

Componentes bioquímicos e epidemiológicos associados à resistência do arroz à mancha parda

Keilor da Rosa Dorneles¹; Paulo César Pazdiora¹; Dionatam Marquezin¹; Ihan Gonçalves Rebhahn¹; Thomas Natali Morello¹; Leandro José Dallagnol¹

¹Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Laboratório Interação Planta Patógeno, Av. Eliseu Maciel, sn, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, RS, Brasil, CEP 96010-610.

Autor para correspondência: Leandro José Dallagnol (leandro.dallagnol@ufpel.edu.br)

Data de chegada: 02/05/2017. Aceito para publicação em: 15/03/2018.

10.1590/0100-5405/179343

RESUMO

Dorneles, K.R.; Pazdiora, P.C.; Marquezin, D.; Rebhahn, I.G.; Morello, T.N.; Dallagnol, L.J. Componentes bioquímicos e epidemiológicos associados à resistência do arroz à mancha parda. *Summa Phytopathologica*, v.45, n.1, p.44-49, 2019.

A mancha parda (*Bipolaris oryzae*) é uma das mais importantes doenças foliares do arroz. Nesse estudo, alguns componentes de resistência e algumas variáveis bioquímicas amplamente conhecidas como mecanismos de defesa de plantas contra patógenos foram avaliadas em genótipos de arroz classificados, segundo SOSBAI, como moderadamente suscetível, moderadamente resistente e resistente, buscando entender epidemiológica e bioquimicamente como ocorre a variação na resistência dos diferentes genótipos. Sete cultivares de arroz foram inoculadas com 1×10^4 conídios mL⁻¹ de *B. oryzae* nas quais foram avaliados os seguintes componentes de resistência: eficiência relativa de infecção (ERI); número final de lesão (NFL); comprimento final de lesão (CFL); taxa de expansão de lesão (*r*) e a severidade final (SF). Além disso,

também foram avaliadas variáveis bioquímicas, como atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), quitinase (QUI) e fenilalanina amônia-liase (FAL). Os resultados demonstram diferenças significativas entre as cultivares para os componentes de resistência, bem como nas atividades enzimáticas. Todos os genótipos testados foram suscetíveis a *B. oryzae*, variando quanto ao nível de resistência parcial a mancha parda. As variáveis de *r* e CFL apresentaram maior correlação com a SF indicando serem as variáveis que mais influenciam a intensidade final da doença em cada genótipo. Os genótipos com maior resistência parcial a mancha parda apresentaram alterações caracterizadas como antecipação, potencialização e prorrogação da atividade das enzimas QUI, FAL, CAT e POX.

Palavras-chave: Interação planta- patógeno, *Bipolaris oryzae*, *Oryza sativa*, Enzimas de defesa, Resistência parcial.

ABSTRACT

Dorneles, K.R.; Pazdiora, P.C.; Marquezin, D.; Rebhahn, I.G.; Morello, T.N.; Dallagnol, L.J. Biochemical and epidemiological components associated with rice resistance to brown spot. *Summa Phytopathologica*, v.45, n.1, p.44-49, 2019.

Brown spot (*Bipolaris oryzae*) is one of the most important leaf diseases affecting rice. To epidemiologically and biochemically understand the variation in resistance among rice genotypes, in this study some resistance components and some biochemical variables, widely known as plant defense mechanisms against pathogens, were evaluated in rice genotypes classified, according to SOSBAI, as moderately susceptible, moderately resistant and resistant. Seven rice cultivars were inoculated with 1×10^4 conidia mL⁻¹ of *B. oryzae* and the following resistance components were evaluated: relative infection efficiency (ERI); final lesion number (NFL); final lesion length (CFL); lesion growth rate (*r*) and final severity (SF). In addition, biochemical

variables such as activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), chitinase (CHI) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) were analyzed. Results showed significant differences among cultivars for resistance components, as well as for enzyme activities. All tested genotypes were susceptible to *B. oryzae*, varying for the level of partial resistance to brown spot. The variables *r* and CFL showed higher correlation to SF, indicating to be the variables that most influenced the final disease intensity in each genotype. Rice genotypes showing higher partial resistance to brown spot had alterations characterized as earlier, potentiated and longer SOD, CAT POX and PAL activities.

