

JONAS ALBERTO RIOS

**RESISTÊNCIA INDUZIDA NA INTERAÇÃO TRIGO - *Pyricularia oryzae* E ELABORAÇÃO DE UMA ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA ESTIMAR A SEVERIDADE DA BRUSONE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

R586r  
2012

Rios, Jonas Alberto, 1985-

Resistência induzida na interação trigo - *Pyricularia oryzae*  
e elaboração de uma escala diagramática para estimar a  
severidade da brusone / Jonas Alberto Rios. – Viçosa, MG,  
2012.

ix, 47f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Fabrício de Ávila Rodrigues.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Trigo - Resistência a doenças e pragas.
2. *Pyricularia oryzae*. 3. Brusone. 4. Trigo - Doenças e pragas - Aspectos fisiológicos. 5. Trigo - Doenças e pragas - Aspectos bioquímicos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.1194

JONAS ALBERTO RIOS

**RESISTÊNCIA INDUZIDA NA INTERAÇÃO TRIGO - *Pyricularia oryzae* E ELABORAÇÃO DE UMA ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA ESTIMAR A SEVERIDADE DA BRUSONE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: em 14 de fevereiro de 2012

---

Renata Sousa Resende

---

Luis Cláudio Vieira da Cunha

---

Fabício de Ávila Rodrigues  
(Orientador)

*A meus pais, Neuza Rios e Jaci Rios:*

*A meu irmão Vinícius*

*A meus amigos e familiares*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida por mais esta oportunidade e proteção.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-graduação de Fitopatologia, por proporcionarem condições para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Fabrício Ávila Rodrigues pela orientação, paciência, apoio, amizade e por seu exemplo de disciplina, competência e profissionalismo.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos.

Aos pesquisadores Dr. Douglas Lau e MSc. Márcio Só e Silva da EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo pelo fornecimento das sementes de trigo utilizadas neste trabalho

Aos meus pais, Neuza e Jaci, ao meu irmão Vinícius, a minha tia Helena e avós Raimunda e Teresa pelo apoio incondicional e pelo referencial de humildade, perseverança e caráter.

A meu padrinho e conselheiro Antonio Fernando de Souza pelos conselhos, sem você nada disso seria possível.

A meu amigo Antonio Lopes de Faria, pelo carinho, amizade e apoio durante todos estes anos.

A Silvia Carvalho pelo apoio incondicional, carinho e amizade durante o mestrado.

Ao amigo e companheiro Daniel Debona, pelo companheirismo durante a execução do trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Interação Planta-Patógeno, em especial, Camila, Wiler, Patrícia, Kelly, Wilka e Leandro pelo companheirismo, amizade e ajuda incondicional durante execução do trabalho. A Dra. Renata pela paciência e auxílio na determinação das atividades enzimáticas.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia, Henrique, Sérgio, Ueder, Pedro, Eugênio pela amizade, auxílio e o convívio agradável.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Bruno, Elenise, Braz, Camilo, Delfim e Sara.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista, meus sinceros agradecimentos.

## **BIOGRAFIA**

Jonas Alberto Rios, filho de Neuza da Consolação de Souza Rios e Jaci Alves Rios, nasceu em 17 de Novembro de 1985, em Florestal, Estado de Minas Gerais.

Ingressou em 2005, no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) onde lhe foi conferido o título de Engenheiro Agrônomo. Nesta instituição, foi bolsista de Iniciação Científica em Fitopatologia, atuando no controle de doenças, sob orientação do Prof. Laércio Zambolim.

Em Março de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal Viçosa, sob orientação do Prof. Fabrício Ávila Rodrigues, defendendo dissertação de mestrado em Fevereiro de 2012.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii

### Capítulo 1

Resistência Induzida na Interação Trigo- <i>Pyricularia oryzae</i> .....	1
RESUMO .....	2
INTRODUÇÃO.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
Crescimento das plantas de trigo:.....	5
Aplicação dos indutores: .....	5
Inoculação das plantas com <i>P. oryzae</i> :.....	5
Quantificação dos componentes de resistência: .....	6
Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA): .....	6
Determinação da atividade de peroxidases (POX, EC1. 11.1.7), polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1), fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5), quitinases (QUI, 3.2.1.14), $\beta$ -1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.39) e lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12):.....	7
Delineamento experimental e análise estatística dos dados: .....	9
RESULTADOS .....	10
Componentes de resistência: .....	10
Atividade das enzimas de defesa e MDA:.....	10
DISCUSSÃO.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17
TABELAS E FIGURAS .....	22

### Capítulo 2

Elaboração e Validação de uma Escala Diagramática para Estimar a Severidade da Brusone do Trigo .....	29
RESUMO .....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Crescimento das plantas de trigo:.....	33
Inoculação das plantas com <i>P. oryzae</i> :.....	33
Elaboração da escala diagramática:.....	34
Validação da escala diagramática.....	34
RESULTADOS .....	36
DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
TABELAS E FIGURAS .....	43

## RESUMO

RIOS, Jonas Alberto, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Resistência induzida na interação trigo - *Pyricularia oryzae* e elaboração de uma escala diagramática para estimar a severidade da brusone.** Orientador: Fabrício de Ávila Rodrigues.

