

# Mecanismos de Resistência do Arroz

(*O. sativa* L.) À BRUSONE (*P. oryzae* Cav.)

ALCEU SALLABERRY RIBEIRO - Eng.º Agr.º

Orientador: CAIO O. NOGUEIRA CARDOSO - Ph. D.

*Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.*

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

1976

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Riograndense do Arroz, pela licença de afastamento para o Curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, pela concessão de uma bolsa de estudos.

Ao Professor Caio Octávio Nogueira Cardoso, pela orientação e materiais oferecidos para a realização dos trabalhos.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia e Microbiologia da ESALQ, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Professor Humberto de Campos, pelas orientações nas análises estatísticas.

Ao Dr. Toshihiko Hino, pela obtenção e tradução de trabalhos em japonês.

Ao Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>. Sidney Bicca da Rocha, pela versão do resumo para o inglês.

A jornalista Maria Helena Rezende e a bibliotecária Glória Ferreira, pela correção dos originais.

OFERECIMENTO

A minha esposa Maria Marta e a minha filha Cláudia pela grande compreensão, apôio e colaboração.

## INDICE

	Página
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
Escolha dos isolados de <u>P.oryzae</u> e variedade de arroz....	12
Cultivo e estocagem dos isolados de <u>P.oryzae</u> .....	14
Preparo das suspensões de esporos de <u>P.oryzae</u> .....	15
Obtenção de exsudatos por difusão em gotas.....	16
Extração em etanol 70%.....	18
Bioensaios com esporos de <u>P.oryzae</u> .....	20
Cromatografia de camada fina (CCF).....	22
RESULTADOS.....	24
Efeitos fungistáticos de exsudatos obtidos por difusão em gotas.....	24
Experimento 1 - Efeito dos exsudatos de folhas e bainhas de arroz sobre <u>P.oryzae</u> .....	24
Experimento 2 - Efeito nutricional de exsudatos, em água destilada, de folhas de arroz da variedade Ze-	

nith sobre a germinação e o alongamento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> .....	26
Experimento 3 - Efeito dos exsudatos de folhas de três variedades de arroz inoculadas com três isolados diferentes de <u>P.oryzae</u> .....	30
Efeitos fungistáticos dos extratos obtidos por extração em etanol.....	31
Experimento 4 - Estudos preliminares dos efeitos dos extratos de folhas de arroz sobre dois isolados de <u>P.oryzae</u> .....	31
Estudo dos efeitos dos extratos diluidos em diversas concentrações, sobre <u>P.oryzae</u> .....	32
Experimento 5 - Estudo preliminar dos efeitos dos extratos diluidos sobre o isolado 63m <sub>1</sub> de <u>P.oryzae</u> .....	33
Experimento 6 - Efeito dos extratos diluidos sobre o isolado 63m <sub>1</sub> , de <u>P.oryzae</u> .....	34
Estudo dos efeitos dos extratos de folhas de arroz da variedade Dular sobre <u>P.oryzae</u> , em diferentes tempos de incubação (Experimentos 6 e 7).....	38
Comparação qualitativa dos extratos de folhas, inoculadas e sadias, de arroz da variedade Dular, cromatograficamente.....	48
Estudo dos efeitos dos eluídos dos extratos de Dular sobre o <u>P.oryzae</u> (Experimentos 8 e 9).....	49
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	55

RESUMO.....	61
SUMMARY.....	63
LITERATURA CITADA.....	65

## LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Efeito de exsudatos de folhas e bainhas de arroz da variedade Zenith sobre a germinação e o crescimento do tubo germinativo do isolado 63m <sub>1</sub> de <u>P.oryzae</u> .....	25
QUADRO 2 - Efeito das diluições do exsudato de folhas de arroz em água destilada sobre a germinação de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em diferentes concentrações, após 6 e 12 horas de incubação.....	28
QUADRO 3 - Efeito das diluições do exsudato de folhas de arroz em água destilada sobre o alongamento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em diferentes concentrações, após 6 e 12 horas de incubação.....	29
QUADRO 4 - Efeito de diluições dos extratos de folhas de arroz, inoculadas e sadias, sobre a germinação de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em diferentes tempos de incubação.....	35

QUADRO 5 - Efeito de diluições dos extratos de folhas de arroz, inoculadas e sadias, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> de <u>P.oryzae</u> , em diferentes tempos de incubação.....	36
QUADRO 6 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na primeira extração, sobre a germinação de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em diferentes períodos de incubação.....	40
QUADRO 7 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na primeira extração, sobre a germinação de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> , em diferentes períodos de incubação.....	41
QUADRO 8 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na primeira extração, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em diferentes períodos de incubação.....	42
QUADRO 9 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na primeira extração, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> , em diferentes tempos de incubação.....	43
QUADRO 10 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na segunda extração, sobre a germinação de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em diferentes tempos de incubação....	44
QUADRO 11 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na segunda extração, sobre a germinação de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> , em diferentes tempos de incubação....	45



QUADRO 12 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na segunda extração, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em diferentes tempos de incubação.....	46
QUADRO 13 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na segunda extração, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> , em diferentes tempos de incubação.....	47
QUADRO 14 - Efeito dos eluídos de extratos de Dular, na concentração 1:1, sobre a germinação de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em tempos diferentes de incubação.....	51
QUADRO 15 - Efeito dos eluídos de extratos de Dular, na concentração 1:1, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> , em diferentes tempos de incubação.....	52
QUADRO 16 - Efeito dos eluídos de extratos de Dular, na concentração 1:1, sobre a germinação de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> , em diferentes tempos de incubação.....	53
QUADRO 17 - Efeito dos eluídos de extratos de Dular, na concentração 1:1, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> , em diferentes tempos de incubação.....	54

## INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O arroz é uma das mais importantes fontes energéticas na alimentação humana. Entretanto, sua produção é bastante limitada por uma série de fatores, entre os quais se pode destacar os de caráter fitopatológico e, dentre estes, a doença conhecida por "brusone", causada pelo fungo Pyricularia oryzae Cav., que traz enormes prejuízos à produção do cereal.

A "brusone" tem sido considerada como um dos fatores limitantes na cultura do arroz em todo o mundo, mas é nas regiões tropicais que se tem registrado os seus maiores danos (4, 8, 16 e 17).

No Brasil, país tropical por excelência, o arroz ocupa um lugar de destaque entre as principais culturas, sendo também, uma fonte de carboidratos na dieta de grande parte da população. Entre nós, a maior parte da produção é obtida através de culturas de sequeiro (cultura não irrigada, em terras altas), nas quais a "brusone" é uma das principais limitações

(6). Embora esta doença seja considerada de menor importância nas culturas irrigadas de outros estados, no Rio Grande do Sul, com clima tipicamente temperado, tem sido responsável por grandes prejuízos neste sistema de cultivo (10, 14, 26 e 28).

A literatura sobre a patologia do arroz mostra que a maioria dos trabalhos nesta área se refere à doença "brusone", fato este que não demonstra apenas a sua importância, como também evidencia as dificuldades que têm sido encontradas para descobrir e desenvolver um controle econômico e eficiente. Na literatura brasileira, nota-se que houve um grande empenho dos fitopatologistas em conhecer a variabilidade do P. oryzae para que se pudesse selecionar variedades que apresentassem resistência vertical ou horizontal, e também na seleção de fungicidas, buscando um controle eficiente do patógeno (1, 11, 24 e 25).

Embora sejam muitos os trabalhos existentes sobre a "brusone", ainda são poucos os resultados conclusivos existentes que podem orientar a solução do problema. O principal obstáculo é a grande variabilidade do patógeno (1, 24 e 25), que tem levado os técnicos a abandonarem a seleção de variedades com resistência vertical e procurarem aquelas com resistência horizontal, a exemplo do que já vem sendo feito em outros países (13, 15, 16, 35 e 38).

Devido às dificuldades em desenvolver os métodos clássicos de controle de doenças para o caso da "brusone", muitos autores, principalmente os japoneses, passaram a estudar

intensamente os mecanismos de resistência àquela doença, com a finalidade de buscar novos e mais eficientes métodos de controle (16, 32 e 33).

Os primeiros trabalhos relacionaram a resistência a P.oryzae com a resistência à penetração, devida à deposição de sílica na epiderme das folhas de arroz. Inclusive, tal pensamento foi considerado válido por muito tempo e inúmeros trabalhos de seleção de variedades e de adubação foram executados com base no mesmo. Mas, em trabalhos mais recentes de Yoshida et al., citados por OU (16), ficou comprovado que em algumas variedades não ocorria essa relação, evidenciando que os mecanismos de resistência a P.oryzae eram muito mais do que uma simples barreira à penetração do fungo.

Trabalhos posteriores realizados por Otani, Tokunaga e outros, também citados por OU (16), determinaram a existência de uma relação entre a suscetibilidade a P.oryzae e os teores de nitrogênio solúvel e total. Outros estudos, ainda, relacionaram a variação desses teores de nitrogênio, que determinam suscetibilidade, com a ocorrência de temperaturas baixas durante o período vegetativo das plantas de arroz. No relatório de 1967 do International Rice Research Institute (19), a suscetibilidade a P.oryzae também foi correlacionada com os teores de açúcares redutores e aminoácidos.

Posteriormente, a resistência a P.oryzae foi associada à ação tóxica de compostos já existentes na planta ou formados durante o ciclo de relações patógeno/hospedeiro, sobre

o fungo. Assim, trabalhos de Kawamura e Ono, citados por OU (16), mostraram que ocorre paralisação no crescimento do fungo no interior das células do arroz e que as hifas morrem por ocasião da reação de hipersensibilidade de plantas resistentes, sugerindo que isso é devido à ação simultânea de compostos químicos e de contração mecânica das células invadidas.

Entre os compostos tóxicos a P.oryzae, SUZUKI (33) cita que já foram detectados em arroz, fenóis, flavanóides e outros, que estão relacionados com a resistência ao referido fungo. Em outras combinações patógeno/hospedeiro, também têm sido encontrados compostos semelhantes, segundo GOODMAN et al. (7) e WOOD(40).

De acordo com Wakimoto e Yoshii, citados por GOODMAN et al. (7), pode haver uma relação entre o grau de resistência a P.oryzae e os níveis de fenóis pré-formados existentes em plantas sadias, de modo análogo ao existente em outras plantas, para outros patógenos. Afirmam também os autores, que os níveis de fenóis nas plantas de arroz diminuem com a aplicação de grandes quantidades de nitrogênio. Essa correlação entre fenóis pré-formados e a resistência a P.oryzae, também foi encontrada por SRIDHAR (30). Em plantas jovens de uma variedade suscetível, o autor encontrou maiores níveis de orthodihidroxifenóis e fenóis totais nos extratos, em etanol a quente, do que nos de uma variedade resistente. Porém, a relação se inverteu nas plantas mais velhas, variando também com o período vegetativo e com a adição de nitrogênio.

REDY et al. (23) constataram que a falta de luminosidade determinou que plantas de arroz estioladas tivessem menores teores de fenóis totais, flavanóides, nitrogênio amino e nitrogênio total, do que plantas desenvolvidas ao sol. Conforme sugerem os autores, tais plantas estioladas foram mais suscetíveis a P. oryzae devido à redução dos níveis de fenóis e flavanóides.

GRIFFITHS (9) verificou menor germinação em esporos de P. oryzae quando em contato com o extrato aquoso de folhas de uma variedade resistente, do que com o de uma variedade suscetível. Quando os esporos foram colocados em contato com os exsudatos de ambas as variedades de arroz, não foram notadas diferenças na germinação. Em testes paralelos, também observou que o fungo P. oryzae penetrou nas folhas das variedades suscetível e resistente, mas o desenvolvimento das lesões ocorreu apenas na suscetível. O autor sugere que tais diferenças foram devidas à presença de polifenóis no extratos das plantas da variedade resistente, mas não realizou nenhum trabalho que comprovasse tal hipótese.

Segundo cita WOOD (40), Oku determinou que os polifenóis ácido clorogênico e catecol, extraídos de plantas de arroz, inibem o crescimento de Cochliobolus miyabeanus (forma perfeita de Helminthosporium oryzae) em cultura. TOMIYAMA (34) também cita que ocorrem grandes aumentos nas concentrações de ácido clorogênico e catecol nos tecidos adjacentes aos atingidos por P. oryzae e Helminthosporium sp..

SRIDHAR (30) verificou que houve aumento na síntese de fenóis com a inoculação de P. oryzae e que esse aumento foi maior na variedade de arroz resistente.