Keywords: Plant-pathogen interaction, *Bipolaris oryzae*, *Oryza sativa*, defense enzymes, partial resistance.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas e é um dos cereais mais produzidos no mundo, ficando atrás apenas do trigo e do milho (19). Na América do Sul, o Brasil destaca-se como maior produtor, sendo a região Sul do país a principal região orizícola. Nesta região brasileira foram obtidos ganhos substanciais na produtividade na última década produzindo em média 7,729 kg ha⁻¹, porém as doenças ainda são um dos principais fatores que limitam a expressão do potencial produtivo das cultivares de arroz

que pode chegar até 10,000 kg ha⁻¹ (19).

A mancha parda, causada por *Bipolaris oryzae* Breda de Haan é uma das principais doenças devido ao dano causado na produtividade e na qualidade do grão (10). A mancha parda, apesar de ser mais comum ocorrer após a floração, pode-se desenvolver em todas as fases do ciclo de desenvolvimento do arroz (2).

B. oryzae é um patógeno com relação parasitária necrotrófica, a qual é caracterizada pela morte da célula do hospedeiro para então

extração dos nutrientes necessários ao micro-organismo (20). Para isso, o patógeno utiliza como mecanismo de ataque enzimas de degradação da parede celular e toxinas como as ofiobolinas A e B (20). As ofiobolina A e B são toxinas não-específicas encontradas nos fluídos da germinação dos conídios, importantes na patogenicidade, e secretadas durante a colonização contribuindo substancialmente para a severidade da doença (22). As toxinas atuam suprimindo as defesas das plantas ou agindo em pontos específicos na célula do hospedeiro, principalmente no processo fotossintético, levando ao estresse oxidativo e a ocorrência da peroxidação lipídica, que consequentemente resulta no colapso celular (9, 14).

Assim, diante desta estratégia de patogenicidade de *B. oryzae*, fica evidente a dificuldade para obtenção de cultivares de arroz com resistência completa à mancha parda, devido à necessidade de introdução de muitos genes de resistência, para que assim possa proporcionar ao genótipo essa característica (14, 19). Contudo, há graus variáveis de resistência nos genótipos de arroz cultivados, sendo considerados, segundo descrito nas indicações técnicas para a cultura do arroz (19), desde suscetíveis até resistentes.

Neste estudo, alguns componentes de resistência e algumas variáveis bioquímicas amplamente conhecidas como mecanismos de defesa de plantas contra patógenos foram avaliadas em genótipos de arroz classificados, segundo Sosbai (19), como moderadamente suscetível, moderadamente resistente e resistente, buscando entender epidemiológica e bioquimicamente como ocorre a variação na resistência dos diferentes genótipos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos em casa de vegetação e no Laboratório Interação Planta-Patógeno (LIPP), ambos pertencente ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” da Universidade Federal de Pelotas (RS).

Seis cultivares de arroz com diferentes níveis de resistência a mancha parda e uma sem informação (19) foram utilizadas, sendo elas: resistentes Avaxi CL e Inov CL; médio resistente IRGA 424 e BRS Pelota; médio a suscetível IRGA 417 e Puitá Inta CL; e BRS Querência, sem informação. As sementes de cada cultivar foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de dois litros contendo 2 kg de solo. Após a emergência das plântulas foi realizado raleio deixando quatro plantas por vaso. Os tratos culturais seguiram as recomendações técnicas para o arroz irrigado (19).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada parcela composta por um vaso com quatro plantas. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

O isolado LIPP042015 de *B. oryzae* utilizado foi obtido a partir de sementes da cultivar IRGA 424. O fungo foi mantido em papel de filtro em frasco de vidro contendo sílica gel a 4 °C (7). Visando a obtenção de inóculo, pedaços do papel colonizados foram transferidos para placas Petri contendo meio de cultivo a base de batata-dextrose-agar (BDA) e mantidos à 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

O preparo da suspensão de inóculo foi conforme descrito em Dallagnol et al. (7) e a inoculação realizada em folhas de plantas de arroz no estágio fenológico V7-V8 [segundo escala de Counce, (6)] por meio da pulverização da suspensão de 1×10^4 conídios por mL⁻¹ usando um atomizador manual (Tecblas, REF: 359 – 60 mL / Porto Alegre, Brasil). Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara úmida, com fotoperíodo de 12h à 25± 2 °C

e umidade relativa superior a 95%. Após 48 horas em câmara úmida, as plantas foram transferidas para um ambiente com umidade relativa em torno de 70%, temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. As plantas controles, não inoculadas, foram pulverizadas com água destilada e expostas às mesmas condições das plantas inoculadas.