A brusone, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc., é uma das principais doenças que afetam a cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.). O presente trabalho objetivou investigar o efeito do acibenzolar-S-metil (ASM), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) na resistência do trigo em resposta à infecção por *Pyricularia oryzae*, bem como elaborar e validar uma escala diagramática para quantificar a severidade da brusone do trigo. No primeiro estudo, dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 4 repetições. Plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 1 dm<sup>3</sup> de substrato. Os tratamentos utilizados foram: T1- água destilada (testemunha), T2 - 0,1 mM de ácido jasmônico (AJ), T3 - 300 mg/L de acibenzolar-S-metil (ASM) e T4 - 0,5 mM de etileno (ET) (Ethephon). Foram avaliados os componentes de resistência: período de incubação (PI), número de lesões (NL) por cm<sup>2</sup> de área foliar, tamanho de lesão (TL) em mm e a severidade. Os valores de severidade foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do progresso da brusone (AACPB). Para avaliar o efeito dos indutores sobre os mecanismos bioquímicos de resistência foi determinada a atividade de peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), fenilalanina amônia-liases (FAL), quitinases (QUI),  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) e lipoxigenases (LOX), além da concentração de aldeído malônico (MDA). Para a cultivar BRS-229, a AACPB foi reduzida significativamente em 57, 35 e 61%, respectivamente, com a aplicação de AJ, ASM e ET em relação ao tratamento controle (água destilada). Houve redução significativa de 53, 35 e 59% na AACPB com a aplicação de AJ, ASM e ET nas plantas da cultivar BR 18 em relação ao tratamento controle. A aplicação de AJ, ASM e ET proporcionou uma redução de 69, 38 e 68%, respectivamente, no NL para a cultivar BRS-229 e de 63, 41 e 66% para a cultivar BR-18. O NL e a AACPB foram significativamente maiores com a aplicação de ASM em relação à aplicação de AJ e ET para as duas cultivares. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o PI e o TL nas duas cultivares Plantas pulverizadas com os

indutores apresentaram maiores atividades da POX, PFO, QUI, GLU e LOX em relação ao tratamento controle. Concluiu-se que a aplicação dos indutores AJ, ASM e ET aumentou a atividade das enzimas nas plantas de trigo durante o processo infeccioso de *P. oryzae* diminuindo, assim, a severidade da brusone. No segundo estudo, foi elaborada uma escala diagramática com dez níveis de severidade, a saber: 0,1; 1; 2; 4; 8; 16; 24; 32; 52; 72%. Para validar a escala, 10 avaliadores inexperientes estimaram a severidade da brusone. A acurácia e a precisão dos avaliadores foram analisadas pelo coeficiente de correlação concordante de Lin's ( $\rho_c$ ) e regressão linear simples entre a severidade real e a severidade estimada sem e com o uso da escala. A escala proporcionou satisfatória acurácia e precisão ( $R^2$  médio de 94,5%) com erros absolutos em torno de 15%. Os valores de  $u$ ,  $v$  e  $\rho_c$  foram melhorados em 90, 100 e 90% dos avaliadores, respectivamente, com o uso da escala. A reprodutibilidade entre os avaliadores utilizando a escala foi elevada ( $R^2$  superior a 0,90 para 64,4% dos casos). A escala obtida é adequada para estimar a severidade da brusone do trigo e pode ser utilizada em estudos onde faz-se necessário quantificar essa doença.

## ABSTRACT

RIOS, Jonas Alberto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Interaction induced resistance in wheat - *Pyricularia oryzae* and development of a standard area diagram to estimate severity of blast.** Adviser: Fabrício de Ávila Rodrigues.

The blast, caused by the fungus *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc., is a major disease affecting wheat (*Triticum aestivum* L.). This study aimed to investigate the effect of acibenzolar-S-methyl (ASM), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) in resistance of wheat in response to infection by *Pyricularia oryzae*, as well as develop and validate a diagrammatic scale to quantify the severity of wheat blast. In the first study, two experiments were conducted in a greenhouse in a completely randomized design with four treatments and four replications. Wheat plants of BRS-229 and BR-18 were grown in plastic pots with a capacity of 1 dm<sup>3</sup> of substrate. The treatments were: T1- distilled water (control), T2 - 0.1 mM jasmonic acid (JA), T3 - 300 mg / L acibenzolar-S-methyl (ASM) and T4 - 0.5 mM ethylene (ET) (Ethephon). We evaluated the components of resistance: incubation period (IP), number of lesions (NL) per cm<sup>2</sup> of leaf area, lesion size (TL) in mm and severity. The severity values were used to calculate area under the curve of the progress of blast (AACPB). To evaluate the effect of inducers on the biochemical mechanisms of resistance was determined the activity of peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia lyase (PAL), chitinase (CHI),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) and lipoxygenase (LOX), and the concentration of malondialdehyde (MDA). For BRS-229, the AACPB was significantly reduced in 57, 35 and 61%, respectively, with the application of AJ, ASM and ET in relation to the control (distilled water). Significant reduction of 53, 35 and 59% in AACPB with the application of AJ, and ET in ASM plants of cultivar BR 18 in relation to the control treatment. The application of AJ, ASM and ET was reduced by 69, 38 and 68% respectively for the NL BRS-229 and 63, 41 and 66% for BR-18. The NL and AACPB were significantly higher with the application of ASM in relation to the application of AJ and ET for the two cultivars. There was no significant difference between treatments for the PI and TL in both cultivars plants sprayed with inducers showed higher activities of POX, PPO, CHI, GLU and LOX relative to control. It was concluded that the application of the

inductors AJ, ASM and ET increased enzyme activities in wheat during the infectious process of *P. oryzae* thus reducing the severity of the blast. In the second study, a diagrammatic scale with ten levels of severity, namely 0.1, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 52, 72%. To validate the scale, 10 inexperienced appraisers estimated the severity of the blast. The accuracy and precision of the evaluators were analyzed by correlation coefficient concordant Lin's ( $\rho_c$ ) and simple linear regression between actual and estimated severity with and without the use of the scale. The scale provided satisfactory accuracy and precision (average  $R^2$  of 94.5%) with absolute errors of around 15%. The values of u, v and  $\rho_c$  were improved in 90, 100 and 90% of the evaluators respectively, using the scale. The reproducibility among raters using the scale was high ( $R^2$  greater than 90 for 64.4% of cases). The scale obtained is adequate to estimate the severity of the blast and wheat can be used in studies where it is necessary to quantify this disease.

