease, Baltimore, John Hopkins. p. 111-149.

- TANAKA, Y., 1982. Basic study of breeding for resistance to rice blast (*Pyricularia oryzae* Cav.) disease in Brazil, In: EMBRAPA/CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ E FEIJÃO 2. *Annual report*. Goiânia, 1982. p. 17-19.
- TANAKA, Y., 1985. Gene analysis for major resistance genes to rice blast in some Brazilian upland varieties. In: EMBRAPA/CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ E FEIJÃO, 4. *Annual report*. Goiânia, 1985. p. 85-100.
- TANAKA, Y., N. MURATA e H. KATO, 1979. Behaviour of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. Tokyo, 45: 182-191.
- TANAKA, Y. e Y. YAMASAKI, 1974. Studies on variation of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav. II: Variation of chromosome number. *Jpn. J. Breed.* Tokyo, 24: 118-9.
- TANAKA, Y. e Y. YAMASAKI, 1975. Studies on variation on the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav. III: Chromosome number and DNA content. *Jpn. J. Breed.* Tokyo, 25: 118-9.

- TOLMSOFF, W.I., 1983. Heteroploidy as a mechanism of variability among fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* Palo Alto, 21: 317-40.
- TREVATHAN, L.E., 1982. Pathogenicity on ryegrass and cultural variability of Mississippi isolates of *Pyricularia grisea*. *Plant Disease*. Beltsville, 66: 592-594.
- TRAN, V.D., 1985. Upland rice review. *International Rice Commission Newsletter*. Rome, 34: 1-17.
- WOLOSHUK, C.P., H.D. SISLER, M.C. OKOUS-BALIDES e S.R. DUTKY, 1980. Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*, site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants. *Pesticide Biochem. and Physiol.* New York, 14: 256-64.
- WU, H.K. e M.M. TSAI, 1974. Studies on variation in pathogenicity in *Pyricularia oryzae* Cav. I. The mechanism of genetical variation. *Mem. Coll. Agric. Natl. Taiwan Univ. Taipei*, 15: 7-21..

UEYAMA, A. e M. TSUDA, 1975. Formation of the perfect state in culture of *Pyricularia* sp. from some graminaceous plants; Preliminary report. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* Tokyo, 16: 420-422.

YAEHASHI, H., 1977. On the sexuality of blast fungi, *Pyricularia* spp. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap. Tokyo*, 43: 432-439.

YAEHASHI, H., 1981. Studies on the perfect stage of *Pyricularia* species. *Bull. Tohoku Natl. Agric. Exp. Stn. Sendai*, 63: 49-125.

YAEHASHI, H. e K. ASAGA, 1981. Further studies on the inheritance of pathogenicity in crosses of *Pyricularia oryzae* with *Pyricularia* sp. from finger millet. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* Tokyo, 47: 677-679.

YAEHASHI, H. e T.T. HEBERT, 1976. Perithecial development and nuclear behaviour in *Pyricularia*. *Phytopathology*. St. Paul, 66: 122-26.

YAMASAKI, T. e H. NIIKEZI, 1965. Studies on variation of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* Cav. I. Karyological and genetical studies on variation. *Bull. Natl. Agric. Sci. Ser. D. Tokyo*, 13: 231-74.

YAMASAKI, Y. e T. KOZAKA, 1980. *Rice Blast Disease and Resistance Breeding*. Tokyo, Hakuyushya. 607 p.

8. APÊNDICE

Apêndice 1. Valores e significâncias dos quadrados médios das análises de variância do diâmetro, ao longo do tempo, de cada isolado de *Pynicularia* spp. em meio de aveia.