A terceira, quarta e quinta folhas do colmo principal foram utilizadas para avaliações dos seguintes componentes de resistência, seguindo a metodologia anteriormente descrita (7): período de incubação (PI); eficiência relativa de infecção (ERI); taxa de expansão de lesão (*r*); número final de lesão (NFL); comprimento final de lesão (CFL); e a severidade final (SF).

O PI (horas) é o tempo entre a inoculação e a manifestação dos sintomas, para isso, as plantas foram avaliadas a cada 3 horas após a inoculação. A ERI é a proporção, em porcentagem, de conídios que conseguem infectar e colonizar. Para obter a ERI, duas laminulas (20 × 20 mm) por repetição de cada tratamento foram aderidas na superfície adaxial das folhas antes da inoculação, e, posteriormente, realizada a contagem do número de conídios sob microscópio. Transcorridas 24 horas do período de incubação, através de uma lupa de bolso foi realizada a contagem do número de lesões por cm² de área foliar. A razão entre o número de lesões por cm² e o número de conídios por cm² foi definido como a ERI. A *r* indica a velocidade da colonização dos tecidos da planta pelo patógeno. A *r* foi calculada com base nas mensurações de cinco lesões em uma folha por planta, de cada repetição, a cada 24 h após o PI. O CFL (mm) foi medido às 312 horas após a inoculação (hai) em cinco lesões, selecionadas aleatoriamente, na região central de duas folhas de uma planta por repetição, utilizando-se um paquímetro eletrônico digital. O NFL (cm²) foi quantificado ao final das avaliações e indica o número de sítios de infecção que efetivamente se desenvolveram e a SF (%) foi estimada de acordo com a escala diagramática proposta por Schwanck & Del ponte (17).

Para determinação da atividade enzimática, a segunda, terceira e quarta folhas do colmo principal de cada planta de quatro cultivares contrastantes na resistência a mancha parda (Inov CL, Irga 424, Puitá INTA CL e BRS Querência) foram amostradas as 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai). Imediatamente após a coleta, as folhas foram congeladas usando nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C. Para cada tempo de amostragem, foram utilizadas quatro repetições, cada uma constituída por uma planta.

O extrato bruto usado para a determinação das atividades enzimáticas foi obtido conforme Dallagnol et al. (9).

Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), e quitinase (QUI) foram determinadas conforme descrito em Dallagnol et al. (9). Em resumo, a atividade da enzima SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada por meio da quantificação colorimétrica da fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A atividade específica da SOD, correspondeu à quantidade da enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT, nas condições do ensaio, sendo os resultados expressos em unidades de SOD mg⁻¹ de proteína. A atividade da enzima CAT (EC 1.11.1.6) foi definida através quantificação da degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Merck, São Paulo, Brasil) em espectrofotômetro (model UV-UM51- Bel[®]) e expressos em micromol de H₂O₂ degradado min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. A atividade da enzima POX (EC 1.11.1.7) foi determinada pela quantificação colorimétrica da oxidação do pirocatecol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A atividade foi expressa mol de purpurogalina produzida por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. A atividade da QUI (EC 3.2.1.14) foi determinada por meio da quantificação colorimétrica da liberação de “pnitrophenyl”

Tabela 1. Eficiência relativa de infecção (ERI), número final de lesões por cm² de folha (NFL), taxa de expansão de lesão (*r*), comprimento final de lesão (CFL) e severidade final (SF) da mancha parda em folhas de plantas de arroz de diferentes cultivares.

Classif.*	Cultivares	ERI (%)	NFL	<i>r</i>	CFL (mm)	SF (%)
R	Avaxi CL	70,8 e	7,0 c	0,0065 c	2,05 c	6,0 de
R	Inov CL	70,7 e	6,3 c	0,0066 c	2,00 c	5,2 e
MR	IRGA 424	81,3 d	7,6 bc	0,0078 c	2,31 c	7,1 cd
MR	BRS Pelota	82,4 d	7,8 bc	0,0079 c	2,50 c	7,5 cd
MS	IRGA 417	90,5 b	9,8 ab	0,0128 b	3,70 b	29,6 b
MS	PUITÁ Inta CL	85,0 c	8,0 bc	0,0088 bc	2,82 bc	8,1 c
SI	BRS Querência	93,9 a	11,0 a	0,0266 a	6,67 a	45,0 a
	CV %	1,32	12,50	19,02	12,61	5,34

Médias de cada variável seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste *t* ($p \leq 0,05$) $n=8$. *Classificação segundo SOSBAI (2014) R= resistente; MR= médio resistente; MS= médio suscetível e SI= sem informação.

clivado do substrato análogo da quitina “p-nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose”(PNP) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e expressa em mM de “p-nitrophenyl” produzido por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5) foi quantificada conforme descrito em Guerra et al. (12), baseado na quantificação calorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e expressa em μ mol de ácido trans cinâmico min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. A concentração de proteínas utilizada para o cálculo da atividade das enzimas foi obtida pelo método de Bradford, usando albumina sérica bovina como padrão.