**Capítulo 1**  
**Resistência Induzida na Interação Trigo-*Pyricularia oryzae***

## RESUMO

O presente trabalho objetivou investigar o efeito do acibenzolar-S-metil (ASM), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) na resistência do trigo à infecção por *Pyricularia oryzae*. Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 4 repetições. Plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 foram crescidas em vasos plásticos com capacidade de 1 dm<sup>3</sup> de substrato. Os tratamentos utilizados no experimento foram: T1- água destilada (testemunha), T2 - 0,1 mM de ácido jasmônico (AJ), T3 - 300 mg/L de acibenzolar-S-metil (ASM) e T4 - 0,5 mM de etileno (ET) (Ethephon). As plantas foram pulverizadas com os indutores 48 horas antes da inoculação. Foram avaliados os componentes de resistência: período de incubação (PI), número de lesões (NL) por cm<sup>2</sup> de área foliar, tamanho de lesão (TL) em mm e a severidade. Os valores de severidade foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do progresso da brusone (AACPB). Para avaliar o efeito dos indutores sobre os mecanismos bioquímicos de resistência foi determinado as atividades de peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), fenilalanina amônia-liases (FAL), quitinasas (QUI),  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) e lipoxigenases (LOX), além da concentração de aldeído malônico (MDA). Para a cultivar BRS-229, a AACPB foi reduzida significativamente em 57, 35 e 61%, respectivamente, com a aplicação de AJ, ASM e ET em relação ao tratamento controle (água destilada). Houve redução significativa de 53, 35 e 59% na AACPB com a aplicação de AJ, ASM e ET nas plantas da cultivar BR-18 em relação ao tratamento controle. Com a aplicação de AJ, ASM e ET, houve redução de 69, 38 e 68%, respectivamente, no NL para a cultivar BRS-229 e de 63, 41 e 66% para a cultivar BR-18. O NL e a AACPB foram significativamente maiores com a aplicação de ASM em relação à aplicação de AJ e ET para as duas cultivares. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o PI e o TL nas duas cultivares. Plantas pulverizadas com os indutores apresentaram maiores atividades da POX, PFO, QUI, GLU e LOX em relação ao tratamento controle. Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a aplicação dos indutores AJ, ASM e ET contribuirá para a indução de resistência em plantas de trigo quando infectadas por *P. oryzae*.

## INTRODUÇÃO

A cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) apresenta papel de destaque entre os cereais produzidos no Brasil, possuindo importante função econômica e social (Arruda et al., 2005). Entre os fatores que limitam a produtividade do trigo, as doenças possuem grande relevância. Dentre estas doenças, está a brusone do trigo, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc., sendo relatado perdas da ordem de 70% na produtividade dos grãos (Goulart e Paiva, 2000). O fungo pode infectar todos os órgãos aéreos das plantas, incluindo folhas, colmo e espigas (Reis e Forcelini, 1995). Nas folhas, os sintomas da brusone são manchas elípticas ou arredondadas com margem marrom escura e centro acinzentado (Reis e Forcelini, 1995). Os sintomas da brusone nas espigas são bem característicos, ocorrendo um branqueamento e morte dos tecidos acima do sítio de infecção, além do escurecimento do ráquis (Reis e Forcelini, 1995). Os danos causados por *P. oryzae* na produção de grãos de trigo são decorrentes do momento da infecção da espiga pelo fungo e do local onde acontece a sua penetração, podendo afetar a espiga parcial ou totalmente (Urashima et al., 2004). Como consequência da infecção na espiga por este fungo, não ocorre a passagem de nutrientes, ocasionando diminuição do tamanho dos grãos (Reis e Forcelini, 1995). Os grãos oriundos destas espigas possuem aspecto enrugado, pequenos, deformados e de baixo peso (Goulart e Paiva, 2000).

As condições favoráveis para a ocorrência da brusone são períodos chuvosos, temperaturas entre 24 e 28 °C, dias nublados e alta umidade relativa do ar (Bedendo e Prabhu, 1995). O controle químico na parte aérea tem apresentado baixa eficiência no controle da doença (Goulart e Paiva, 1993). Portanto, a procura por fontes de resistência tem sido alvo de pesquisas em programas de melhoramento genético, entretanto ainda não existem cultivares que apresentem níveis adequados e duradouros de resistência (Urashima et al., 2004; Urashima e Kato, 1994). Outras medidas de controle como o tratamento químico de sementes, rotação de culturas e eliminação de plantas voluntárias e de hospedeiros secundários auxiliam na redução do inóculo do patógeno (Bedendo e Prabhu, 2005).

A indução de resistência é um estado fisiológico das plantas de maior capacidade defensiva à infecção por patógenos, a qual é elicitada por estímulos específicos (Van Loon, 1998). Esta indução à patógenos pode ser dividida em

Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI), as quais são diferenciadas com base na natureza do elicitor e nas vias regulatórias envolvidas (Knoester et al., 1999). De maneira geral, na RSA é encontrado maior quantidade de proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas-PR) e a resposta é dependente do ácido salicílico (AS) (Knoester et al., 1999). Em contrapartida, na RSI não ocorre acúmulo de proteínas-PR, sendo o agente indutor um microrganismo não patogênico e a rota sinalizada pelo etileno (ET) e o ácido jasmônico (AJ) (Knoester et al., 1999). Segundo Hammerschmidt (2001) os termos ISR e SAR podem ser utilizados como sinônimos na proteção sistêmica de plantas contra patógenos. O AS, AJ e o ET são conhecidos por desempenharem um papel importante na regulação da defesa das plantas ao ataque por patógenos (Glazebrook, 2005). Existem muitos relatos de aumento de produção destes hormônios e ativação de distintos conjuntos de genes relacionados à defesa em resposta à infecção por patógenos (Maleck, 2000). A importância do AJ no processo de defesa de plantas a patógenos surgiu a partir da sua aplicação em solanáceas, desencadeando proteção local e sistêmica à infecção pelos patógenos (Cohen et al., 1993). Em um estudo utilizando o éster metil jasmonato (MeJA) em videira, verificou-se aumento nos níveis de quitinases, glucanases, estilbene sintase e fenilalanina amônia-liases (Belhadj et al., 2006). O ET está envolvido com a emergência de sementes, a senescência de folhas e flores, o amadurecimento e a abscisão de órgãos, e mais importantemente com as respostas das plantas em relação à estresses bióticos ou abióticos (Abeles, 1992). Aumento nos níveis endógenos do AS e seus conjugados em plantas inoculadas com patógenos está associado com a elevada expressão de genes de defesa que codificam proteínas-PR e a ativação da resistência das plantas (Shah, 1997).