Referindo-se ao metabolismo dos fenóis em várias espécies de plantas, GOODMAN et al. (7) dizem que após a penetração de um patógeno, geralmente ocorre um acúmulo de fenóis, que é mais rápido nas combinações patógeno/hospedeiro incompatíveis. Segundo esses autores, o modelo mais satisfatório para testar tais acumulações, é obtido quando uma mesma variedade é inoculada por duas ou mais raças diferentes de um mesmo patógeno.

De acordo com citações de vários autores (16, 20, 31, 32 e 33), foi comprovado que nas variedades de arroz resistentes a P. oryzae, formam-se lesões pequenas e de coloração marrom, enquanto que nas suscetíveis as lesões são extensas, de coloração gris e quando possuem bordos marrons, estes surgem muito mais tarde. SUZUKI (32 e 33) e OU (16) citam que a formação de um halo de coloração marrom ao redor das lesões de "brusone", coincide com o acúmulo de fenóis que reagem com indicadores de orthodihidroxifenóis.

SRIDHAR et al. (31) dizem que as variedades de arroz resistentes à "brusone" mostram reação de hipersensibilidade, sugerindo que ocorrem mudanças nos compostos presentes nas plantas, após a penetração do P. oryzae, determinando-lhes a característica de suscetibilidade ou resistência. Nesse trabalho os autores comprovaram que o desenvolvimento de lesões nas

folhas de arroz foi inibido quando a coloração marron atingiu o seu máximo, o que ocorreu mais rapidamente nas variedades resistentes. Segundo o relatório de 1972 do International Rice Research Institute (20), a maior rapidez com que se forma a coloração marrom nas diferentes variedades de arroz, esta correlacionada com o grau de resistência das mesmas.

Em plantas de arroz também foram encontrados, além de catecol e ácido clorogênico, vários compostos fenólicos (ácidos salicílico, p-coumárico, ferúlico, o-hidroxibenzóico e vanílico) e flavanóides (tricin, oryzagenin, inetin, homoinetin, homoorizatin, inabin e homoinabin) que estão correlacionados com a resistência a P. oryzae, segundo cita SUZUKI (33).

De acordo com o relatório de 1972 do International Rice Research Institute (20), as quinonas são os compostos mais tóxico a P. oryzae, entre os diversos encontrados na planta de arroz. Vários desses polifenóis e quinonas, particularmente o catecol, ácido clorogênico e  $\beta$ -quinona intensificaram a coloração marron das lesões quando adicionados às mesmas. Esta coloração desapareceu quase que completamente com a adição de ácido ascórbico. WOOD (40) cita que Oku determinou fenômeno relacionado, no qual a adição de ascorbato ou glutatona ao inóculo de C. miyabeanus (H. oryzae), diminuiu a resistência de plantas de arroz ao fungo.

Além de compostos fenólicos, também já foi determinado por UEHARA (36) que no arroz forma-se uma fitoalexina em resposta à ação de P. oryzae, de modo semelhante a outras fito-



alexinas de diversas espécies vegetais (5, 7 e 40). Para detectar a fitoalexina do arroz, UEHARA (36) usou a técnica de difusão em gotas, em folhas destacadas, aplicando uma suspensão de esporos de P. oryzae por meio de um tubo capilar de vidro, com o qual também perfurava as folhas. Depois de uma incubação por 24 horas, na temperatura de 25-28°C., as gotas foram recolhidas, agrupadas e centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos, desprezando-se o sedimento. O sobrenadante foi ensaiado na germinação de esporos de P. oryzae, diminuindo a percentagem de germinação para 2,5%, enquanto nos controles em parafina e água destilada o índice de germinação foi de 75% e 96%, respectivamente. Em outro experimento, relatado no mesmo trabalho, o autor verificou que as variedades de arroz resistentes produziram a fitoalexina mais vigorosamente do que as suscetíveis.

Posteriormente, UEHARA (37) demonstrou que a combinação Arroz x Xanthomonas oryzae também produzia a fitoalexina, e que esta inibia a germinação de P. oryzae. Com isso, o autor determinou que a fitoalexina não era específica, podendo ser também induzida pela ação de uma bactéria.

KIYOSAWA e FUJIMAKI (12) verificaram que a inoculação de uma raça não virulenta de P.oryzae, antes da inoculação de uma raça virulenta, sobre a mesma planta de arroz, inibiu o desenvolvimento de lesões extensas, características da suscetibilidade e observadas quando apenas a raça virulenta foi inoculada. Os autores sugeriram que tal fenômeno de proteção cruzada foi devido à formação de uma fitoalexina, pela ação da

raça não virulenta, que atuou sobre a raça virulenta, inibindo o crescimento das lesões. Entretanto, não foi feito nenhum trabalho procurando confirmar tal hipótese.

Os trabalhos sobre fitoalexinas em arroz, cuja composição química ainda não foi identificada, ficaram restritos às determinações de UEHARA (36 e 37). Segundo SUZUKI (33), existe necessidade de um grande número de estudos precisos sobre as fitoalexinas do arroz e sua natureza química, antes de ser atribuído o interrompimento do crescimento das hifas de P. oryzae, unicamente à sua produção.

Entre os métodos de obtenção de fitoalexinas de plantas, CRUICKSHANK (5) salienta que a difusão em gotas é o melhor para se estudar as bases químicas das reações de células vivas, porque permite que os exsudatos sejam ensaiados de modo direto, enquanto que os extratos químicos obtidos por outros métodos precisam ser primeiramente preparados.

Porém, em outras culturas, notadamente em feijão-eiro, têm sido extraídos de modo eficiente compostos fenólicos e fitoalexinas por meio de etanol 70-95% (3, 18 e 39), seguindo-se as operações de concentração, purificação parcial e evaporação sob pressão reduzida, numa temperatura ao redor de 45°C.

Vários autores também têm usado o sistema de cromatografia de camada fina (CCF) para identificar e separar compostos fenólicos e fitoalexinas (3, 21, 22 e 39). VAN ETTEN e BATEMAN (39) e CARDOSO e GARRAWAY (3) usaram esse sistema para

obter pequenas quantidades de fitoalexinas eluindo os cromatogramas com etanol.

Buscando estudar os mecanismos de resistência do arroz ao fungo P.oryzae foi planejado este trabalho que tem por objetivos pesquisar a presença de compostos fenólicos e fitoalexinas em plantas de arroz sob a ação deste fungo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, em Piracicaba, São Paulo, no período compreendido entre setembro de 1974 e outubro de 1975. Utilizou-se como sistema de ensaio, a combinação patógeno/hospedeiro constituída de Pyricularia oryzae Cav. e Oryza sativa L..

As plantas de arroz foram cultivadas em casa de vegetação, em solo arenoso de várzea, suplementado com adubo solúvel em formulação completa, contendo micronutrientes, na proporção de 3 g de adubo/kg de solo.

Exsudatos e extratos de folhas de arroz, obtidos por difusão em gotas (5 e 36) e extração com etanol 70% (3, 18 e 39), foram usados em bioensaios para verificar seus efeitos na germinação e crescimento dos tubos germinativos de esporos de P.oryzae.

Extratos etanólicos com alta atividade inibitória

foram qualitativamente comparados com os extratos de plantas sadias, por cromatografia de camada fina (CCF). Eluíram-se dos cromatogramas, faixas com valores Rf determinados e os eluídos foram testados separadamente quanto à sua ação inibidora no patógeno.

Materiais e métodos de uso geral, encontram-se relacionados a seguir. Delineamentos e particularidades de cada ensaio serão descritos com os resultados.

#### Escolha dos isolados de *P.oryzae* e variedades de arroz:

Os isolados de *P.oryzae* e as variedades de arroz utilizados nos trabalhos, foram escolhidos através de um trabalho preliminar sobre a variabilidade do fungo, utilizando-se 100 isolados monospóricos obtidos de 20 isolados simples, diferentes, procedentes dos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. Os isolados foram inoculados em duas ocasiões diferentes, sobre as variedades de arroz Raminad str.3, Zenith, NP-125, U-sen, Dular, Kanto 51, CI 8970 (S) e Caloro, pertencentes à Série Internacional de Diferenciais para raças de *P.oryzae* (2) e Fanny, acrescentada à série por ser extremamente suscetível. Todos os trabalhos foram executados de acordo com a metodologia proposta por ATKINS et al.(2), conforme já havia sido usada antes por RIBEIRO (24 e 25) em trabalhos de determinação de raças de *P.oryzae*.

Para difusão em gotas foram escolhidos os isolados monospóricos 63m<sub>1</sub>, 66m<sub>4</sub> e 73m<sub>5</sub> e as variedades de arroz Ze-

nith, CI 8970 (S) e Fanny. Os isolados escolhidos apresentaram reações resistente ou suscetível bem definidas, quando inoculados nas três variedades escolhidas. O isolado 63m<sub>1</sub> caracterizou-se por não ter sido patogênico em nenhuma das ocasiões em que foi inoculado, em todas as variedades testadas, enquanto que o isolado 73m<sub>5</sub> foi altamente patogênico nas três variedades citadas. O isolado 66m<sub>4</sub> foi patogênico à CI 8970 (S) e Fanny, mas não o foi para a variedade Zenith, que teve comportamento resistente. As variedades de arroz Zenith, CI 8970 (S) e Fanny foram também escolhidas para a difusão em gotas devido ao tipo de folhas, grandes e largas, que facilitavam a deposição do material.

Para a extração em etanol escolheu-se os isolados de P.oryzae 65m<sub>1</sub> e 69m<sub>1</sub> e as variedades de arroz NP-125, Usen e Dular. Tais isolados provocaram, constantemente, reações intermediárias, entre resistente e suscetível, nas três variedades citadas, embora em NP-125 e Usen houvesse sempre maior tendência para suscetível. As variedades escolhidas, por sua vez, além de apresentarem reações moderadas aos isolados de P.oryzae, tinham sempre um halo marrom pronunciado ao redor das lesões, podendo por isso serem consideradas como possuidoras de alguma resistência, segundo diversos autores (16, 20, 23, 32 e 33). Provavelmente poderiam conter maiores teores de fenóis, segundo as referências de OU (16), SUZUKI (32 e 33) e SRIDHAR et al.(31).

Nos bioensaios com exsudatos e extratos em eta -

nol, escolheu-se para reagentes os isolados 63m<sub>1</sub> e 73m<sub>5</sub> por terem a patogenicidade totalmente oposta, ou seja, por serem não patogênico e altamente patogênico, respectivamente (7).

#### Cultivo e estocagem dos isolados de *P. oryzae*:

Todos os isolados de *P.oryzae* foram cultivados e estocados em tubos, em meio de cultura batata+dextrose+agar (BDA) + streptomina (100 µg/l.(2), nas condições ambientes de laboratório. Para a conservação dos isolados monospóricos, procederam-se transferências sucessivas em meio BDA, normalmente espaçadas de dois a três meses.

Para a obtenção de esporos de *P.oryzae* destinados às inoculações, difusão em gotas ou bioensaios, os isolados foram transferidos de BDA, para placas de Petri com meio de cultura aveia+dextrose+agar (ADA), nas proporções de 30g:5g:12g/l. mais streptomina (100 µg/l.), no qual pode-se obter abundante esporulação do fungo (16). As culturas em meio ADA foram incubadas por cinco dias no escuro e a 28°C, para favorecer o crescimento micelial. Após, foram retiradas do incubador e conservadas em condições de laboratório, sob luz fluorescente (lâmpada normal da sala, mantida acesa por 10 horas diárias) até o 12º dia, após a transferência, quando normalmente a esporulação já tinha atingido um nível satisfatório.

Preparo das suspensões de esporos de P.oryzae:

Para as inoculações, difusões em gotas e bioensaios, as suspensões de esporos foram preparadas a partir de colônias de P.oryzae desenvolvidas em meio ADA por 12 dias, utilizando água destilada esterilizada. Colocou-se pequenas quantidades de água destilada dentro das placas e por meio de agitação e raspagem leve das colônias de P.oryzae, com o auxílio de uma alça de 5 mm de diâmetro, foi obtida uma suspensão de esporos, imediatamente filtrada em dupla camada de gaze estéril para eliminar o micélio. Após, determinou-se o número de esporos por campo microscópico de 125X, em uma preparação microscópica feita com uma gota da suspensão, colocada sobre a lâmina com a alça de 5 mm., citada antes. Conforme o número de esporos encontrados, numa média de 10 campos, a concentração foi ajustada para o número desejado, por meio de diluições ou pelo uso de maior número de colônias. Na maior parte dos estudos utilizou-se a concentração final de 25 esporos por campo óptico de 125X (objetiva 10X e ocular 12,5).

Quando as suspensões destinavam-se às inoculações em casa de vegetação, foi adicionado sempre o dispersante Tween 20 (Polioxietileno sorbitol monolaurato) a 0,002%, enquanto que para a difusão em gotas, o mesmo não foi adicionado.