Para evidenciar a homogeneidade dos dados foi aplicado o teste de *Shapiro Wilk* para todas as variáveis realizadas nos experimentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Student (teste-*t*) ou teste Tukey ($p \leq 0.05$) no software SAS (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTADOS

Todos os componentes de resistência variaram significativamente entre as cultivares (Tabela 1), exceto o PI que foi de 18 horas para todas. A cultivar mais suscetível foi a BRS Querência, que apresentou maiores valores de ERI, NFL, *r*, CFL e SF (Tabela 1). Nesta cultivar a severidade final foi 8,6 vezes maior que na cultivar Inov CL, e 1,5 vezes maior que a cultivar IRGA 417, as quais apresentaram os extremos de severidade final entre as cultivares com informação quanto à resistência da mancha parda apresentadas nas indicações técnicas (19). Para IRGA 417, a maior severidade final (29,6%) foi consequência dos valores elevados da ERI, NFL, *r* e CFL (Tabela 1). A severidade final foi uma diferença marcante entre as cultivares IRGA 417 e Puitá Inta CL, ambas consideradas moderadamente suscetíveis, sendo 3,5 vezes menor na cultivar Puitá Inta CL, o que pode estar associado aos menores valores dos componentes de resistência, especialmente a ERI que foi significativamente menor (Tabela 1). As cultivares Inov CL e Avaxi CL foram as menos suscetíveis com reduções de 21,85; 35,89; 48,82 e 45,26% para o ERI, NFL, *r* e CFL, respectivamente, quando comparadas a cultivar IRGA 417 (Tabela 1).

Em relação às cultivares IRGA 424 e BRS Pelota, ambas apresentaram médias padrões de genótipos com resistência mediana a mancha parda, na qual eram inferiores às IRGA 417, entretanto, superiores aos genótipos considerados como resistente Inov CL e Avaxi CL (Tabela 1).

Na análise de correlação entre os componentes de resistência com a

Tabela 2. Coeficiente de correlação da eficiência relativa de infecção (ERI), número final de lesões por cm² de folha (NFL), taxa de expansão de lesão (*r*), comprimento final de lesão (CFL) com a severidade final (SF) da mancha parda em folhas de plantas de arroz de diferentes cultivares.

Variáveis	Coeficiente de Correlação	
	SF	
ERI	0,78*	
NFL	0,81	
<i>r</i>	0,91	
CFL	0,93	

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$).

severidade final foi constatado que todos os componentes de resistência avaliados apresentaram correlação positiva e significativa, sendo as maiores correlações para a CFL e *r* (Tabela 2).

A atividade das enzimas SOD, CAT, POX, FAL e QUI foram significativamente maiores nas plantas inoculadas às 24 e ou 72 hai (Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5) nas folhas das plantas da cultivar Inov CL comparado as planta não inoculadas. Na cultivar IRGA 424, apenas a enzima POX, as 24 hai, aumentou significativamente (Tabela 4), enquanto que para as cultivares Puitá Inta CL e BRS Querência somente a atividade da enzima FAL aumentou, às 48 hai (Tabela 4). Por outro lado, a atividade das enzimas SOD, CAT, POX e QUI entre às 48 a 72 hai foi significativamente menor nas plantas inoculadas principalmente para as cultivares Puitá Inta CL e BRS Querência, comparado as não inoculadas (Tabela 3 e Tabela 4).

Entre as cultivares, as diferenças mais expressivas ficaram principalmente para o genótipo Inov CL, o qual apresentou atividade significativamente maior para SOD (72 hai), CAT (24 e 72 hai), POX (24 hai) e FAL (72 hai) em plantas inoculadas, quando comparado as demais cultivares (Tabela 3 e Tabela 4).

Para cultivar IRGA 424 a diferença, quando comparado a cultivar Inov CL, foi a maior atividade da FAL as 48 hai (Tabela 4), enquanto que para cultivar Puitá Inta CL as diferenças foram a redução significativa da atividade da SOD e FAL as 72 hai e da QUI as 24 hai quando comparado as cultivares Inov CL e IRGA 424 (Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5).