Diante da baixa eficiência de fungicidas e ausência de cultivares com desejáveis níveis de resistência, a utilização de indutores de resistência surge como uma alternativa no controle da brusone do trigo. Assim, esse trabalho teve como objetivo investigar o efeito do acibenzolar-S-metil (ASM), AJ e ET na resistência do trigo à infecção por *P. oryzae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Crescimento das plantas de trigo:** Os experimentos foram conduzidos em vasos de plástico com capacidade para 1 dm<sup>3</sup> de substrato. O substrato comercial utilizado foi o Tropstrato<sup>®</sup> (Vida Verde, Mogi Mirim, São Paulo), a base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida. Para cada dm<sup>3</sup> de substrato foi adicionado 1,63 g de fosfato de cálcio monobásico. Em cada vaso semeou-se 10 sementes de trigo das cultivares BR-18 e BRS-229, suscetíveis à *P. oryzae*. Após a emergência, deixou-se sete plântulas por vaso. As plantas foram adubadas com solução nutritiva, adicionou-se 50 mL de solução nutritiva por vaso contendo, em mg L<sup>-1</sup>, 192 KCl; 104,42 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 150,35 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 61 uréia; 100 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,27 NH<sub>4</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4 H<sub>2</sub>O; 1,61 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 6,67 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,74 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 4,10 MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 4,08 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 5 EDTA-bisódico. Essa mesma solução foi utilizada na segunda e na terceira semana após emergência das plântulas.

**Aplicação dos indutores:** Os tratamentos utilizados no experimento foram: T1 - água destilada (controle), T2 - 0,1 mM de ácido jasmônico (AJ) (Sigma-Aldrich, São Paulo), T3 - 300 mg/L de acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion<sup>®</sup>, Syngenta, São Paulo) e T4 - 0,5 mM de etileno (ET) (Ethepon, Sigma-Aldrich, São Paulo). As plantas foram pulverizadas com água e os indutores às 48 horas antes da inoculação com *P. oryzae* com atomizador manual. A aplicação dos indutores foi realizada em câmaras fechadas e independentes. Após a aplicação dos indutores, as plantas permaneceram nas câmaras fechadas por um período de 6 horas.

**Inoculação das plantas com *P. oryzae*:** O isolado monospórico de *P. oryzae* (UFV/DFP-01) foi obtido de espigas de trigo da cultivar BR-18 em Viçosa-MG. O isolado foi preservado pelo método do papel-filtro (Gonçalves et al., 2007) dentro de microtubos de plástico contendo sílica gel e armazenado a 4 °C. O isolado foi reativado em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, o fungo foi inoculado em plantas de trigo para verificar a sua patogenicidade. Fragmentos de folhas de plantas com sintomas da brusone foram transferidas para meio aveia-ágar (aveia 60 g/L e ágar 17 g/L) e mantidas sob temperatura de 25 °C e luminosidade constante por 10 dias. As placas de Petri foram lavadas com 10 mL de água destilada esterilizada contendo gelatina 1% (p/v) e com auxílio de um pincel de cerdas macias foi realizada a raspagem superficial do micélio para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze para eliminação de fragmentos de micélio e meio

de cultura. Após a filtragem, a concentração da suspensão foi ajustada para  $10^5$  conídios/mL por meio de contagens em hemacitômetro.

Plantas no estágio de crescimento 19 (45 dias após emergência) de acordo com Zadoks (1974) foram inoculadas, em ambas as faces da folha, pulverizando 25 mL de suspensão de conídios por planta, utilizando o atomizador De Vilbiss n° 15. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos de polietileno molhados e transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de  $25 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $95 \pm 2\%$ , onde permaneceram por 24 h no escuro. Após esse período, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com umidade relativa de  $85 \pm 5\%$  e temperatura de  $20 \pm 5$  °C, onde permaneceram até o final das avaliações.

**Quantificação dos componentes de resistência:** O período de incubação (PI), o número de lesões (NL) por  $\text{cm}^2$  de área foliar, o tamanho de lesão (TL) e a severidade da brusone foram avaliados na quarta, quinta e sexta folhas de cada planta. O PI foi avaliado a cada 6 horas a partir das 24 horas após inoculação (hai). Às 96 hai, foi realizada a contagem do NL por  $\text{cm}^2$  de área foliar, em um total de três amostragens em cada folha. O TL, em mm, foi medido com auxílio de um paquímetro eletrônico digital (Worker, USA) às 96 hai. Três lesões em três folhas de cada planta foram selecionadas aleatoriamente para realização das medições. A severidade da brusone foi avaliada a partir do PI às 72, 96, 120 e 144hai utilizando-se uma escala baseada na porcentagem de área doente na folha (Nottingham, 1981). A área abaixo da curva do progresso da brusone (AACPB) para cada planta foi calculada utilizando-se a integração trapezoidal da curva de progresso da brusone sobre o tempo de acordo com Shaner e Finney (1997).

**Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA):** As folhas de plantas em cada tratamento foram coletadas às 48, 72, 96 e 120 hai, as plantas não inoculadas com *P. oryzae* serviram como controle (0 h). As amostras foram armazenadas individualmente em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a  $-80$  °C para posterior análise. A quantificação da concentração de MDA foi realizada conforme descrito por Cakmak e Host (1991). As amostras foram pesadas e, em seguida, homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA), 0,1% (p/v). O extrato bruto foi centrifugado a  $10000 \times g$  por 15 min. Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  do

sobrenadante será adicionada a um tubo de microcentrífuga contendo 750 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em TCA 20% e, em seguida, incubado por 120 min a 90 °C, sob agitação. A reação foi interrompida em gelo. Logo após foi realizada centrifugação a 13000 × g durante 4 min. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação da concentração de MDA, procedendo-se à leitura da absorbância das amostras a 540 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

**Determinação da atividade de peroxidases (POX, EC1. 11.1.7), polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1), fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5), quitinases (QUI, 3.2.1.14), β-1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.39) e lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12):** Amostras de folhas de plantas em cada tratamento foram coletadas às 48, 72, 96 e 120 hai, sendo que as plantas não inoculadas com *P. oryzae* serviram como controle (0 h). Estas foram armazenadas individualmente em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para posterior análise.

Para obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas POX, PFO, FAL, GLU e QUI amostras de 0,3 g de tecido foliar foram maceradas com N<sub>2</sub> líquido em almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) e 0,1 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O homogeneizado foi centrifugado a 20000×g por 25 min a 4 °C e os sobrenadantes foram usados para as determinações enzimáticas.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol de acordo com a metodologia de Kar e Miashra (1976). Uma mistura de 950 µL de água destilada, 750 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 600 µL de pirogalol e 600 µL de peróxido de hidrogênio 100 mM foi adicionada a 10 µL do extrato. A absorbância foi medida a 420 nm em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a cada 10 seg durante 1 min após adição do extrato à mistura totalizando cinco leituras. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da POX (Chance e Maehley, 1955), a qual foi expressa em mmol de purpurogalina produzida por min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína. Durante todo o processo, os tubos de microcentrífuga foram cobertos com papel alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz. A atividade da PFO foi

determinada a semelhança da POX, exceto que o peróxido de hidrogênio não foi usado na mistura.

Para a FAL, a reação foi iniciada após a adição de 0,5 mL do extrato a uma mistura contendo 2 mL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 1 mL 100 mM de *L*-fenilalanina. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30 °C durante 3 h. Nas amostras controle, o extrato foi substituído por 1 mL do tampão Tris- HCl. A reação foi finalizada pela adição de 60 µL de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido *trans*-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de  $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Zucker, 1965) foi usado para calcular a atividade da FAL, a qual foi expressa em  $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da GLU foi determinada conforme descrito por Lever (1972) com modificações. A reação foi iniciada pela adição de alíquotas de 20 µL do sobrenadante a uma mistura composta de 230 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 250 µL do substrato laminarina (Sigma-Aldrich, São Paulo) na concentração de 4 mg/mL. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 45°C por 30 min. Após o período de incubação, determinou-se a quantidade de açúcares redutores através da adição de 250 µL ácido dinitrosalicílico a mistura, em seguida, da sua incubação em banho-maria por 15 min a 100 °C. A reação foi interrompida pelo resfriamento das amostras em banho de gelo até a temperatura de 30 °C. Nas amostras controle, a mistura de reação foi igual, exceto que o extrato vegetal foi adicionado após o aquecimento da mistura a 100 °C. A absorbância do produto liberado pela GLU foi medida a 540 nm e a atividade da GLU foi expressa em unidades de absorbância  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da QUI foi determinada pelo método de Robert e Selitrennikoff (1988) modificado por Harman et al. (1993). A reação foi iniciada pela adição de alíquotas de 20 µL do sobrenadante a uma mistura composta de 480 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 20 µL do substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-N'-diacetilquitobiose (Sigma-Aldrich, São Paulo) na concentração de 2 mg/mL. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 h. A reação foi interrompida com adição de 500 µL de 0,2 M de carbonato de sódio. Nas amostras controle, apenas o carbonato de sódio foi adicionado depois da adição do extrato à mistura de reação e as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 2 h. A absorbância do produto final liberado pela QUI foi determinada a 410 nm. O coeficiente de extinção molar de  $7 \times 10^4 \text{ mM cm}^{-1}$  foi usado para calcular a atividade

da QUI, a qual foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenil produzido por  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

O extrato para determinação enzimática da LOX, 0,2 g de tecido foliar foi macerado com  $\text{N}_2$  líquido em almofariz. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,8) contendo Triton-X 1% (v/v) e 1% de PVP. O homogeneizado foi centrifugado a  $15.000 \times g$  por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado como extrato para determinação da atividade da LOX. A reação foi iniciada após adição de 5  $\mu\text{L}$  do extrato à uma mistura contendo 780  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e 15  $\mu\text{L}$  do substrato linoleato de sódio 10 mM. A atividade da LOX foi determinada conforme metodologia descrita por Axelrod et al. (1981). A absorvância do produto liberado pela LOX foi medida em espectrofotômetro a 234 nm. O coeficiente de extinção molar de  $25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi usado para determinar a atividade da LOX, a qual foi expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

**Delineamento experimental e análise estatística dos dados:** Dois experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 com quatro tratamentos e quatro repetições. Os fatores estudados foram os indutores ASM, AJ e ET e as duas cultivares. Cada unidade experimental correspondeu a um vaso plástico contendo sete plantas de trigo. Os dados do PI, NL, TL e AACPB dos dois experimentos foram combinados para análise estatística após determinação da homogeneidade de variância e quadrado médio do resíduo (Gomes e Garcia, 2002). Apenas um experimento foi realizado para as avaliações bioquímicas. Os dados das atividades da POX, PFO, FAL, GLU, QUI, LOX e concentração de MDA foram submetidas à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) utilizando-se o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## RESULTADOS

**Componentes de resistência:** Houve efeito significativo dos fatores cultivares e indutores apenas para a AACPB, NL e PI (Tabela 1) e da interação cultivares × indutores somente para o NL (Tabela 1). Para a cultivar BRS-229, a AACPB foi reduzida significativamente em 57, 35 e 61%, respectivamente, com a aplicação de AJ, ASM e ET em relação ao tratamento controle (água destilada)(Tabela 2). Houve redução significativa de 53, 35 e 59% na AACPB com a aplicação de AJ, ASM e ET nas plantas da cultivar BR-18 em relação ao tratamento controle (Tabela 2). Com a aplicação de AJ, ASM e ET houve redução de 69, 38 e 68% respectivamente no NL para a cultivar BRS-229 e de 63, 41 e 66% para a cultivar BR-18. O NL e a AACPB e o NL foram significativamente maiores com a aplicação de ASM em relação a aplicação de AJ e ET para as duas cultivares (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o PI e o TL nas duas cultivares (Tabela 2).