As suspensões de esporos de P.oryzae destinadas aos bioensaios foram preparadas, inicialmente, de modo semelhante às usadas para inoculações e difusão em gotas, mas com uma alta concentração de esporos (80-100 esporos/125X) e não



sendo adicionado o Tween. Após, as mesmas foram centrifugadas três vezes na rotação de 3020g por cinco minutos, eliminando-se em cada vez os 2/3 superiores da suspensão centrifugada, repostos novamente com água destilada esterilizada. Com este procedimento procurou-se lavar os esporos, diminuindo a influência de nutrientes carregados do meio de cultura ou inibidores, presentes nas superfícies dos mesmos. Finalmente, o terço inferior do volume centrifugado na terceira operação foi diluído para uma concentração dupla (50 esporos) da final e então a suspensão foi usada imediatamente nos bioensaios, sendo sempre utilizada no mesmo dia do preparo.

#### Obtenção de exsudatos por difusão em gotas:

Para a obtenção de exsudatos usou-se o método de difusão em gotas descrito por UEHARA (36) e citado por SUZUKI (33), com algumas modificações. O autor usou pequenas secções (3 cm) de folhas de arroz, perfurou a lâmina foliar nos pontos onde colocou as gotas e preparou os exsudatos por centrifugação, tomando o sobrenadante para os bioensaios. Neste trabalho houve mudança no método citado, usando-se inicialmente secções de folhas e bainhas de folhas com 25 cm de comprimento. Posteriormente passou-se a usar somente as secções de folhas nas quais não foram provocados ferimentos para deposição das gotas e os exsudatos foram esterelizados por meio de filtro bacteriológico.

Utilizou-se a quinta e sexta folhas de plantas de

arroz mantidas em vasos (18cm- $\phi$  x 21cm-h), inundadas durante todo o período após o desenvolvimento da segunda folha. Em cada vaso existiam dez plantas, num total de 4 vasos de cada variedade {Zenith, CI 8970(S) e Fanny}. As folhas foram divididas em secções de 25 cm, duas secções por folha, eliminando-se as extremidades das mesmas. Essas secções foram fixadas numa lâmina de vidro por meio de atilhos de borracha e colocadas dentro de uma bandeja plástica (20cm x 30cm x 8cm-h), sobre uma camada de algodão hidrófilo umedecido com água destilada esterilizada. Para manter a turgência foi colocada uma camada de algodão umedecido cobrindo as extremidades inferiores das folhas. As suspensões de esporos de P.oryzae (isolados monospóricos 63m<sub>1</sub>, 66m<sub>4</sub> e 73m<sub>5</sub>) foram colocadas sobre a superfície normal das folhas, em gotas localizadas em linha, no centro da lâmina foliar e espaçadas, entre si, de 1 cm. Em cada bandeja foram colocadas 25 secções de folhas de uma mesma variedade de arroz, com gotas de um único isolado, tendo as repetições sido feitas em ocasiões diferentes.

Os controles foram feitos de modo idêntico aos tratamentos com P.oryzae, somente que no lugar da suspensão de esporos foram colocadas gotas de água destilada esterilizada. Como segundos controles, substituiu-se as secções de folhas de arroz por lâminas de microscópio, sobre as quais foram colocadas as gotas de suspensão de esporos de P.oryzae e de água destilada esterilizada.

As bandejas com as gotas já colocadas sobre as

folhas, foram cobertas, com um plástico, para formar câmara úmida e incubadas por 24 horas. Com os controles em vidro, procedeu-se de maneira igual. Após a incubação, todas as gotas de cada bandeja foram coletadas por sucção e esterilizadas em filtro bacteriológico com membrana de nitrato de celulose, com  $3 \mu$  de porosidade média. Os exsudatos filtrados foram guardados em congelador.

#### Extração em etanol 70%:

Para a extração em etanol 70%, utilizou-se plantas de arroz cultivadas em bandeja de alumínio e inoculadas no estágio de 3 folhas, segundo o método de ATKINS et al.(2). Em cada bandeja havia 20 plantas de cada variedade (NP-125, Usen e Dular), totalizando 60 plantas de cada uma, em três bandejas.

As terceiras folhas de cada planta, com sintomas, foram coletadas seis dias após a inoculação. Para controle foram coletadas na primeira extração (plantas inoculadas com o isolado 69m<sub>1</sub>) as quartas folhas, sem sintomas, das mesmas plantas. Na segunda extração (isolado 65m<sub>1</sub>) foi cultivada uma segunda série de plantas com folhas na mesma idade das inoculadas com P.oryzae, que foram pulverizadas apenas com água, das quais foram coletadas as terceiras folhas para servirem de controle para folhas sadias.

A extração em etanol 70%, a frio, baseou-se no método descrito por CARDOSO e GARRAWAY (3), diferente do usado

em arroz por SRIDHAR (30) e REDY et al.(23) que usaram extração a quente.

Antes de cada extração, as folhas coletadas foram contadas, sendo determinado o seu peso fresco. Na extração, as folhas de arroz foram picadas e colocadas no interior de um homogeneizador de alta rotação, com 50 ml de etanol 70% (10 ml para cada grama de folhas), ligando-se o aparelho numa rotação determinada durante dois minutos. O extrato obtido nesses primeiros 50 ml foi filtrado a vácuo em papel de filtro Selecta nº 595, previamente seco e tarado, tendo a parte sólida sido extraída novamente em outros 50 ml de etanol 70%, que foram filtrados da mesma maneira que os primeiros. Os 100 ml de extrato bruto foram guardados em congelador. Posteriormente esses 100 ml de extratos foram secos totalmente em evaporador rápido rotativo, sob pressão reduzida e na temperatura de 45°C (39). O resíduo foi diluído em 5 ml de etanol 95% e guardado em congelador. O material sólido resultante da extração foi seco em estufa a 90-100°C, até peso constante, para determinação do peso seco.

Nos bioensaios foram tomadas alíquotas de 1 ml , de cada extrato concentrado e colocadas em tubos esterilizados, nos quais o etanol 95% foi evaporado sob vácuo e na temperatura de 45°C. Os resíduos foram suspensos em igual volume (1ml) de água destilada esterilizada.

Para controle da ação do etanol puro sobre P.oryzae foram realizadas as mesmas operações feitas com os extratos

concentrados em alíquotas de 1 ml de etanol 95%, com diluição do resíduo em água destilada esterilizada.

### Bioensaios com esporos de P.oryzae:

Diversos bioensaios com esporos de P.oryzae (isolados 63m<sub>1</sub> e 73m<sub>5</sub>) foram realizados para determinar a ação dos exsudatos, extratos e eluídos obtidos sobre a germinação e crescimento dos tubos germinativos de esporos do patógeno. Maiores detalhes sobre delineamentos e particularidades serão fornecidos junto com os resultados dos mesmos.

Para fazer os bioensaios utilizou-se placas de Petri com duas folhas de papel-toalha dentro. Sobre estas foi colocado um suporte de vidro para apoiar uma lâmina de microscópio, na qual foram colocadas as gotas da mistura de suspensão de esporos de P.oryzae com os exsudatos ou extratos. Todo o conjunto formado pela placa de Petri, papel-toalha, suporte de vidro e lâmina de microscópio foram previamente esterilizados a seco, na temperatura de 150°C, por 3 horas.

Pouco tempo antes da execução dos bioensaios o papel-toalha das placas foi umedecido com 5 ml de água destilada esterilizada.

A suspensão de esporos de P.oryzae com concentração dupla, preparada de acordo com a metodologia descrita antes, foi misturada com quantidades igual dos extratos ou exsudatos em teste, já diluídos para a concentração dupla da dese -

jada, obtendo-se no final uma concentração simples de ambos. Procedeu-se depois a homogeneização da mistura por agitação manual, sendo as gotas colocadas sobre a lâmina de microscópio no interior da placa de Petri, com o auxílio de uma pipeta esterilizada. Nesse momento as placas já estavam com alta umidade, formando câmaras úmidas que evitavam a evaporação das gotas. As placas com as gotas foram depois colocadas no interior de outra câmara úmida, preparada em uma bandeja plástica coberta por um plástico, ficando em incubação na temperatura ambiente.

Depois do período determinado de incubação, o crescimento do fungo P.oryzae, colocado nas gotas, foi interrompido mediante a adição de uma pequena gota de lactofenol com azul de algodão em cada gota do bioensaio, obedecendo-se a mesma sequência cronológica seguida na instalação do ensaio. Sobre cada gota foi colocada uma lamínula e feita a lutagem com esmalte.

A percentagem de germinação de P.oryzae foi avaliada pela contagem ao acaso, nos primeiros 100 esporos. A estimativa do comprimento do tubo germinativo foi feita pela medida, com o auxílio de um micrômetro ocular, nos primeiros 25 esporos com tubos germinativos mais retos e sem ramificações.

Para a análise estatística as percentagens de germinação dos esporos de P.oryzae foram previamente transformadas em  $\text{arc. sen } \sqrt{\frac{V}{100}}$ , enquanto que o comprimento do tubo germinativo foi analisado diretamente, em micras. Para comparação das médias de todos os tratamentos, usou-se o Teste de Tu-

key, ao nível de 5% de significância.

Cromatografia de camada fina (CCF):

A cromatografia de camada fina foi realizada de acordo com o método descrito por VAN ETTEN e BATEMAN (39), utilizando-se suportes de sílica gel G e GF 254 e o sistema de solvente n-pentano + éter etílico + ácido acético (75:25:1). Para detectar os compostos cromatografados, foi usado o método de observar os cromatogramas sob luz ultravioleta de onda curta e, após, pela reação com cloreto férrico (1%) + ferrocianeto de potássio (1%) (1:1 - v/v), específica para fenóis (3, 21 e 22).

O extrato em etanol de folhas doentes da variedade de arroz que apresentou maior capacidade de inibição, em P. oryzae, foi comparado por CCF com o de folhas sadias da mesma variedade, buscando-se detectar diferenças entre elas e um possível identificação de fenóis (7, 16, 20, 31, 32 e 33). Foram realizados cromatogramas com 50 e 100  $\mu$ l de cada extrato e depois com 100 e 200  $\mu$ l, aplicados na origem com uma micro seringa de 50  $\mu$ l.

Para purificar e separar pequenas quantidades dos componentes dos extratos cromatografados antes, usou-se também CCF, conforme o método descrito por VAN ETTEN e BATEMAN (39) e CARDOSO e GARRAWAY (3). Foram feitos dois cromatogramas, um de extrato de folhas doentes e o outro de sadias, nos quais foram aplicados 1 ml de cada extrato distribuído em 20 pontos na li-

nha de origem. Ambos os cromatogramas foram desenvolvidos de modo simultâneo, na mesma cuba. Depois foram eluídas cinco faixas transversais com 5 cm de largura, desde a origem ( $R_f=0,0$ ) até a frente ( $R_f=1,0$ ), acrescidas da faixa abaixo da linha de origem que foi eluída para comparação.

Os eluídos foram separados pelo método tradicional (3), raspando-se as faixas delimitadas e recolhendo-se a sílica em 5 ml de etanol 95%. O material foi agitado para eluir os componentes do extrato e a seguir a sílica foi separada por centrifugação na rotação de 3020g, por 10 minutos. A fase líquida foi separada da sílica e colocada em tubos esterelizados nos quais o etanol dos eluídos foi evaporado sob vácuo na temperatura de 45°C. Os resíduos foram diluídos em água destilada estéril e guardados em congelador.

Finalmente, após se detectar, por meio de bioensaios, que um dos eluídos tinha grande capacidade de inibição, estudou-se o mesmo por CCF, em suporte de sílica gel GF 254, buscando evidenciar melhor uma possível diferença de absorção ou fluorescência dos componentes do mesmo, não detectada pela CCF em suporte de sílica gel G, realizada antes.



## RESULTADOS

Efeitos fungistáticos de exsudatos obtidos por difusão em gotas:

A presença de substâncias fungitóxicas em exsudatos de folhas e bainhas de arroz, foi determinada em três experimentos, utilizando-se o método de difusão em gotas.

Experimento 1 - Efeito de exsudatos de folhas e bainhas de arroz sobre P.oryzae:

Os exsudatos usados neste experimento foram obtidos por difusão em gotas, aplicadas sobre folhas e bainhas de variedade Zenith, de suspensão de esporos do isolado 66m<sub>4</sub>, não patogênico a esta variedade, e de água destilada esterilizada, com os respectivos controles em vidro.

A ação destes exsudatos sobre a germinação e o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, não patogênico, foi verificada num tempo de 6 horas de incubação.