Na cultivar BRS Querência houve atividade inferior da SOD (48 – 72 hai), CAT (72 hai) e FAL (48 hai) (Tabela 3 e Tabela 4), quando comparado com as demais cultivares. Para as plantas não inoculadas, em geral, não foi observado variação significativa na atividade das enzimas analisadas.

Tabela 3. Atividade da enzima superóxido dismutase e catalase em folhas de plantas de arroz de diferentes cultivares nas diferentes horas após a inoculação (Hai) ou não com *Bipolaris oryzae*.

Cultivares		Superóxido dismutase - U.mg ⁻¹ proteína					
		24		Hai 48		72	
		NI	I	NI	I	NI	I
R	Inov CL	274,25 ^{bc} A	354,64 ^a <u>A</u>	188,72 ^a A	211,81 ^a <u>B</u>	229 ^c A	283 ^{ab} <u>A</u>
MR	Irga 424	372,16 ^{ba} A	212,81 ^{**} <u>A</u>	250,75 ^a B	221,28 ^a <u>A</u>	311 ^b A	217 ^{b*} <u>A</u>
MS	Puitá INTA CL	471,76 ^a A	224,86 ^{**} <u>A</u>	253,74 ^a B	153,0 ^a <u>A</u>	362 ^a A	188 ^{c*} <u>A</u>
SI	BRS Querência	142,80 ^c A	218,67 ^a <u>A</u>	243,94 ^a A	59,75 ^{b*} <u>B</u>	193 ^d A	139 ^{d*} <u>A</u>
CV%		26,45					
Cultivares		Catalase - μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína					
		24		Hai 48		72	
		NI	I	NI	I	NI	I
R	Inov CL	76,25 ^a A	81,32 ^{a*} <u>A</u>	38,46 ^b B	34,64 ^a <u>C</u>	40,98 ^a B	61,35 ^a <u>B</u>
MR	Irga 424	45,84 ^b B	47,89 ^b <u>A</u>	58,61 ^{ba} A	32,12 ^{**} <u>A</u>	40,35 ^a B	40,26 ^{ba} <u>A</u>
MS	Puitá INTA CL	73,92 ^a A	46,98 ^{b*} <u>A</u>	68,25 ^a A	31,32 ^{**} <u>A</u>	44,05 ^a B	42,98 ^{ba} <u>A</u>
SI	BRS Querência	54,50 ^b A	46,45 ^b <u>A</u>	42,62 ^b A	29,37 ^a <u>A</u>	34,76 ^a B	30,61 ^b <u>A</u>
CV%		19,14					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando cultivares. * refere-se a diferença significativa, pelo teste - *t* ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento, não inoculação (NI) ao inoculado (I), para cada horário de avaliação. Letras maiúsculas não sublinhadas na linha, compara as médias dos tratamentos não inoculados e as letras sublinhadas, compara as médias dos tratamentos inoculados, nos horários de avaliação pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando tempo.

Tabela 4. Atividade da enzima peroxidase e fenilalanina amônia-liase em folhas de plantas de arroz de diferentes cultivares nas diferentes horas após a inoculação (HAI) ou não com *Bipolaris oryzae*.

Cultivares		Peroxidase - mol mim ⁻¹ mg ⁻¹ proteína					
		24		Hai 48		72	
		NI	I	NI	I	NI	I
R	Inov CL	1,37 ^a A	2,75 ^{ab*} <u>A</u>	0,86 ^a B	0,41 ^a <u>C</u>	0,33 ^c C	1,26 ^{ab*} <u>B</u>
MR	Irga 424	0,18 ^c A	1,47 ^{b*} <u>A</u>	1,22 ^a B	0,86 ^a <u>A</u>	0,96 ^{ba} B	0,96 ^a <u>A</u>
MS	Puitá INTA CL	1,59 ^a A	1,15 ^b <u>A</u>	0,79 ^a B	0,73 ^{ab*} <u>A</u>	0,89 ^b B	0,90 ^a <u>A</u>
SI	BRS Querência	0,82 ^b A	0,82 ^b <u>A</u>	1,18 ^a A	0,43 ^a <u>B</u>	1,21 ^a A	1,11 ^a <u>A</u>
CV%		31,92					
Cultivares		Fenilalanina amônia-liase - mmol mim ⁻¹ mg ⁻¹ proteína					
		24		Hai 48		72	
		NI	I	NI	I	NI	I
R	Inov CL	1,37 ^a A	2,14 ^{ab*} <u>A</u>	0,25 ^a B	0,25 ^{bc} <u>B</u>	0,21 ^b B	0,31 ^{ab*} <u>B</u>
MR	Irga 424	1,32 ^a A	1,37 ^a <u>A</u>	0,25 ^a B	0,54 ^{ab*} <u>B</u>	0,68 ^a B	0,26 ^{b*} <u>B</u>
MS	Puitá INTA CL	1,60 ^a A	0,79 ^{ab*} <u>A</u>	0,15 ^{ba} C	0,38 ^{ba*} <u>B</u>	0,63 ^a B	0,14 ^{c*} <u>C</u>
SI	BRS Querência	1,32 ^a A	1,09 ^a <u>A</u>	0,09 ^b B	0,16 ^{c*} <u>B</u>	0,19 ^b B	0,10 ^{c*} <u>B</u>
CV%		52,93					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando cultivares. * refere-se a diferença significativa, pelo teste - *t* ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento, não inoculação (NI) ao inoculado (I), para cada horário de avaliação. Letras maiúsculas não sublinhadas na linha, compara as médias dos tratamentos não inoculados e as letras sublinhadas, compara as médias dos tratamentos inoculados, nos horários de avaliação pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando tempo.