Fonte de Variação	E-104		E-105		E-107		CO-100		5		C-104	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	6.192,0333	1	7.489,2000**	1	6.870,5333	1	6.192,0333	1	3.836,4896	1	672,1333
Desvios	13	10,0692	13	11,6718	13	13,0051	13	5,2077	12	1,4354	12	16,4413
Total	14		14		14		14		13		13	
Coeficiente de determinação:	0,98		0,98		0,98		0,99		1,00		0,77	
Coeficiente de variação: %	5,29		5,90		5,97		4,26		2,56		13,32	

Fonte de Variação	11		240		303		39		431		3		4	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	6.278,5333	1	5.603,3333	1	2.698,5365	1	4.805,00	1	6.278,5333	1	5.992,5333	1	6.163,3033
Desvios	13	1,9897	13	8,9436	7	4,2408	8	5,3750	13	1,9385	13		13	6,6974
Total	14		14		8		9		14		14		14	
Coeficiente de determinação	0,10		0,98		0,99		0,99		0,10		0,99		0,99	
Coeficiente de variação: %	2,56		5,30		4,00		4,00		2,68		3,49		4,86	

Apêndice 2. Valores e significâncias dos quadrados médios das análises de variância, ao longo do tempo, de cada isolado de *Pyricularia* spp. em meio definido B.

Fonte de Variação	E-104			E-105			E-107			CO-100			5			C-104		
	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.
Regressão linear	1	4.944,8016	1	5.306,7000	1	3.477,6333	1	1.936,0333	1	3.520,8333	1	842,4102						
Desvios	12	6,2963	13	8,0179	13	1,3923	13	3,9154	13	4,2231	13	15,2519						
Total	13		14		14		14		14		14							
Coefficiente de determinação:	0,98		0,98		0,99		0,97		0,98		0,80							
Coefficiente de variação: %	5,36		6,6		2,84		6,13		4,95		15,35							

Fonte de Variação	11			240			303			39			431			3			4		
	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.
Regressão linear	1	4.830,2294	1	4.712,5333	1	5.096,0333	1	5.936,1333	1	6.278,5333	1	7.074,2545	1	5.849,3970							
Desvios	12	2,3440	13	1,1692	13	1,0231	13	1,8154	13	1,9315	13	0,9818	12	1,3181							
Total	13		14		14		14		14		14		13								
Coefficiente de determinação	0,99		1,00		1,00		1,00		1,00		1,00		1,00								
Coefficiente de variação: %	3,39		2,29		2,04		2,67		2,68		1,92		2,33								

Apêndice 3. Valores e significâncias dos quadrados médios das análises de variância do diâmetro, ao longo do tempo, de cada isolado de *Pyricularia* spp. em meio BDA.

Fonte de Variação	E-104			E-105			E-107			CO-100			5			C-104		
	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.
Regressão linear	1	7.176,5333	1	7.940,7000	1	4.118,45.	1	4.153,6333	1	5.055,0752	1	4.013,6333	1	5.055,0752	1	4.013,6333		
Desvios	12	2,5567	13	2,5923	8	10.3062	13	0,9513	11	3,6925	13	19,2717	13	3,6925	13	19,2717		
Total	13		14		9		14		12		14		14		14			
Coefficiente de determinação:	1,00		1,00		0,98		1,00		0,99		0,94		0,99		0,94			
Coefficiente de variação: %	2,73		2,79		5,62		2,08		3,78		9,69		3,78		9,69			
Fonte de Variação	11			240			303			39			431			3		
	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.	G.L.	Q.M.	G.L.
Regressão linear	1	5.394,0071	1	4.506,8960	1	4.835,6497	1	3.417,4407	1	4.808,6128	1	4.676,4092	1	5.717,3460				
Desvios	12	2,5292	12	0,9551	11	1,9479	10	3,3551	9	1,9319	11	2,7880	12	2,2509				
Total	13		13		12		11		10		12		13					
Coefficiente de determinação	0,99		1,00		1,00		0,99		1,00		0,99		1,00		1,00			
Coefficiente de variação: %	3,04		1,95		2,76		3,97		2,84		3,45		2,93		2,93			

Apêndice 4. Valores e significâncias dos quadrados médios de análise da variância do comprimento (C) lagura (L) e quociente (C/L) dos cónidios de 13 isolados de *Pyricularia* spp.

Fonte de Variação	G.L.	Comprimento		Largura		Quociente (C/L)	
		QM	F	QM	F	QM	F
Isolados	12	610,2242	81,03**	80,5721	85,07**	3,6045	25,57**
Erro	637	7,5310		0,9471		0,1671	
C.V.		10,03%		10,68%		13,42%	

** = Significativo aos níveis de 5% e 1% de probabilidade.