O delineamento do experimento foi totalmente ao

acaso, com quatro repetições.

Nos diferentes exsudatos (QUADRO 1) observou-se uma diferença significativa na germinação, bem como no crescimento do tubo germinativo. Pelo teste de Tukey, ao nível de 5%, o efeito do exsudato obtido de folhas de arroz inoculadas com o isolado 66m<sub>4</sub> diferiu, significativamente, do controle em que se usou apenas água destilada sobre as folhas de arroz, na germinação e no alongamento do tubo germinativo do isolado 63m<sub>1</sub>.

QUADRO 1 - Efeito de exsudatos de folhas e bainhas de arroz da variedade Zenith sobre a germinação e o crescimento do tubo germinativo do isolado 63m<sub>1</sub> de P.oryzae

Exsudatos		Efeito dos exsudatos sobre <u>P.oryzae</u> <u>a/</u>	
Substrato	Inóculo	Germinação dos esporos <u>b/</u>	Comprimento do tubo germinativo <u>c/</u>
Folhas de arroz	66m <sub>4</sub>	46,75	18,5
Folhas de arroz	H <sub>2</sub> O	71,02	61,2
Bainhas de arroz	66m <sub>4</sub>	62,62	39,5
Bainhas de arroz	H <sub>2</sub> O	63,24	34,5
Vidro	66m <sub>4</sub>	61,32	37,0
Vidro	H <sub>2</sub> O	51,44	26,0
Média		59,40	36,12
Coeficiente de variação		10,25%	15,70%
DMS (Tukey) 5%		13,70	12,76

a/ = média de quatro repetições.

b/ = porcentagem de germinação de esporos transformada em arc.  
 $\text{sen } V \sqrt{\frac{\%}{100}}$

c/ = comprimento do tubo germinativo, em micras.

Como o efeito do exsudato obtido de folhas da variedade Zenith inoculada com o isolado 66m<sub>4</sub> não mostrou diferença significativa do controle de água destilada sobre vidro, embora diferente dos demais tratamentos, concluiu-se que o efeito maior tenha sido causado por nutrientes exsudados na gota de água, quando esta foi aplicada sobre a folha de arroz.

Experimento 2 - Efeito nutricional de exsudatos, em água destilada, de folhas de arroz da variedade Zenith sobre a germinação e alongamento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>:

Esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, após uma lavagem, foram diluídos para se obter uma concentração tal, que depois de combinados com igual volume do exsudato a ser testado em diferentes concentrações, desse uma contagem final de 25, 50 e 100 esporos por campo microscópico de 125X (objetiva 10X e ocular 12,5X).

Os exsudatos de folhas de arroz da variedade Zenith obtidos por difusão em água destilada foram, por sua vez, diluídos de tal modo, que após a combinação com a suspensão de esporos se obtivesse as seguintes diluições: 1:1, 1:3, 1:7 e 1:15.

Como controle usou-se apenas água destilada estéril.

Semelhantemente, foram conduzidos dois ensaios que diferiram entre si, apenas com relação ao tempo de leitura. Um dos ensaios foi avaliado após 6 horas de incubação e o ou-

tro, após 20 horas. Ambos os ensaios foram delineados como fatoriais 5x3, completamente causalizados e com duas repetições.

Os resultados da germinação de esporos após 6 e 20 horas de incubação (QUADRO 2) e o efeito dos mesmos exsudatos sobre o crescimento do tubo germinativo, nos mesmos tempos (QUADRO 3) foram analisados estatisticamente, em separado, para germinação e alongamento do tubo germinativo em cada um dos períodos.

Pelo teste de Tukey (5%), apenas o exsudato diluído a 1:15 mostrou uma diferença significativa dos demais tratamentos, após 6 horas de incubação. Depois de 20 horas não se observaram diferenças significativas para esses tratamentos. Com referência à concentração de esporos, não se observou efeito significativo da mesma sobre a germinação, em nenhum dos tempos de incubação.

O efeito nutricional dos exsudatos de folhas de arroz, obtidos em água, tornou-se evidente quando se considerou o alongamento do tubo germinativo após 20 horas. Com a diluição do mesmo, se obteve um efeito de crescimento menor do pro-micélio. Houve diferenças altamente significativas nesse tempo de incubação, pelo teste de Tukey (5%), quando o exsudato foi diluído nas proporções de 1:1, 1:3 e 1:7. As diluições diferiram entre si, do controle e da diluição 1:15. Os dois últimos tratamentos mostraram-se equivalentes. As mesmas tendências de alongação do tubo germinativo foram observadas após 6 horas de incubação, embora de maneira menos evidente.

QUADRO 2 - Efeito das diluições do exsudato de folhas de arroz em água destilada sobre a germinação de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em diferentes concentrações, após 6 e 12 horas de incubação.

Diluições do Exsudato de folhas de arroz.	Germinação de esporos em diferentes tempos de incubação a/							
	6 horas			12 horas				
	25	50	100	diluições	25	50	100	diluições
1:1	61,01	58,40	62,41	60,60	67,39	69,33	69,75	68,82
1:3	59,68	59,35	60,04	59,69	70,22	69,75	70,28	70,08
1:7	56,80	58,05	62,39	59,08	69,38	70,21	65,32	68,30
1:15	61,01	64,53	64,90	63,48	67,26	70,21	70,18	69,21
Água destilada	60,01	61,69	56,48	59,39	62,95	65,32	65,29	64,52
Média de concentrações	59,70	60,40	61,24	60,45	67,44	68,96	68,16	68,19

Coefficiente de variação ..... = 2,54% ..... = 4,08%

DMS (Tukey) 5% - Diluições dentro das concentrações ..... = 4,75  
 - Diluições ..... = 2,74  
 - Concentrações dentro das diluições ..... = 3,99  
 - Concentrações ..... = 1,78

a/ = Média de duas repetições da % de germinação transformada em arc.senV%I00  
 b/ = Concentração final de esporos por campo ótico de 125X (Objetiva 10X e ocular 12,5X).

QUADRO 3 - Efeito das diluições do exsudato de folhas de arroz em água destilada sobre o alongamento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em diferentes concentrações, após 6 e 12 horas de incubação.

Diluições do Exsudato de folhas de arroz.	Comprimento do tubo germinativo em diferentes tempos de incubação a/			12 horas			
	25	50	100	25	50	100	
1:1	121,5	71,0	96,0	96,17	325,0	397,0	363,16
1:3	93,0	83,5	82,0	86,17	296,0	345,5	328,50
1:7	91,0	90,5	86,0	89,17	164,0	123,5	164,50
1:15	70,0	61,0	67,0	66,00	128,5	116,5	119,66
Água destilada	59,0	48,5	62,0	56,50	101,5	109,5	107,00
Média de concentrações	86,9	70,9	78,6	78,80	203,0	218,4	216,50

Coefficiente de variação DMS(Tukey)5%	.....	=	5,11%	.....	=	8,75%
- Diluições dentro das concentrações	.....	=	12,45	.....	=	58,60
- Diluições dentro das diluições	.....	=	7,19	.....	=	33,83
- Concentrações dentro das diluições	.....	=	10,46	.....	=	49,21
- Concentrações dentro das concentrações	.....	=	4,67	.....	=	22,00

a/ = Média de duas repetições do comprimento do tubo germinativo, em micras.  
 b/ = Concentração final do esporos por campo microscópico de 125 X (Ocular 10X e objetiva 12,5X).

Não se encontrou evidências de que a concentração de esporos apresentasse efeito significativo sobre o crescimento do tubo germinativo.

Esses resultados permitiram concluir que nos exsudatos obtidos pelo método de difusão em gotas existem substâncias nutricionais que podem ser utilizadas pelo organismo teste, mascarando o efeito de substâncias tóxicas presentes nesses exsudatos.

Experimento 3 - Efeito dos exsudatos de folhas de três variedades de arroz inoculadas com três isolados diferentes de *P.oryzae*:

Como substrato foram usadas folhas de arroz das variedades Zenith, CI 8970 (S) e Fanny, sobre os quais foram aplicadas gotas de suspensões de esporos dos isolados 63m<sub>1</sub>, 66m<sub>4</sub> e 73m<sub>5</sub> de *P.oryzae* e como controle, gotas de água destilada esterilizada. Para controle do substrato foi usado um tratamento sobre vidros com gotas de todos os isolados e de água destilada. Neste experimento foram usadas as três últimas folhas abaixo da panícula.

O efeito desses exsudatos foi estudado na germinação e alongamento do tubo germinativo do isolado 63m<sub>1</sub>, em um experimento fatorial 4 x 4, com duas repetições.

Não se observou nenhum efeito significativo desses exsudatos, mostrando desse modo, que o método de difusão em gotas para o presente caso não era o melhor sistema para detecção de fitoalexinas.

Efeitos fungistáticos de extratos obtidos por extração em etanol:

Paralelamente à obtenção de exsudatos por difusão em gotas, foram obtidos extratos em etanol 70% a partir de variedades de arroz (NP-125, Usen e Dular) que apresentavam lesões com bordos marrons evidentes. O efeito de tais extratos brutos foi ensaiado sobre a germinação e o alongamento do tubo germinativo de esporos de P.oryzae, em um experimento preliminar, dois de diluições e dois de tempos de incubação.

Experimento 4 - Estudos preliminares dos efeitos dos extratos de folhas de arroz sobre dois isolados de P.oryzae:

Os extratos de folhas inoculadas e sadias, obtidos na primeira extração, foram experimentados preliminarmente sobre a germinação e o crescimento do tubo germinativo dos isolados 63m<sub>1</sub> e 73m<sub>5</sub>, nos tempos de 6 e 12 horas de incubação. Foram usadas diluições dos extratos de 1:1 e a concentração de esporos foi ajustada para que tivesse 25 propágulos por campo ótico de 125X no final, após a combinação de iguais volumes de ambos.

Foram realizados dois ensaios semelhantes, diferentes apenas no isolado teste. Cada ensaio foi avaliado nos tempos de 6 e 12 horas, sendo um com o isolado 63m<sub>1</sub>, não patogênico, e o outro com o isolado 73m<sub>5</sub>, altamente patogênico. Os dois ensaios foram delineados como fatoriais 6 x 2, completa -



mente ao acaso e com oito repetições, tendo sido analisados separadamente para cada isolado.

Apenas para verificar a viabilidade dos esporos do fungo se fez um controle paralelo em água destilada, em cada ensaio.

Os resultados obtidos nestes ensaios mostraram baixa germinação e pequeno alongamento do tubo germinativo dos esporos de P.oryzae, notadamente do isolado 63m<sub>1</sub>. Como tal fato não ocorreu nos controles em água destilada esterilizada, pode-se concluir que o mesmo era devido ao efeito residual do etanol, evaporado e diluído em água destilada estéril, no dia anterior.

Os dados de germinação e alongamento do tubo germinativo de esporos não permitiram observar nenhum efeito dos extratos sobre o isolado 63m<sub>1</sub>. Entretanto os resultados obtidos no ensaio realizado com o isolado 73m<sub>5</sub> deram uma idéia de que o extrato de Dular inoculado com P.oryzae produzia inibição da germinação, em 6 horas, e do crescimento do tubo germinativo. Na germinação no período de 12 horas não se notou tal efeito.

#### Estudo dos efeitos dos extratos diluídos em diversas concentrações, sobre P.oryzae:

Após a realização dos estudos preliminares, foi ensaiado o efeito dos extratos diluídos em diversas proporções sobre a germinação e o alongamento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em dois experimentos com concentrações di-

ferentes.

Experimento 5 - Estudo preliminar dos efeitos dos extratos diluídos sobre o isolado 63m<sub>1</sub> de P.oryzae:

Os extratos de folhas de arroz, obtidos na primeira extração foram diluídos de maneira que após serem misturados com igual volume da suspensão de esporos, ficassem nas proporções finais de 1:1, 1:3 e 1:7, em relação aos extratos concentrados. A suspensão de esporos do isolado 63m<sub>1</sub> também foi preparada de modo a ficar com 25 esporos por campo ótico de 125X (Objetiva 10X e ocular 12,5X), no final.

Como controle foi utilizado um extrato em branco de etanol, obtido segundo os mesmos métodos que se usou na obtenção dos extratos. Um segundo controle incluído, foi o de água destilada esterilizada, em que se utilizou os mesmos volumes usados para diluir os extratos.

Foram realizados dois ensaios semelhantes que diferiram entre si apenas no tempo de incubação, que foi de 6 e 12 horas, respectivamente. Esses ensaios foram instalados no delineamento de fatoriais 8 x 3, completamente ao acaso e com três repetições.