Tabela 5. Atividade da enzima quitinase em folhas de plantas de arroz de diferentes cultivares 24 horas após a inoculação com *Bipolaris oryzae*.

Cultivares		Quitinase - mmol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína	
		NI	I
R	Inov CL	0,14 b	0,87 a*
MR	Irga 424	0,47 ab	0,50 ab
MS	Puitá INTA CL	0,80 a	0,33 b*
SI	BRS Querência	0,46 ab	0,44 ab
CV%		41,08	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando cultivares. * refere-se a diferença significativa, pelo teste de teste - *t* ($p \leq 0,05$) em relação ao tratamento não inoculação ao inoculado.

DISCUSSÃO

A severidade da mancha parda apresentou variação entre as cultivares, reforçando a hipótese que a resistência parcial é contrastante entre os genótipo. Os menores valores da severidade podem ser atribuídos à dificuldade do *B. oryzae* em penetrar as células da epiderme, sua principal via de infecção (20). Tal fato se mostra evidente quando observamos o ERI, que se torna paralelamente inferior conforme aumenta o nível de resistência das plantas - principalmente nas cultivares Inov CL e Avaxi CL, quando comparadas às demais cultivares. As diferenças entre maior ou menor ERI, refletem, respectivamente, no maior ou menor NFL entre as cultivares. A redução na porcentagem do ERI, bem como o menor CFL, foram constatados também em cultivares de arroz parcialmente resistentes a brusone (*M. grisea*) (18). Porém, de acordo com os resultados obtidos para o PI, os genótipos apresentam ação na capacidade de desacelerar o progresso da lesão, mas não no aparecimento dos primeiros sintomas. Isso é constatado através do *r*, que se refere ao progresso de colonização do patógeno no hospedeiro, influenciando diretamente no CFL. Dallagnol et al. (7) relataram que a redução no *r* afetou o CFL em folhas de arroz inoculadas com *B. oryzae* e essas informações corroboram com os dados encontrados nesse estudo. Além disso, a variável *r* tem sido usada por melhoristas de plantas para testar a resistência parcial de cultivares a diferentes patógenos (3). Além disso, essa variável sumariza os possíveis mecanismos de defesa da planta em impedir a colonização dos seus tecidos pelo patógeno, seja através de uma defesa a nível estrutural ou bioquímico (16, 20).

B. oryzae objetiva colonizar o tecido do hospedeiro para obter nutrientes, para isso, dispõem de enzimas e toxinas, com função de desencadear o colapso celular através da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, despolarização do potencial elétrico transmembrana e do fluxo de potássio (5). Em reposta, a planta faz uso de compostos bioquímicos, como forma de atenuar os efeitos deletérios causados pelo patógeno (24). A suscetibilidade ou resistência da planta está diretamente relacionada com a eficiência dessa resposta de defesa ao ataque do patógeno. As enzimas hidrolases (QUI), oxido-redutases (SOD, CAT e POX) e liases (FAL) produzidas pela planta são de suma importância para a resistência ao estresse biótico, pois agem diretamente sobre o patógeno ou limitam a propagação dos processos oxidativos. Assim, permitindo que as células mantenham a sua viabilidade ou alterem seu metabolismo, proporcionando a produção de compostos com as mais variadas funções (24). Desse modo, podemos associar

que genótipos considerados suscetíveis ou sem informações, como as cultivares Puitá INTA CL e BRS Querência, apresentaram as maiores porcentagens de severidade da mancha parda devido à variação e a baixa atividade dessas enzimas na presença do patógeno.