**Atividade das enzimas de defesa e MDA:** O efeito do fator indutor não foi significativo somente para GLU e QUI (Tabela 3). Para o fator épocas de coleta o efeito não foi significativo somente para QUI (Tabela 3). O fator cultivar foi significativo somente para as atividades da POX, PFO e QUI. Os efeitos dos fatores cultivares, indutores e época de coleta foram significativos para a atividade da LOX (Tabela 4). Os efeitos para algumas interações com dois e três fatores também foram significativos (Tabela 3,4).

A concentração de MDA nas plantas com aplicação de ASM foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos às 0, 72, 96 e 120 hai para a cultivar BRS-229 e às 0, 48, 72 e 96 hai para a cultivar BR-18 (Tabela 5). Para a cultivar BR-18, a concentração de MDA para o tratamento ASM não diferiu do tratamento controle às 120 hai (Tabela 5).

Para a cultivar BRS-229, não houve diferença significativa entre os tratamentos na atividade da POX às 96 hai (Tabela 6). Não houve diferença estatística na atividade desta enzima com a aplicação de AJ, ASM e ET às 0, 48 e 72 hai. Contudo, a atividade da POX com a aplicação de AJ às 0 hai, AJ e ET às 48 hai, ET e ASM às 72 hai aumentou significativamente em relação ao tratamento controle. Às 120 hai, a atividade da POX com a aplicação de ET foi significativamente superior em relação aos demais tratamentos. A atividade da POX com aplicação de AJ e ASM às 120 hai foi significativamente inferior ao tratamento controle (Tabela

6). Para a cultivar BR-18, não houve diferença significativa entre os tratamentos na atividade da POX às 0, 48 e 96 hai (Tabela 6). Às 72 hai, não foram observadas diferenças entre os indutores na atividade da POX. No entanto, a atividade da POX com a aplicação de AJ e ET foi significativamente maior em relação ao tratamento controle. Não houve diferença significativa na atividade da POX com aplicação de AJ, ASM e ET em relação ao tratamento controle às 120 hai (Tabela 6).

Para a cultivar BRS-229, não houve diferença significativa na atividade da PFO entre os tratamentos às 0, 48 e 120 hai (Tabela 7). A atividade da PFO com a aplicação do ET foi estatisticamente superior aos tratamentos controle e AJ às 72 hai, porém não diferiram do ASM. Às 96 hai, a atividade da PFO com aplicação do AJ foi significativamente maior em relação ao tratamento controle e ASM, porém não houve diferença em relação ao ET (Tabela 7). Para a cultivar BR-18, não houve diferença estatística entre os tratamentos na atividade da PFO em plantas não inoculadas (0 h) e entre os tratamentos AJ, ASM e ET às 48, 72 e 96 hai. Contudo, houve diferença significativa da aplicação de AJ e ASM, do AJ, ASM e ET e do ET, respectivamente, às 48, 72 e 96 hai em relação ao tratamento controle. Às 120 hai, a atividade da PFO foi significativamente superior com a aplicação do AJ, ASM e ET em relação ao tratamento controle, porém a maior atividade foi observada no tratamento com a aplicação de ASM e AJ (Tabela 7).

Para a cultivar BRS-229, não houve diferença significativa entre os tratamentos na atividade da FAL às 120 hai (Tabela 8). A atividade da FAL nas plantas não inoculadas (0 h) foi significativamente superior com aplicação de ET em relação aos demais tratamentos. Às 48 hai, a atividade da FAL nas plantas do tratamento controle foi significativamente maior em relação a atividade nas plantas pulverizadas com AJ, ASM e ET. Não houve diferença significativa na atividade da FAL nas plantas pulverizadas com os indutores às 72 e 96 hai. No entanto, a atividade da FAL com aplicação do ASM às 72 hai e do ASM e ET às 96 hai foi significativamente menor em relação ao tratamento controle (Tabela 8). Para a cultivar BR-18, não houve diferença significativa na atividade da FAL entre os tratamentos às 48 e 120 hai. Às 0, 72 e 96 hai, a atividade da FAL nas plantas do tratamento controle juntamente com ET às 0 h, AJ e ET às 72 hai e AJ às 96 hai, foi superior em relação aos demais tratamentos (Tabela 8).

Na cultivar BRS-229, não houve diferença significativa na atividade da QUI entre os tratamentos às 0, 96 e 120 hai. Às 48 hai, a atividade da QUI nas plantas

pulverizadas com AJ foi significativamente maior em relação ao ASM e ET. Às 72 hai, entretanto, a atividade da QUI nas plantas com aplicação de ASM e ET foi estatisticamente maior em relação a aplicação do AJ. A atividade da QUI nas plantas pulverizadas com AJ às 48 hai e ASM e ET às 72 hai não diferiu significativamente em relação ao tratamento controle (Tabela 9). Para a cultivar BR-18, a atividade da QUI nas plantas pulverizadas com ET foi significativamente maior em relação aos tratamentos AJ e controle às 0 h, controle às 72 hai e ASM e controle às 120 hai. Às 48 hai, a atividade da QUI nas plantas pulverizadas com AJ foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos (Tabela 9).