Os resultados deste experimento mostraram que houve diferenças significativas entre os extratos diluídos na proporção 1:1 e nas demais, exceto na germinação em 6 horas de incubação, quando as diluições foram diferentes entre si.

O extrato de folhas doentes da variedade Dular 1-

níbiu significativamente o desenvolvimento dos tubos germinativos, mesmo nas concentrações mais baixas. O efeito deste mesmo extrato de Dular mostrou uma redução significativa na germinação dos esporos, apenas nas primeiras 6 horas de incubação.

Apenas se observou efeito residual do etanol do quando se usou a diluição 1:1 e o período de incubação foi de 6 horas, não tendo sido notado nas 12 horas de incubação.

Experimento 6 - Efeito dos extratos diluídos sobre o isolado 63m<sub>1</sub> de P.oryzae:

Como no experimento anterior apenas a diluição 1:1 diferiu das demais, resolveu-se fazer um segundo experimento com os mesmos extratos, usando-se diluições menores. Desta vez os extratos de folhas de arroz foram diluídos de modo a ficarem nas seguintes proporções: concentrado, 1:1, 1:2 e 1:3, após serem misturados com igual volume de suspensão de esporos de P.oryzae, que no final ficou com 25 conídios por campo ótico de 125 X (Objetiva de 10X e ocular de 12,5X). Usou-se um controle em branco de etanol processado da mesma maneira que os extratos, e outro de água destilada esterilizada.

O experimento constou de dois ensaios, diferentes apenas nos tempos de incubação (6 ou 12 horas), instalados num esquema totalmente ao acaso, delineados como fatoriais 8 x 4 , com três repetições.

Os dados das avaliações da germinação (QUADRO 4 ) e do alongamento do tubo germinativo (QUADRO 5); de cada período

QUADRO 4- Efeito de diluições dos extratos de folhas de arroz, inoculadas e sadias, sobre a germinação de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em diferentes tempos de incubação.

Extratos de folhas de arroz	Germinação de esporos de <u>P.oryzae</u> em diferentes tempos a/														
	6 horas						12 horas								
	Variedade	Tratamento	Diluições dos extratosb/	Média de Diluições dos extratosb/	Média de	1	1:1	1:2	1:3	extratos	1	1:1	1:2	1:3	extratos
NP-125	Inoculadas	47,87	63,93	64,41	65,92	60,53	70,80	63,30	73,93	73,65	70,42				
NP-125	Sadias	58,81	65,99	64,90	69,21	64,72	74,53	81,53	75,95	75,95	76,99				
Usen	Inoculadas	57,68	62,80	66,26	69,19	63,98	70,34	61,57	74,01	78,52	71,11				
Usen	Sadias	60,03	59,19	70,17	66,96	64,09	66,66	71,62	79,65	80,11	74,51				
Dular	Inoculadas	41,94	51,97	50,19	65,41	52,37	53,93	59,58	68,06	75,95	64,38				
Dular	Sadias	63,21	70,67	68,03	72,88	68,70	77,16	76,12	82,05	81,53	79,21				
Etanol	-	54,13	60,06	58,74	65,98	59,73	62,30	63,46	70,04	77,12	68,23				
Água destilada		59,34	58,52	57,86	62,56	59,57	62,81	61,44	63,46	63,46	62,79				
Média de diluições		55,37	61,64	62,57	67,26	61,71	67,31	67,32	73,39	75,78	70,95				

Coefficiente de variação ..... = 3,66%  
DMS(Tukey)5% - Extratos dentro das diluições= 5,79 ..... = 3,59%  
- Extratos ..... = 2,89 ..... = 6,51  
- Diluições dentro dos extratos= 4,88 ..... = 3,25  
- Diluições ..... = 1,72 ..... = 5,49  
a/=Média de três repetições da percentagem de germinação transformada em arc.senV%  
b/=Proporção final, obtida após combinar iguais volumes de extratos de uma suspensão de esporos de P.oryzae.  
..... = 1,94

a/=Média de três repetições da percentagem de germinação transformada em arc.senV%  
b/=Proporção final, obtida após combinar iguais volumes de extratos de uma suspensão de esporos de P.oryzae.

QUADRO 5 - Efeito de diluições dos extratos de folhas de arroz, inoculadas e sadias, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m<sub>1</sub> de P.oryzae, em diferentes tempos de incubação.

Extratos de fo- Ihas de arroz	Comprimento do tubo germinativo em diferentes tempos de incubação a/			12 horas							
	6 horas			12 horas							
Varie- dade	Tratamen- to	Diluições dos extratos	b/ Média de extratos	Diluições dos extratos	b/ Média de extratos	Diluições dos extratos	b/ Média de extratos				
	1	1:1	1:2	1:3	1	1:1	1:2	1:3			
NP-125	Inoculadas	42,20	50,70	50,83	64,66	52,10	92,86	101,76	96,30	124,10	103,75
NP-125	Sadias	48,13	55,26	64,26	72,50	60,04	103,80	119,96	112,03	133,43	117,30
Usen	Inoculadas	36,36	54,13	56,56	70,20	54,31	64,63	84,70	108,50	122,00	94,95
Usen	Sadias	43,86	56,03	63,73	71,16	58,70	74,23	100,16	112,10	129,16	103,91
Dular	Inoculadas	17,13	44,93	50,30	66,70	44,76	31,23	85,83	104,33	105,90	81,82
Dular	Sadias	41,00	60,33	60,26	74,33	58,98	101,30	102,20	116,46	120,00	110,00
Etanol	-	64,80	73,13	65,75	81,03	71,18	105,40	127,93	108,96	101,30	110,90
H <sub>2</sub> O	-	67,56	72,16	63,26	76,63	69,91	102,86	126,16	103,00	107,63	109,91
Média de dilui- ções		45,13	58,33	59,37	72,15	58,75	84,54	106,09	107,71	117,94	104,07

Coefficiente de variação ..... = 6,82%  
DMS(Tukey)5%-Extratos dentro das diluições= 10,25  
-Extratos..... = 5,12  
-Diluições dentro dos extratos= 8,64  
-Diluições ..... = 3,05  
a/=Média de três repetições do comprimento do tubo germinativo, em micras.  
b/=Proporção final, obtida após combinar iguais volumes dos extratos e de uma suspensão de esporos de P.oryzae.

do de incubação, foram analisados estatisticamente, em separado, para cada período.

Os resultados destes ensaios mostraram que os extratos obtidos de folhas com lesões, da variedade Dular, eram significativamente eficientes em todas as concentrações usadas para inibir a germinação e o alongamento do pró-micélio do isolado de P.oryzae usado no teste, quando comparado ao extrato de folhas sadias da mesma variedade e também aos controles de etanol e água destilada esterilizada, em ambos os períodos de incubação.

As diluições dos extratos de folhas sadias da variedade Dular apresentaram um significativo aumento de germinação e de alongamento do tubo germinativo, inversamente proporcional às mesmas.

Os extratos de folhas inoculadas das variedades Usen e NP-125 mostraram uma atividade inibitória apenas quando se usou o extrato concentrado.

Estes resultados mostraram que folhas da variedade Dular, inoculadas, são mais eficientes em produzir substâncias fungitóxicas que as demais variedades. Sugerem, ainda, os dados que nesta mesma variedade devem existir substâncias fungitóxicas pré-formadas, encontradas nos extratos de folhas sadias, cuja ação é inversamente proporcional à diluição.

Também se observou neste experimento, que no período de incubação de 12 horas, muitos tubos germinativos apresentavam ramificações, dificultando a sua medição, por ser

reduzido o número de propágulos com pró-micélios retos e não ramificados.

Estudo dos efeitos dos extratos de folhas de arroz da variedade Dular sobre *P.oryzae*, em diferentes tempos de incubação (Experimentos 6 e 7):

Usando-se extratos de Dular, realizou-se dois experimentos para determinar se existia um período de incubação mais adequado, que permitisse uma melhor estimativa do alongamento do tubo germinativo. Nestes experimentos ensaiou-se separadamente dois extratos de folhas da variedade Dular, inoculadas e sadias, obtidos separadamente em duas ocasiões diferentes.

Com cada conjunto de extratos foram feitos dois experimentos que diferiram apenas com relação ao conjunto de extratos, obtidos em ocasiões diferentes, mas seguindo-se a mesma metodologia.

Os extratos foram usados numa proporção final de 1:1, depois de combinados com igual volume de uma suspensão de esporos de *P.oryzae*, que também teve uma concentração final de 25 conídios por campo microscópico de 125X (Objetiva 10X e ocular 12,5X).

Em cada experimento foram ensaiados esporos dos isolados 63m<sub>1</sub>, não patogênico e 73m<sub>5</sub>, altamente patogênico, em doze períodos de incubação.

Como controles utilizou-se um extrato em branco

de etanol e água destilada esterilizada.

O delineamento dos ensaios realizados com cada isolado, dentro das duas combinações de extratos, foi de um fatorial 12 x 4, com três repetições. Para efeito de análise estatística foram considerados como fatoriais 11 x 4, pois no primeiro tempo de incubação não se observou germinação dos esporos. Ainda para efeitos estatísticos, considerou-se cada isolado em separado.

Os dados de germinação de esporos e alongamento do tubo germinativo destes ensaios, para cada combinação dos extratos (primeira e segunda extração), encontram-se nos QUADROS 6, 7, 8 e 9 (Experimento 6), 10, 11, 12 e 13. (Experimento 7).

Os resultados destes ensaios de tempo de incubação mostraram que entre quatro e dez horas de incubação, seriam os melhores tempos de avaliação e que após 10 horas a avaliação se torna difícil pelo aumento da ramificação dos tubos germinativos. Entretanto, esses ensaios com as duas combinações de extratos etanólicos utilizadas, mostraram que os extratos de plantas doentes possuem uma atividade fungitóxica maior que os extratos de plantas sadias, e que o comportamento do isolado 63m<sub>1</sub>, mostrou uma maior sensibilidade ao princípio fungitóxico dos extratos de folhas inoculadas que o isolado 73m<sub>5</sub>. O isolado patogênico 73m<sub>5</sub> superou o efeito inibitório nos maiores períodos de incubação, demonstrando desse modo uma possível capacidade de desintoxicação do extrato.



QUADRO 6 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na 1.<sup>a</sup> extração, sobre a germinação de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em diferentes períodos de incubação.

Tempos de incubação (horas)	Germinação de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> a/				Média dos tempos
	Extratos de folhas Inoculadas	Sadias	Etanol	H <sub>2</sub> O	
1	- b/	-	-	-	-
2	15,98	15,31	11,90	11,48	13,67
3	30,87	35,65	21,07	28,85	29,11
4	37,07	37,66	31,93	28,13	33,69
5	54,55	60,07	29,77	31,94	44,08
6	50,58	56,08	32,15	36,56	43,84
7	53,53	62,38	42,51	33,79	48,05
8	54,36	59,44	42,31	43,08	49,80
9	55,35	64,66	48,44	45,19	53,41
10	60,27	65,18	55,16	56,79	59,35
11	64,45	71,57	55,35	57,00	62,09
12	68,67	76,02	58,29	58,91	65,47
Média dos extratos	49,60	54,91	38,99	39,25	45,69

Coefficiente de variação .....	=	5,22%
DMS (Tukey) 5% - Tempos dentro dos extratos ....	=	6,45
- Tempos .....	=	3,22
- Extratos dentro dos tempos.....	=	5,11
- Extratos .....	=	2,38

a/ = Média de três repetições da percentagem de germinação transformada em  $\text{arc. sen } \sqrt{\frac{V}{100}}$ .

b/ = Valores iguais a zero, eliminados da análise estatística.

QUADRO 7 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na primeira extração, sobre a germinação de esporos do isolado 73m<sub>5</sub>, em diferentes períodos de incubação.

Tempos de incubação (horas)	Germinação de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> a/				Média dos tempos
	Extratos de folhas Inoculadas	Sadias	Etanol	H <sub>2</sub> O	
1	-b/	-	-	-	-
2	35,86	36,78	44,04	42,31	39,75
3	51,40	53,97	54,56	59,59	54,88
4	58,31	61,73	65,19	65,10	62,58
5	59,94	67,78	67,53	67,77	65,75
6	57,91	62,85	66,95	66,98	63,67
7	55,20	67,14	69,40	69,23	65,24
8	56,48	68,06	58,52	67,37	62,60
9	62,75	69,93	67,96	63,73	66,09
10	69,77	75,10	65,67	66,96	69,37
11	73,65	75,10	65,92	67,24	70,47
12	72,99	74,28	66,71	72,02	71,50
Média dos extratos	59,48	64,79	62,95	64,39	62,90
Coeficiente de variação .....					= 5,39%
DMS (Tukey) 5% - Tempos dentro dos extratos ..					= 9,17
- Tempos .....					= 4,58
- Extratos dentro dos tempos ..					= 7,27
- Extratos .....					= 2,19

a/ = Médias de três repetições da percentagem de germinação transformada em  $\text{arc. sen } \sqrt{\frac{V}{100}}$ .

b/ = Valores iguais a zero, eliminados da análise estatística.