A baixa atividade da QUI nas primeiras 24 hai, pode ter possibilitado o progresso de infecção e colonização do *B. oryzae*, devido que essa enzima tem ação direta sobre o patógeno, dada a sua atividade hidrolítica, que quebra os polímeros estruturais presentes na parede dos patógenos (23). Na literatura, inúmeros trabalhos relatam o aumento na atividade da QUI em folhas de arroz e em outras culturas logo nas primeiras horas após a inoculação, sendo considerada como mudança geral no metabolismo da planta, visando à resistência. Observa-se, também, pouca atividade na enzima FAL, situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário, esta enzima é responsável pela síntese de metabólitos secundários como fitoalexinas e lignina contra patógenos (9, 16). Como agravante, conforme avança o tempo após a inoculação, enzimas como a CAT e POX - que têm ação de desintoxicação das espécies reativas de oxigênio, seja por meio da degradação do H₂O₂ em H₂O e O₂ ou que utiliza o H₂O₂ como substrato além de compostos fenólicos para biossíntese de lignina (1), importantes na resposta da planta a estresses e doenças (11). Os resultados, estão de acordo com Vidhyasekaran et al. (21), que constataram em folhas de arroz inoculadas com *B. oryzae*, a redução tanto na concentração de compostos fenólicos, quanto na atividade das enzimas POX e FAL, indicando possível supressão dos mecanismos de defesa da planta pelo patógeno. Sendo assim, o provável desequilíbrio na produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio nas células da folha das cultivares Puitá INTA CL e BRS Querência, podem ter desencadeado danos em pigmentos, lipídios, proteínas e DNA, provocando a degradação da clorofila, ruptura da membrana celular, danos no núcleo e, subsequentemente, levado à destruição celular, resultando na clorose e necrose do tecido foliar, como somatório a evolução da doença.

Com esses resultados podemos inferir que as diferenças na resistência ao *B. oryzae* observadas nos genótipos testados podem estar relacionadas com a antecipação, potencialização e prorrogação da atividade de enzimas participantes do sistema antioxidante. Como, por exemplo, não só SOD, CAT e POX, enzimas envolvidas no metabolismo secundário, como também a FAL e enzimas com ação direta no patógeno, como a QUI. Além disso, vale ressaltar a possibilidade da existência de uma barreira física, a qual pode ajudar a retardar ou inibir a infecção pelo patógeno conforme foi descrito por Bonman et al. (4) para cultivares de arroz que apresentam resistência parcial a brusone, e também, por Moreira et al. (15) para a mancha parda. Associado a isso, pode haver o acúmulo ou produção de compostos antimicrobianos que afetam não apenas o processo de infecção, mas também de colonização do patógeno através do seu retardamento ou inibição (16).

No Brasil ainda não foram identificados genes importantes para a resistência à mancha parda, entretanto já vem sendo descritos variedades com resistência parcial e *loci* de características quantitativas (QTL) de resistência à doença (13). Acrescenta-se, ainda, que segundo Berger et al. (3), tanto o tamanho da lesão quanto a taxa de expansão de lesão são importantes critérios para medir e selecionar genótipos de arroz resistentes à doenças foliares.

Porém, em situações onde as condições são favoráveis ao patógeno, como temperatura (faixa de 25 a 32 °C) e umidade relativa (90%) (8, 14), o processo de infecção é intensificado, levando a supressão da resistência, mesmo de cultivares com níveis elevados de resistência parcial, evidenciando o sério problema enfrentado no setor orizícola anualmente.

CONCLUSÕES

Os genótipos testados foram suscetíveis a *B. oryzae*, variando quando ao nível de resistência parcial à mancha parda. A antecipação, potencialização e prorrogação da atividade de enzimas como: catalase, fenilalanina amônia-liase, peroxidase e quitinase demonstram ser algumas das vias que proporciona a resistência parcial aos genótipos. Ademais, as variáveis de *r* e CFL apresentaram maior correlação com a severidade final indicando serem as variáveis que mais influenciam a intensidade final da doença em cada genótipo.