Para a cultivar BRS-229, não houve diferença significativa entre os tratamentos na atividade da GLU às 48 e 96 hai (Tabela 10). A atividade da GLU nas plantas não inoculadas (0 h) foi significativamente maior com a aplicação de AJ e ASM em relação aos demais tratamentos (Tabela 10). Às 72 hai, a atividade da GLU com aplicação de ET foi significativamente superior em relação aos tratamentos AJ e controle. A atividade da GLU com a aplicação do ASM não diferiu dos demais tratamentos às 72 hai. Não houve diferença significativa na atividade da GLU com a aplicação do AJ, ASM e ET às 120 hai. Contudo, a atividade da GLU com a aplicação de AJ e ET foi significativamente maior em relação ao tratamento controle (Tabela 10). Para a cultivar BR-18, não houve diferença estatística na atividade da GLU entre os indutores às 0, 48 e 120 hai. A atividade da GLU com a aplicação do ASM e ET às 72 hai e com o AJ às 96 hai foi significativamente maior em relação ao tratamento controle (Tabela 10).

Para a cultivar BR-18, a atividade da LOX nas plantas pulverizadas com ET e AJ foi significativamente maior do que nas plantas do controle às 48 e 72 hai. Não houve diferença significativa quanto a atividade da LOX nas plantas pulverizadas com ET e AJ às 96 e 120 hai. No entanto, a atividade da LOX para o tratamento ET às 96 hai e AJ às 120 hai foi significativamente maior em relação ao tratamento controle ( Figura 1A). Para a cultivar BRS-229, a atividade da LOX nas plantas que receberam a aplicação de AJ aumentou de 0 às 96 hai (Figura 1B). Somente às 96 hai, a atividade da LOX foi significativamente maior em relação aos tratamentos controle e ET. Não houve diferença significativa quanto a atividade da LOX nas plantas pulverizadas com aplicação de ET e AJ às 120 hai, contudo a atividade da LOX nas plantas pulverizadas com ET foi significativamente maior em relação às plantas do tratamento controle(figura 1B).

## DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito dos indutores AJ, ASM e ET nos componentes de resistência do trigo à brusone e na ativação de mecanismos bioquímicos de defesa. Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência desses indutores no aumento da resistência das plantas ao ataque de patógenos, bem como na ativação das enzimas de defesa. Entretanto para o patossistema trigo-*Pyricularia oryzae* ainda não foi estudado o efeito destes indutores sobre a doença.

A aplicação de AJ, ASM e ET foi eficiente em reduzir o NL e a AACPB nas plantas das duas cultivares estudadas. O AJ e o ET apresentaram maior eficiência em relação ao ASM em reduzir os sintomas da brusone em associação com um aumento da atividade das enzimas POX, PFO, QUI, GLU e LOX. De acordo com Mandal et al. (2006), a aplicação de AJ reduziu os sintomas da cárie do trigo, causada por *Tilletia indica*, devido a um balanço entre proteases e inibidores de proteases, além de uma maior lignificação dos tecidos. A aplicação foliar de metil jasmonato foi eficiente em reduzir a severidade da ferrugem do trigo, causada por *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, além do aumento nas atividades da POX e QUI e na concentração de compostos fenólicos (Haggag e Abd-El-Kareem, 2009). A aplicação de AJ também foi eficiente em reduzir os sintomas causados por *Fusarium oxysporum* f.sp. *fabae* em feijão fava (Ahmed et al. 2002). A aplicação de AJ foi eficiente em reduzir a infecção por *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* em plantas de cevada (Schweizer et al., 1993). Maiores concentrações de ET podem ativar as respostas de percepção das plantas ao ataque por patógenos e induzir respostas de defesa (Boller, 1991). O ET possui um importante papel em aumentar a resistência das plantas às doenças podendo induzir a formação de fitoalexinas, lignina e outros compostos fenólicos, assim como aumentar a atividade de QUI, FAL e POX (Khoel et al., 2002). A aplicação de ethephon reduziu os sintomas do míldio pulverulento em videira (Belhadj et al., 2008).

A eficiência do ASM na indução das respostas de defesa em plantas tem sido investigada em vários patossistemas. O pré-tratamento de plantas de pepino com ASM aumentou a resistência ao fungo *Colletotrichum orbiculare*, causador da antracnose (Cools e Ishii, 2002). Em trabalho posterior envolvendo esse mesmo patossistema, Lin e Ishii.(2009) verificaram aumento na concentração do ácido

chiquímico e peróxido de hidrogênio. O pré-tratamento de pereiras com ASM reduziu os sintomas da sarna, causada por *Venturia nashicola*, devido ao aumento na atividade da FAL e QUI (Faize et al., 2004). Vechet et al. (2009) estudando o efeito de vários indutores de resistência, verificou que o AS foi efetivo em reduzir a severidade do míldio pulverulento, causado por *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, em trigo.

O AJ, AS e ET estão envolvidos na sinalização de rotas responsáveis pela indução de resistência (Dong, 1998). As POX estão relacionadas ao processo de proteção antioxidativa catalisando a oxidação de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio, além do aumento na síntese de lignina fortalecendo a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas pelos patógenos (Kvaratskhelia et al., 1997). Segundo Higara et al. (2001), além da síntese de lignina as POX estão envolvidas na produção de fitoalexinas e espécies reativas de oxigênio. Houve maior atividade da POX no estágio inicial e mais avançado do processo infeccioso de *P. oryzae* nas plantas da cultivar BRS-229 pulverizadas com ASM e às 72 hai para as plantas da cultivar BR-18. Houve uma maior atividade da POX às 120 hai em plantas da cultivar BRS-229 com aplicação de AJ, ASM e ET e para as plantas da cultivar BR-18 com aplicação de AJ e ET. Maiores atividades da POX no estágio inicial e mais avançado do processo infeccioso *P. oryzae* foram importantes no aumento da resistência do trigo. Em estudos envolvendo a resistência do trigo a brusone mediada pelo silício, foi encontrado aumento na atividade da POX na fase final de desenvolvimento do patógeno (Xavier Filha et al., 2011).