QUADRO 8 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na primeira extração, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em diferentes períodos de incubação.

Tempos de incubação (horas)	Comprimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> a/				Média dos tempos
	Extratos de folhas Inoculadas	Sadias	Etanol	H <sub>2</sub> O	
1	-b/	-	-	-	-
2	14,17	14,20	11,67	14,60	13,66
3	24,23	25,53	16,57	31,30	24,40
4	36,53	41,67	42,00	52,67	43,21
5	43,83	52,17	62,33	72,27	57,65
6	47,97	60,10	71,00	75,50	63,64
7	46,33	57,17	88,33	92,50	71,08
8	60,63	64,63	83,83	84,27	73,34
9	69,67	72,37	87,70	94,87	81,15
10	85,97	92,53	103,53	102,17	96,05
11	93,77	97,23	102,83	102,00	98,95
12	90,43	97,27	103,30	102,57	98,39
Média dos extratos	55,77	61,35	70,28	74,97	65,59
Coeficiente de variação .....					= 4,27%
DMS (Tukey) 5% - Tempos dentro dos extratos .					= 7,58
- Tempos .....					= 3,78
- Extratos dentro dos tempos .					= 6,01
- Extratos .....					= 1,81

a/ = Médias de três repetições do comprimento do tubo germinativo, em micras.

b/ = Valores iguais a zero, eliminados da análise estatística.

QUADRO 9 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na primeira extração, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 73m<sub>5</sub>, em diferentes tempos de incubação.

Tempos de incubação (horas)	Comprimento do tubo germinativo de esporos do isolado 73m <sub>5</sub>				Média dos tempos
	Extratos Inoculadas	Sadias	Etanol	H <sub>2</sub> O	
1	- <u>b/</u>	-	-	-	-
2	18,10	21,80	31,73	32,97	26,15
3	30,97	31,90	46,40	54,03	40,82
4	41,40	42,40	72,07	66,67	55,63
5	49,27	53,76	73,87	74,30	62,80
6	49,43	59,83	80,23	75,50	66,25
7	50,70	62,47	103,63	95,17	77,99
8	57,53	66,43	92,60	100,56	79,28
9	60,30	91,06	114,67	100,67	91,67
10	90,73	97,37	103,20	104,20	98,87
11	92,00	93,17	102,73	99,77	96,91
12	92,83	95,73	102,63	103,70	98,72
Média dos extratos	57,57	65,08	83,98	82,50	72,28

Coefficiente de variação ..... = 4,00%

DMS (Tukey) 5% - Tempos dentro dos extratos .. = 7,82

- Tempos ..... = 3,91

- Extratos dentro dos tempos .. = 6,20

- Extratos ..... = 1,86

a/ = Médias de três repetições do comprimento do tubo germinativo, em micras.

b/ = Valores iguais a zero, eliminados da análise estatística.

QUADRO 10 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na segunda extração, sobre a germinação de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em diferentes tempos de incubação.

Tempos de incubação (horas)	Germinação de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> a/				Média dos tempos
	Extratos Inoculadas	Sadias	Etanol	H <sub>2</sub> O	
1	- b/	-	-	-	-
2	0,00	1,91	8,47	1,91	3,07
3	12,88	17,71	12,36	11,02	13,49
4	26,92	41,55	28,87	17,30	28,66
5	43,28	54,77	37,24	33,20	42,12
6	46,34	58,10	36,36	30,84	43,03
7	50,38	64,26	37,85	30,36	45,71
8	55,87	62,78	34,60	29,99	45,81
9	60,90	68,35	38,61	41,54	52,35
10	65,25	72,47	44,04	39,60	55,33
11	63,47	73,31	39,02	38,21	53,50
12	66,46	69,16	56,95	43,47	58,56
Média dos extratos	44,54	53,12	34,08	28,86	40,15

Coefficiente de variação ..... = 7,15%

DMS (Tukey) 5% - Tempos dentro dos extratos .. = 7,77

- Tempos ..... = 3,88

- Extratos dentro dos tempos .. = 6,16

- Extratos ..... = 1,85

a/ = Médias de três repetições da percentagem de germinação transformada em  $\text{arc. sen } \sqrt{\frac{\%}{100}}$ .

b/ = Valores iguais a zero, eliminados da análise estatística.

QUADRO 11 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na segunda extração, sobre a germinação de esporos do isolado 73m<sub>5</sub>, em diferentes tempos de incubação.

Tempos de incubação (horas)	Germinação de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> a/				Média de tempos
	Extratos de folhas Inoculadas	Sadia	Etanol	H <sub>2</sub> O	
1	-	-	-	-	-
2	13,76	17,75	20,09	24,33	18,98
3	14,07	20,50	15,60	13,27	15,86
4	47,30	51,95	51,80	34,64	46,42
5	41,70	58,29	37,23	49,44	46,66
6	59,82	68,93	57,47	65,47	62,92
7	72,06	75,04	71,67	61,83	70,15
8	72,35	70,96	68,32	70,38	70,50
9	75,49	74,76	71,05	68,10	72,35
10	76,66	79,14	73,73	70,16	74,92
11	75,70	75,10	78,10	73,22	75,53
12	77,25	75,10	73,24	71,02	74,15
Média dos extratos	56,92	60,68	56,21	54,71	57,13
Coeficiente de variação .....					= 4,84%
DMS (Tukey) 5% - Tempos dentro dos extratos ..					= 7,48
- Tempos .....					= 3,71
- Extratos dentro dos tempos ..					= 5,93
- Extratos .....					= 1,78

a/ = Médias de três repetições da percentagem de germinação transformada em  $\text{arc. sen } \sqrt{\frac{\%}{100}}$ .

b/ = Valores iguais a zero, eliminados da análise estatística.

QUADRO 12 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na segunda extração, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em diferentes tempos de incubação.

Tempos de incubação (horas)	Comprimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m <sub>1</sub> a/				Média dos tempos
	Extratos de folhas Inoculadas	Sadias	Etanol	H <sub>2</sub> O	
1	- b/	-	-	-	-
2	0,00	5,40	12,06	4,66	5,53
3	4,96	8,56	12,50	12,03	9,51
4	12,93	25,67	26,37	26,20	22,79
5	20,07	35,80	33,23	33,70	30,70
6	23,80	39,63	29,63	28,93	30,50
7	37,63	67,50	55,46	57,70	54,57
8	54,86	77,86	72,16	64,60	67,37
9	57,80	81,23	70,73	66,76	69,13
10	72,56	91,16	65,33	64,56	73,40
11	85,53	107,37	88,50	87,00	92,10
12	89,86	110,66	87,13	88,60	94,06
Média dos extratos	41,82	59,17	50,28	48,61	49,97
Côeficiente de variação .....					= 5,10%
DMS (Tukey) 5% - Tempos dentro dos extratos .					= 6,91
- Tempos .....					= 3,45
- Extratos dentro dos tempos .					= 5,47
- Extratos .....					= 1,65

a/ = Médias de três repetições do comprimento do tubo germinativo, em micras.

b/ = Valores iguais a zero, eliminados da análise estatística.

QUADRO 13 - Efeito dos extratos de folhas de Dular, obtidos na segunda extração, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 73m<sub>5</sub>, em diferentes tempos de incubação.

Tempos de incubação (horas)	Comprimento do tubo germinativo de esporos do isolado 73m <sub>5</sub> a/				Média dos tempos
	Extratos de folhas da variedade Dular				
	Inoculadas	Sadias	Etanol	H <sub>2</sub> O	
1	-	-	-	-	-
2	9,13	13,50	11,30	13,30	11,80
3	9,93	15,63	14,70	16,63	14,22
4	23,96	35,73	34,53	45,43	34,91
5	19,26	36,16	35,30	39,73	32,61
6	25,17	36,67	34,40	39,73	33,99
7	49,60	60,80	62,10	66,13	59,65
8	47,96	81,53	80,90	80,16	72,64
9	63,93	83,67	83,93	82,83	78,59
10	72,13	96,87	98,83	91,73	89,89
11	86,66	105,26	108,03	109,86	102,45
12	94,80	126,60	123,60	110,83	113,95
Média dos extratos	45,69	62,95	62,51	63,30	58,61

Coeficiente de variação ..... = 3,01%

DMS (Tukey) 5% - Tempos dentro dos extratos .. = 4,78

- Tempos ..... = 2,39

- Extratos dentro dos tempos .. = 3,79

- Extratos ..... = 1,14

a/ = Médias de três repetições do comprimento do tubo germinativo, em micras.

b/ = Valores iguais a zero, eliminados da análise estatística.



Comparando os extratos de folhas sadias aos de folhas doentes, os dados obtidos reforçam a hipótese de produção de substâncias tóxicas no hospedeiro após a sua infecção por um patógeno que provoque uma reação de resistência considerada moderada.

Comparação qualitativa dos extratos de folhas, inoculadas e sadias, de arroz da variedade Dular, cromatograficamente:

Evidências observadas nos experimentos anteriores mostraram uma maior capacidade de inibição nos extratos de plantas doentes do que das sadias. Especialmente, nos experimentos de diluições dos extratos houve a suposição de que os dois tipos de extratos eram qualitativamente diferentes.

Para a comprovação deste fato se comparou estes extratos cromatograficamente em CCF, tendo como suporte sílica gel G, pelo sistema indicado por VAN ETTEN e BATEMAN (39).

Após o desenvolvimento do cromatograma, sua observação sob a luz ultravioleta (onda curta) e o teste para revelação de fenóis com cloreto férrico (1%) + ferrocianeto de potássio (1%) não foram observadas diferenças entre os dois extratos cromatografados. Apenas uma substância, possivelmente fenólica, que reagiu com os reativos usados para fenóis, foi notada em todos os extratos. Esta substância foi localizada no  $R_f = 0,9$ . Vários cromatogramas foram feitos com diferentes volumes de extrato (50, 100, 150 e 200  $\mu$ l), e inclusive em suporte de sílica gel GF 254, tendo mostrado consistência na presen-

ça desta substância em todos os estratos. A intensidade da reação para fenóis bem como a área da mancha nas placas de cromatograma não evidenciou uma diferença marcante de que essa substância se apresentasse em concentrações diferentes nos extratos de plantas sadias e doentes.

Estes resultados permitiram supor que uma outra substância, não detectada nos cromatogramas, poderia também estar envolvida no processo.

Estudo dos efeitos dos eluídos dos extratos de Dular sobre o P.oryzae (Experimentos 8 e 9):

Posteriormente, como não foi evidenciada nenhuma diferença entre os extratos de folhas de Dular, doentes e sadias, por CCF, separou-se eluídos, pelo método tradicional, de cada um dos cromatogramas, em faixas com Rf determinado, tanto do extrato de folhas doentes como de sadia, e se ensaiou os mesmos sobre a germinação de P.oryzae. Obteve-se cinco eluídos entre os Rf 0,0 e 1,0, raspando-se faixas com uma largura de 2 cm, cada uma, dos cromatogramas. Adicionalmente também foram eluídas as faixas situadas abaixo dos pontos de origem (Rf 0,0).

Estes seis eluídos, mais os respectivos extratos brutos concentrados, foram ensaiados em dois experimentos que diferiram entre si apenas pelo isolado de P.oryzae. No experimento 8 foi usado o isolado 63m<sub>1</sub>, não patogênico, enquanto no Experimento 9 foi usado o isolado 73m<sub>5</sub>, altamente patogênico.

Os eluídos foram combinados na proporção de 1:1

com as suspensões de esporos de *P.oryzae*, que no final tiveram a concentração de 25 conídios por campo microscópico com 125 X (Objetiva 10X e ocular 12,5X).

Dentro de cada experimento foram usados dois períodos de incubação (6 e 12 horas), sendo cada um deles considerado como ensaio separado, para a análise estatística. Esses ensaios foram delineados como fatoriais 7 x 2, com três repetições completamente casualizadas.

Os dados obtidos na germinação e no alongamento do tubo germinativo, no experimento com o isolado 63m<sub>1</sub> (nº 8) estão nos QUADROS 14 e 15, enquanto que do isolado 73m<sub>5</sub> (nº 9) estão nos QUADROS 16 e 17, respectivamente.