REFERÊNCIAS

1. Barbosa, M. R.; Silva, M. M. A.; Willadino, L.; Ulisses, C.; Camara, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
2. Bedendo, I. P.; Prabhu, A. S. Doenças do arroz. In: Kimati, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005. p. 79-90.
3. Berger, R. D.; Filho, A. B.; Amorin, L. Lesion expansion as an epidemic component. **Phytopathology**, Ithaca, v. 87, n. 10, p. 1005-1013, 1997.
4. Bonman, J. M.; Estrada, B. A.; Kim, C. K.; Ra, D. S.; Lee, E. J. Assessment of blast disease and yield loss in susceptible and partially resistant rice cultivars in two irrigated low land environments. **Plant Disease**, Washington, v. 75, n. 5, p. 462- 466, 1991.
5. Cocucci, S. M.; Morgutti, S.; Cocucci, N.; Gianani, L. Effects of ophiobolin A on potassium permeability, transmembrane electrical potential and proton extrusion in maize roots. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 32, p. 9-16. 1983.
6. Counce, P. A.; Keisling, T. C.; Mitchell, A. J. A Uniform and adaptative system for expressing rice development. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 436-443, 2000.
7. Dallagnol, L. J.; Rodrigues, F. A. Mielli, M. V.; Ma, J. F.; Datnoff, L. E. Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. **Phytopathology**, Ithaca, v. 99, n. 1, p. 116-121, 2009.
8. Dallagnol, L. J.; Rodrigues, F. A.; DaMatta, F. M. Brown spot of rice is affected by photon irradiance and temperature. **Journal of Phytopathology**. Berlin, v. 9, p. 630-634, 2011.
9. Dallagnol, L. J.; Rodrigues, F. A.; DaMatta, F. M. Mielli, M. V.; Pereira, S. C. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. **Phytopathology**, Ithaca, v. 101, n. 1, p. 92-104, 2011.
10. Dallagnol, L. J.; Rodrigues, F. A.; Mielli, M. V. B.; Ma, J. F. Rice grain resistance to brown spot and yield are increased by silicon. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 39, n. 1, p. 56-63, 2014.
11. Gómez-Vásquez R.; Day, R.; Buschmann, H.; Randles, S.; Beeching, J. R.; Cooper, R. M. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. **Annals of Botany**, London, v. 94, p. 87-97, 2004.
12. Guerra, A. M. N. M. Aspectos bioquímicos da resistência do algodoeiro à ramulose potencializada pelo silício. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 3, p. 292-303, 2013.
13. Katara, J. L.; Sonah, H.; Deshmukh, R.; Chaurasia, R.; Kotasthane, A. S. Molecular analyses of QTLs associated with resistance to brown spot in rice (*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v. 70, n. 1, p. 17-21, 2010.
14. Mengiste, T. Plant Immunity to necrotrophs. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 50, p. 267-294, 2012.
15. Moreira, W. R.; Re; Resende, R. S.; Rodrigues, F. A.; Andrade, C. C. L.; Nascimento, C. W. A. Influência do magnésio na resistência do arroz à mancha parda. **Bragantia**, Campinas, v.72, n. 2, p. 154-161, 2013.
16. Rodrigues, F. A.; Jurick, W. M.; Datnoff, L. E.; Jones, J. B.; Rollins, J. A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice *Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, n. 4, p. 144-159, 2005.
17. Schwanck, A. A.; Del Ponte, E. M. Accuracy and reliability of severity estimate using linear or logarithmic disease diagram sets in true colour or black and white: a study case for rice brown spot. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, p. 670-682, 2014.
18. Seebold, K. W. Kucharek, T. A.; Datnoff, L. E.; Correa-Victoria, F. J.; Marchetti, M. A. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. **Phytopathology**, Ithaca, v. 91, p. 63-9, 2001.
19. Sosbai. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, 2016. 200 p.
20. Sunder, S.; Singh, R.; Agarwal, R. Brown spot of rice: an overview. **Indian Phytopathology**. New Delhi, v. 67, n. 3, p. 201-215, 2014.
21. Vidhyasekaran, P.; Borromeio, E. O.; Mew, T. W. *Helminthosporium oryzae* toxins suppresses phenol metabolism in rice plants and aids pathogen colonization. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 307-15, 1992.
22. Xiao, J. Z.; Tsuda, M.; Doke, N.; Nishimura, S. Phytotoxins produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 81, p. 58-64, 1991.
23. Zareie, R.; Melanson, D. L.; Murphy, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 10, p. 1031-1039, 2002.
24. Zhang, Y.; Lubberstedt, T.; Xu, M. The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. **Journal of Genetics and Genomics**, Beijing, v. 40, n. 1, p. 23-35, 2013.