Nestes ensaios evidenciou-se a presença de substâncias com atividade fungitóxica nas faixas compreendidas entre os Rf 0,6-0,8 e 0,8-1,0, dos eluídos de folhas doentes, sendo que nos extratos de folhas sadias apenas o eluído da faixa 0,8-1,0, mostrou-se altamente eficiente em inibir o isolado não patogênico e praticamente não mostrou um efeito significativo sobre o isolado patogênico.

Esses resultados evidenciaram a presença de pelo menos um princípio fungitóxico nas plantas inoculadas que não está presente nas plantas sadias. A substância ou substâncias presentes na faixa compreendida entre os Rf 0,6 e 0,8, apenas do extrato de plantas doentes (inoculadas), pode ser considerada como uma fitoalexina.

QUADRO 14 - Efeito dos eluídos de extratos de Dular na concentração 1:1, sobre a germinação de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em tempos diferentes de incubação.

Eluídos de extratos de folhas de arroz (Rf)	Germinação dos esporos em diferentes tempos de incubação a/				
	6 horas		12 horas		
	Doentes	Extrato de plantas Sadias b/	Média dos eluídos	Extratos de plantas Sadias b/ Média dos eluídos	
≤0,0	41,16	72,90	57,03	71,05	72,15
0,0-0,2	60,25	64,43	62,34	71,31	72,30
0,2-0,4	20,17	29,97	25,07	70,40	58,19
0,4-0,6	29,54	30,98	30,26	60,72	62,95
0,6-0,8	0,00	30,06	15,03	59,59	37,58
0,8-1,0	0,00	6,55	3,27	59,19	40,97
Extrato bruto	69,17	69,21	69,19	79,13	78,83
Média do extrato	31,47	43,44	37,46	53,51	60,42

  

Coefficiente de variação % germinação	..... =	7,32%	..... =	4,90%
- etanol	..... =	43,85 a/	..... =	65,42 a/
- água destilada	..... =	41,93	..... =	65,46
DMS (Tukey) 5%	Eluídos dentro de	7,11	Eluídos dentro de	7,67
- Extratos	..... =	5,03	..... =	5,43
- Eluídos	..... =	4,59	..... =	4,95
- Extratos dentro de Eluídos	..... =	1,73	..... =	1,87
- Extratos	..... =	.....	..... =	.....

a/=Média de três repetições da percentagem de germinação transformada em arc.senV%/100.  
b/=Extratos eluídos, por meio de CCF, em faixas de 2 cm de largura.

QUADRO 15 - Efeitos dos eluídos de extratos de Dular na concentração 1:1, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 63m<sub>1</sub>, em diferentes tempos de incubação.

Eluídos de ex- tratos de fo- lhas de arroz (Rf)	6 horas			12 horas		
	Comprimento do tubo germinativo em diferentes tempos de incubação a/ Doentes	Comprimento de plantas b/ Sadias	Média dos eluídos	Extratos de plantas b/ Doentes	Extratos de plantas b/ Sadias	Média dos eluídos
≤0,0	24,63	36,67	30,65	112,63	101,60	107,12
0,0-0,2	8,03	25,70	16,87	66,93	78,80	72,87
0,2-0,4	18,97	38,50	28,73	31,40	57,40	44,40
0,4-0,6	18,20	15,57	16,88	36,83	44,37	40,60
0,6-0,8	0,00	18,77	9,38	10,23	41,20	25,72
0,8-1,0	0,00	5,17	2,58	14,73	28,77	21,75
Extrato bruto	25,33	44,73	35,03	99,17	152,20	125,68
Média dos extra- tos	13,59	26,44	20,01	53,13	72,04	62,59
Coefficiente de variação	.....	.....	= 11,03%	.....	.....	= 5,41%
Comprimento do tubo - etanol	.....	.....	= 37,53 a/	.....	.....	= 63,13 a/
- água destilada	.....	.....	= 41,63	.....	.....	= 77,20
DMS(Tukey)5% - Eluídos dentro dos extratos	.....	.....	= 5,72	.....	.....	= 8,78
- Eluídos	.....	.....	= 4,05	.....	.....	= 6,21
- Extratos dentro dos eluídos	.....	.....	= 3,70	.....	.....	= 5,67
- Extratos	.....	.....	= 1,39	.....	.....	= 2,14
a/-Média de três repetições do comprimento do tubo germinativo, em micras.						
b/-Extratos eluídos, por meio de CCF, em faixas de 2 cm de largura.						

QUADRO 16 - Efeito dos eluídos de extratos de Dular na concentração 1:1, sobre a germinação de esporos do isolado 73m<sub>5</sub>, em tempos diferentes de incubação.

Eluídos de extratos de folhas de arroz (Rf)	Germinação dos esporos em diferentes tempos de incubação a/			12 horas		
	Doentes	Sadias	Média dos eluídos	Doentes	Sadias	Média dos eluídos
<0,0	74,76	75,14	74,95	75,04	70,16	72,60
0,0-0,2	74,28	73,59	73,93	74,34	76,08	75,21
0,2-0,4	65,46	67,76	66,61	75,61	77,62	76,62
0,4-0,6	61,85	69,97	65,91	76,47	75,47	75,97
0,6-0,8	0,00	63,36	32,68	11,28	75,47	43,37
0,8-1,0	35,05	50,62	42,83	66,08	66,02	66,05
Extrato bruto	75,49	79,13	77,31	77,19	77,01	77,10
Média dos extratos	55,27	68,79	62,03	64,14	73,97	69,56

Coefficiente de variação % germinação	..... =	6,31%	..... =	5,15%
- etanol	..... =	68,87 a/	..... =	69,66 a/
- água destilada	..... =	70,99	..... =	72,99
DMS(Tukey)5% - Eluídos dentro dos extratos	..... =	10,16	..... =	9,29
- Eluídos.....	..... =	7,18	..... =	6,57
- Extratos dentro dos eluídos	..... =	6,56	..... =	6,00
- Extratos.....	..... =	2,48	..... =	2,26

a/-Média de três repetições da percentagem de germinação transformada em arc.senV%  
 b/-Extratos eluídos por meio de CCF, em faixas de 2 cm de largura.

QUADRO 17 - Efeito dos eluídos de extratos de Dular na concentração 1:1, sobre o crescimento do tubo germinativo de esporos do isolado 73m<sub>5</sub>, em diferentes tempos de incubação.

Eluídos de extratos de arroz (Rf)	Comprimento do tubo germinativo em diferentes tempos de incubação a/			12 horas		
	Doentes	Extratos de plantas b/ Sadias	Média dos eluídos	Doentes	Extratos de plantas b/ Sadias	Média dos eluídos
≤0,0	42,20	36,73	39,46	104,17	104,90	104,53
0,0-0,2	19,46	32,00	25,73	50,33	69,57	59,95
0,2-0,4	24,30	26,40	25,37	61,37	67,10	64,23
0,4-0,6	24,00	22,30	23,15	55,10	57,83	56,46
0,6-0,8	0,00	26,10	13,05	5,20	50,53	27,86
0,8-1,0	8,67	13,57	11,21	18,17	23,07	20,62
Extrato bruto	32,86	56,33	44,60	111,97	160,90	136,43
Média dos extratos	21,67	30,49	26,08	58,04	76,27	67,15

Coefficiente de variação	.....	=	6,70%	.....	=	6,60%
Comprimento do tubo - etanol	.....	=	45,16 a/	.....	=	94,23 a/
-água destilada.	.....	=	46,16	.....	=	87,63
DMS(Tukey)5%-Eluídos dentro dos extratos.....	.....	=	4,53	.....	=	11,49
-Eluídos .....	.....	=	3,20	.....	=	8,13
-Extratos dentro dos eluídos .....	.....	=	2,92	.....	=	7,42
-Extratos .....	.....	=	1,10	.....	=	2,80

a/=Média de três repetições do comprimento do tubo germinativo, em micras.  
b/=Extratos eluídos por meio de CCF, em faixas de 2 cm de largura.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com os exsudatos difundidos em gotas, evidenciaram uma grande influência da exsudação de substâncias nutrientes. Essas substâncias estimularam a germinação e o crescimento do tubo germinativo dos esporos do isolado teste, mascarando alguma possível ação fungitóxica que pudesse existir nesses exsudatos.

Tais resultados diferiram dos obtidos por UEHARA (36 e 37) que, usando praticamente a mesma metodologia, detectou a presença de uma fitoalexina com alta capacidade de inibição sobre a germinação de esporos de P.oryzae. Entretanto coincidiram com os dados obtidos por GRIFFITHS (9), que não encontrou ação fungitóxica nos exsudatos de folhas de arroz de uma variedade resistente, embora a tivesse encontrado nos extratos aquosos da mesma variedade.

Provavelmente essas divergências da literatura , entre si e em relação aos dados obtidos neste trabalho, sejam



devidas a variações na capacidade de produção de fitoalexina por parte das variedades de arroz estudadas, pois conforme determinou UEHARA (36), existem diferenças entre elas e mesmo entre folhas de idades diferentes de uma mesma variedade. Talvez a variedade Zenith aqui usada na combinação patógeno/hospedeiro incompatível, tenha uma pequena capacidade de exsudar substâncias fungitóxicas, o que aliado à grande exsudação de substâncias nutrientes, mascarou os resultados, não permitindo evidenciar nenhuma inibição. Em combinações com outras variedades e isolados, provavelmente possam ser obtidos dados semelhantes aos de UEHARA (36 e 37).

Por outro lado, usando-se o método de extração em etanol 70%, foi possível encontrar já nos ensaios preliminares, uma ação fungitóxica do extrato de folhas inoculadas da variedade Dular. Depois, notou-se também alguma ação no extrato de folhas doentes da variedade NP-125.

Através dos diversos bioensaios realizados posteriormente, ficou evidente que o extrato de folhas inoculadas da variedade Dular tinha elevada capacidade de inibir a germinação e o alongamento do tubo germinativo de esporos de P.oryzae. Correlacionando-se essa maior capacidade de inibição com os tipos de reações observadas nas folhas das variedades inoculadas para a obtenção desses extratos, verificou-se que as variedades Dular tinham apresentado resistência moderada, de acordo com a escala internacional (2), além de possuírem um halo marrom bem mais evidente, enquanto as folhas das variedades NP-125 e Usen

reagiram mais para suscetível. Pelo exposto pode-se constatar que a maior ação fungitóxica dos extratos etanólicos correspondeu ao maior grau de resistência e à presença de reação de hipersensibilidade ao redor das lesões, concordando com as referências relatadas por vários dos autores citados (9, 12, 13, 31, 32 e 33).

Quando se estudou, em paralelo, o efeito dos extratos etanólicos da variedade Dular sobre um isolado não patogênico e outro altamente patogênico, verificou-se que o primeiro (incompatível) mostrou-se mais sensível às substâncias fungitóxicas presentes no extrato de folhas inoculadas do que o isolado patogênico (compatível). Também, devido a algumas evidências mostradas pelo isolado patogênico, resistindo melhor e superando a ação fungitóxica, houve indicação de que o mesmo possuía uma provável capacidade de desintoxicação, concordando com citações de GOODMAN et al.(7) e WOOD (40).

Na comparação qualitativa dos extratos de Dular, por cromatografia, não foi evidenciada nenhuma diferença entre os extratos de folhas doentes e sadias, tendo apenas sido localizada uma substância que reagiu para fenóis no  $R_f=0,9$ . Entretanto não se mediu o aumento dos teores de fenóis nas plantas inoculadas com P.oryzae, não se podendo fazer correlações com os dados obtidos por SRIDHAR (30) e com citações de OU (16) e SUZUKI (32 e 33), que dizem ter encontrado maiores teores nas plantas inoculadas.

Com tais resultados, supôs-se que existiriam ou-

tras substâncias fungitóxicas nos extratos de folhas doentes, além desses prováveis fenóis, que seriam responsáveis pelas diferenças verificadas na inibição do fungo P.oryzae, nos experimentos anteriores.

A posterior obtenção e estudo dos efeitos de eluídos de diversas faixas dos cromatogramas dos extratos da variedade Dular, possibilitou localizar a presença de pelo menos uma outra substância no extrato de folhas inoculadas que se mostrou altamente fungitóxica. Sua localização no cromatograma foi no eluído obtido na faixa entre os Rf 0,6 e 0,8. O fato dessa substância ter aparecido somente no extrato de folhas inoculadas e ter sido mais tóxica ao isolado não patogênico, permitiram caracterizá-la como uma fitoalexina, de acordo com GOODMAN et al.(7), WOOD (40) e CRUICKSHANK (5). Inclusive, esta fitoalexina pode estar relacionada com a fitoalexina detectada em arroz por UEHARA (36), usando o método de difusão em gotas.

Os eluídos obtidos na faixa compreendida entre os Rf 0,8 e 1,0, dos cromatogramas de extratos de folhas doentes e sadias, também apresentaram caráter fungitóxico, principalmente para o isolado não patogênico de P.oryzae. Comparando estes resultados com a análise qualitativa (CCF) dos extratos de Dular verificou-se que nesses eluídos (Rf=0,8-1,0) estavam contidas as substâncias que reagiram para fenóis (Rf = 0,9), devendo ter sido estas as responsáveis pelo poder inibitório dos mesmos, pois segundo GOODMAN et al.(7) e SRIDHAR (30) os fenóis

pré-formados são tóxicos ao P.oryzae. Provavelmente o efeito observado nas diluições do extrato de folhas sadias (experimento 6) também foi devido à ação desses fenóis.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho permitiram evidenciar que o método de extração em etanol foi mais eficiente do que o de difusão em gotas para detectar fitoalexinas e fenóis nas combinações patógeno/hospedeiro estudadas. Entretanto, as diferenças entre as variedades usadas em ambos os métodos podem ter influído para tais resultados, devendo-se no futuro comparar as mesmas combinações nas duas técnicas, para melhores esclarecimentos.

Nos estudos dos efeitos dos exsudatos, obtidos por difusão em gotas, concluiu-se que a grande exsudação de substâncias nutrientes mascarou algum possível efeito fungitóxico que poderia existir nos mesmos, enquanto que nos extratos etanólicos de plantas doentes da variedade Dular foi evidente a capacidade de inibição.

A análise cromatográfica qualitativa dos extratos etanólicos dessa variedade e o estudo posterior dos efeitos de eluídos dos cromatogramas desses extratos permitiram concluir que existia uma substância fenólica, localizada no  $R_f=0,9$ , em extratos de plantas doentes e sadias, e que o eluído da faixa entre os  $R_f$  0,8 e 1,0 tinha maior poder de inibição sobre o isolado não patogênico.

O estudo dos efeitos dos eluídos dos cromatogramas levou também a concluir que no eluído obtido entre os  $R_f$

0,6 e 0,8 do extrato de plantas doentes existia pelo menos uma fitoalexina, com alta capacidade inibitória sobre P.oryzae, envolvida de modo mais efetivo do que os fenóis pré-formados nos mecanismos de resistência do arroz ao fungo. Esta fitoalexina não teve a sua natureza química elucidada, pois reagiu negativamente aos reativos para fenóis utilizados neste trabalho.

## RESUMO

O mecanismo de resistência do arroz ao fungo Pyricularia oryzae Cav. foi estudado usando-se combinações compatíveis e incompatíveis de hospedeiro/patógeno. Pela técnica da difusão em gotas conseguiu-se demonstrar apenas uma pequena atividade fungitóxica dos exsudatos obtidos. Entretanto extratos etanólicos obtidos de folhas da variedade Dular, inoculadas com isolados do fungo que apresentassem reações moderadas, mostraram elevada capacidade em inibir o desenvolvimento de fungos da mesma espécie, não patogênicos a esta variedade.

Os extratos etanólicos de folhas de arroz inoculadas e não inoculadas foram cromatografados em camada fina revelando a presença de uma substância fenólica, pré-formada e de uma substância não fenólica presente apenas nas folhas das plantas inoculadas. Esta última substância mostrou-se altamente fungitóxica a um isolado não patogênico e pouco fungitóxica a outro isolado patogênico.

Estes resultados apontam a existência de uma fitoalexina envolvida no mecanismo de resistência do arroz ao fungo P.oryzae.

## SUMMARY

The rice resistance mechanism to the rice blast fungus Pyricularia oryzae Cav. was studied by using compatible and incompatible host/pathogen combinations. By the drop diffusion technique it was demonstrated only a few fungitoxic action in the exudates. However, ethanolic extracts obtained from the Dular rice variety leaves, inoculated with fungus isolates which appeared to have moderate reactions, showed a high capacity for growth inhibition on some isolates of the same fungus, no pathogenics to this variety.

The ethanolic extracts from inoculated and no inoculated rice leaves were chromatographed in the thin-layer system showing the presence of a pre-formed phenolic substance and another no phenolic substance, only in the inoculated rice leaves. This last substance appeared to have high fungitoxity to a no pathogenic isolate than to another pathogenic isolate.

This results pointed out the existance of a phy-



toalexin involved in the rice resistance mechanism to the blast fungus P.oryzae.

## LITERATURA CITADA

- (1) AMARAL, R.E.M. e A.S.RIBEIRO 1972. Doenças do arroz no Brasil. In: REUNIÃO DO COMITÊ DE ARROZ PARA AS AMERICAS DA COMISSÃO INTERNACIONAL DO ARROZ - FAO,2, Pelotas, 6-11 dez.1971. Contribuições técnicas da delegação brasileira. Brasília, DNPEA, DPF. p.133-47.
- (2) ATKINS, J.G.; A.L.ROBERT; C.R.ADAIR; K.GOTO; T.KOZAKA; R. YANAGIDA; M.YAMADA e S.MATSUMOTO. 1967. An international set of rice varieties for differentiating races of Piricularia oryzae. Phytopathology, St.Paul, 57 (3):296-301.
- (3) CARDOSO, C.O.N. e M.O.GARRAWAY. 1975. Produção de fenóis e fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro inoculados com Fusarium solani f. phaseoli (Burk.)Snyd. e Hans. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 1(2):92-104.
- (4) CRAMER, H.H. 1967. Defensa vegetal y cosecha mundial. Pflanzenschutz Nachrichten "Baver", Leverkusen, 20(1): 105-42.
- (5) CRUICKSHANK, I.A.M. 1963. Phytoalexins. Annual Review of

- Phytopathology, Palo Alto, 1:351-74.
- (6) FRATINE, J.A. e J.SOAVE. 1974. Tentativa de avaliação das perdas causadas pela brusone nas culturas de arroz no estado de São Paulo. Revista de Agricultura, Piracicaba, 49:101-08.
- (7) GOODMAN, R.N.; Z.KIRALY e M.ZAITLIN. 1967. The biochemistry and physiology of infections plant diseases. Princeton, D.Van Nostrand. 354p.
- (8) GOTO, K. 1965. Estimating losses from rice blast in Japan. In: IRRI. The rice blast disease. Baltimore, John Hopkins. p. 195-202.
- (9) GRIFFITHS, D.A. 1969. Rice blast in Malaya: spore germination and host penetration. Plant Disease Report, Beltsville, 53(6):490-93.
- (10) IRGA. 1956. Prejuízos causados a lavoura de arroz do Rio Grande do Sul pela brusone. Porto Alegre. 2p. (datilografado).
- (11) ISSA, E.; R.E.M. AMARAL; D.M. SOUZA e N.V. BANZATTO. 1973. Resistência varietal do arroz à brusone, à mancha parda, e a "mulata". O Biológico, S.Paulo, 39(2):321-35.
- (12) KIYOSAWA, S. e H.FUJIMAKI. 1967. Studies of mixture inoculation of Piricularia oryzae on rice. 1-Effects of mixture inoculation and concentration on the formation of susceptible lesions in the injection inoculation, | Reprinted from Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences (Japan), Tokyo, Serie D nº |17

- (13) KOZAKA, T. 1971. Recent advances in the studies of horizontal resistance for the blast disease of rice in Japan. Cali, CIAT. 23p. | Papers presented at SEMINAR ON HORIZONTAL RESISTANCE TO THE RICE BLAST DISEASE, Cali |.
- (14) MACHADO, S.S. 1957. A brusone nas lavouras de arroz do Rio Grande do Sul safra 1955/6. Lavoura Arrozeira, Porto Alegre, 11(121):28-9.
- (15) OU, S.H. 1971. Variability of Pyricularia oryzae and its relation to varietal resistance. Cali, CIAT, 27p. | Papers presented at SEMINAR ON HORIZONTAL RESISTANCE TO THE RICE BLAST DISEASE, Cali |.
- (16) OU, S.H. 1972. Rice Diseases. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 368p.
- (17) PADMANABHAN, S.Y. 1965. Estimating losses from rice blast in India. In: IRRI. The rice blast disease. Baltimore, John Hopkins. p.203-21.
- (18) PIERRE, R.E. e D.F. BATEMAN. 1967. Induction and distribution of phytoalexins in Rhizoctonia-infected bean hypocotyls. Phytopathology, St.Paul, 57(11):1154-60.
- (19) PLANT pathology. 1968. In: IRRI. Annual report for 1967. Manila. p.81-113.
- (20) PLANT pathology. 1973. In: IRRI. Annual report for 1972. Manila. p.73-10..
- (21) PRIDHAM, J.B., ed. 1964. Methods in polyphenol chemistry . London, Symposium Publications Division, Pergamon. 146p.
- (22) RANDEKATH, K. 1966. Thin-layer chromatography. 2<sup>a</sup> ed. Trad.

- D.D. Libman. N.York, Academic. 285p.
- (23) REDY, M.K.; R. KOTHANDRAMAN e A. MAHADEVAN, 1969. A comparison of certain biochemical characters of etiolated and normal rice seedlings in relation to susceptibility to blast disease. Indian Phvtopathology, New Delhi, 22(1):149-50.
- (24) RIBEIRO, A.S. 1971. Raças fisiológicas de Piricularia oryzae. Cav.; Rio Grande do Sul; safra 1968/69. Lavoura Arrozeira, Porto Alegre, 24(260):15-24.
- (25) RIBEIRO, A.S. 1973. Identificação de raças do agente causal da brusone; safra 1969/70. Lavoura Arrozeira, Porto Alegre, 26(273):18-22.
- (26) RIBEIRO, A.S. 1973. Moléstias do arroz. Lavoura Arrozeira, Porto Alegre, 26(271):38-46.
- (27) RIBEIRO, A.S. e T. ISHIY. 1974. Reações de variedades de arroz à brusone. Lavoura Arrozeira, Porto Alegre, 27(280):33-43.
- (28) SILVA, P.D. 1971. Incidência da brusone na lavoura de arroz; safra 1968/69. Lavoura Arrozeira, Porto Alegre, 24(260):40-2.
- (29) SOAVE, J.; L.E. AZZINI.; N.V. BANZATTO e T.R. ROCHA, 1975. Comportamento de cultivares de arroz quanto à suscetibilidade a Pyricularia oryzae Cav. em quatro localidades do estado de São Paulo, em 1971/72. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 1(2):25-31.
- (30) SRIDHAR, R. 1972. Phenolic compounds and the rice blast

- disease as influenced by nitrogen fertilization. Il Riso, Milano, 21(1):25-31.
- (31) SRIDHAR, R.; S.H. OU e S.P. Ebron. 1972. Lesion development on a rice cultivar by different races of the blast pathogen. Plant Disease Reporter, Beltsville, 56(11):960-3.
- (32) SUKUZU, N. 1965. Histochemistry of foliage diseases. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 3:265-82.
- (33) SUZUKI, N. 1965. Nature of resistance to blast. In: IRRI. The rice blast disease. Baltimore, John Hopkins, p.277-301.
- (34) TOMIYAMA, K. 1963. Physiology and biochemistry of disease resistance of plants. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 1:295-324.
- (35) TORIYAMA, K. 1971. Recent progress of studies on horizontal resistance in Japan. Cali, CIAT. 57p. | Papers presented at SEMINAR ON HORIZONTAL RESISTANCE TO THE BLAST DISEASE OF RICE, Cali |.
- (36) UEHARA, K. 1958. On the production of phytoalexin by the host plant as a result of interaction between rice plant and the blast fungus (Piricularia oryzae Cav.). | Reprinted from. Annals of the Phytopathological Society of Japan, Tokyo, 23(3):127-30 |. (Em japonês com sumário em inglês).
- (37) UEHARA, K. 1960. On the phytoalexin produced by the results of the interaction between rice plants and the leaf-

- blight bacteria (Xanthomonas oryzae). | Reprinted from. Annals of the Phytopathological Society of Japan, Tokyo, 25(3):149-55 |. (Em japonês com sumário em inglês).
- (38) VAN DER PLANK, J.E. 1971. Horizontal resistance and some suggested projects in relation to blast disease of rice. Cali, CIAT, 9p. | Papers presented at SEMINAR ON HORIZONTAL RESISTANCE TO THE BLAST DISEASE OF RICE, Cali | .
- (39) VAN ETTEN, H.D. e D.F. BATEMAN. 1970. Isolation of phaseolin from Rhizoctonia infected bean tissue. Phytopathology, St.Paul, 60(2):385-6.
- (40) WOOD, R.K.S. 1967. Physiological plant pathology. Oxford, Blackwell Scientific. 570p.