A PFO é importante na fase inicial de defesa das plantas onde danos as membranas provoca a liberação de compostos fenólicos (Campbell e Sederoff, 1996). Esta enzima participa na oxidação de muitos compostos fenólicos levando a produção de quinonas que são tóxicas à diversos patógenos (Campbell e Sederoff, 1996). Foi observado aumento na atividade da PFO em plantas da cultivar BRS-229 com aplicação de ET às 72 hai e AJ às 96 hai. Para cultivar BR-18, maior atividade da PFO nas plantas com aplicação de ET, AJ e ASM ocorreu durante todo o processo infeccioso de *P. oryzae*. Assim como a POX, a PFO foi importante na defesa do trigo à brusone. Resultados semelhantes foram encontrados por Ngadze et al. (2011), os quais relataram que a resistência da batata à *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e *Dickeya spp.* foi correlacionada com o aumento na atividade da PFO e FAL.

A QUI e a GLU catalisam a hidrólise da quitina e da  $\beta$ -1,3-glucano (Keen e Yoshikawa, 1983). Após a infecção pelos patógenos ocorre um significativo aumento na atividade dessas enzimas reduzindo o crescimento desses patógenos, além da possível liberação de oligossacarídeos que elicitam respostas de defesa (Keen e Yoshikawa, 1983). A atividade da GLU aumentou nas plantas pulverizadas com AJ, ASM e ET, sugerindo um papel importante desta enzima na resistência do trigo à infecção por *P. oryzae*. Maior atividade da GLU foi observado nas plantas da cultivar BRS-229 pulverizadas com ASM e AJ às 0 h AJ às 120 hai e com ET às 72 e 120 hai. Houve aumento na atividade da GLU em plantas da cultivar BR-18 pulverizadas com ASM e ET às 72 hai e com AJ às 96 hai. Em estudo realizado por Xue et al. (1998), as enzimas GLU e POX foram positivamente correlacionados com indução de resistência em plantas de feijão contra *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum lindemuthianum*. Neste trabalho, a QUI teve sua atividade aumentada principalmente nas plantas pulverizadas com ET. Xavier Filha et al. (2011) também observaram aumento na atividade da QUI em plantas de trigo infectadas por *P. oryzae*.

A FAL catalisa a desaminação do aminoácido *L*-fenilalanina com a formação de ácido *trans*-cinâmico, ao qual é o precursor de vários compostos fenólicos e fitoalexinas na rota dos fenilpropanóides, sendo a lignina sendo o produto final (Campbell e Sederoff, 1996). Neste estudo, os indutores utilizados não promoveram aumento da atividade da FAL.

A primeira enzima na via biosintética do AJ é a LOX (Alami et al., 1999). A atividade desta enzima está associada com o metabolismo dos lipídeos e durante a peroxidação de lipídeos pode ocorrer a ativação de respostas de defesa em plantas, incluindo inibição direta do patógeno e acumulação de fitoalexinas (Alami et al., 1999). Verificou-se maior atividade da LOX nas plantas da cultivar BRS-229 pulverizadas com AJ, principalmente a partir das 96 hai. Nas plantas da cultivar BR-18 pulverizadas com AJ e ET, a atividade da LOX foi maior às 48 hai.

O aumento nos níveis de peroxidação de lipídeos na membrana plasmática, indicado pelo aumento na concentração de MDA, está relacionado ao nível de stress oxidativo a nível celular (Fu e Huang, 2001). Neste trabalho, a concentração de MDA foi maior nas plantas das duas cultivares que receberam a aplicação de ASM em relação aos demais tratamentos nas duas cultivares. Esta maior concentração se deve ao amarelecimento das plantas pulverizadas com ASM após a manutenção destas em câmara escura após a inoculação. A concentração de MDA foi maior nas

plantas do tratamento controle às 120 hai, coincidindo com o período de maior severidade da brusone. Uma reduzida peroxidação lipídica na membrana plasmática pode estar associada a maior atividade da POX, como verificado nas plantas das duas cultivares pulverizadas com AJ e ET.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a aplicação dos indutores AJ, ASM e ET aumentaram a atividade das enzimas POX, PFO, QUI, GLU e LOX nas plantas de trigo quando infectadas por *P. oryzae*, diminuindo, assim, os sintomas da brusone.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles FB, Morgan P, Salveit M. (1992) Roles and physiological effects of ethylene in plant physiology: dormancy, growth and development. In: Abeles FB, Morgan P, Salveit M (eds). *Ethylene in Plant Biology*. San Diego, Academic Press, pp. 120-176.
- Ahmed HFS, El-Araby MM, Omar SA. (2002) Differential effect of jasmonic acid in the defense of faba bean against *Fusarium Wilt*: modulation of other phytohormones and simple phenols. *International Journal of Agriculture & Biology* **4**:447-453.
- Alami I, Jouy N, Clerivet A. (1999) The lipoxygenase pathway is involved in elicitor- induced phytoalexin accumulation in plane tree (*Platanus acerifolia*) cell-suspension cultures. *Journal of Phytopathology* **147**:515-519.
- Arruda MA, Bueno CRNC, Zamprogno KC, Lavorenti N, Urashima AS. (2005) Reação do trigo à *Magnaporthe grisea* nos diferentes estádios de desenvolvimento. *Fitopatologia Brasileira* **30**:121-126.
- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laasko S. (1981) Lipoxygenases from soybeans. *Methods in Enzymology* **71**:441-451.
- Belhadj A, Saigne C, Telef N, Cluzet S. (2006) Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:9119-9125.
- Belhadj A, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costed MF, Mérillon JM. (2008) Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:5781-5787.
- Bedendo IP, Prabhu AS. (1995) Doenças do arroz. In: Kimati H, Amorim L, Resende JAM, Bergamim Filho A, Camargo LEA. (eds) *Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas*. São Paulo, Agronômica Ceres, pp. 331-341.
- Boller T. (1991) Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Mattoo, AK, Suttle, JC (eds) *The plant hormone ethylene*. Boca Raton, CRC Press, pp. 293-314,
- Bradford MN. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Campbell MM, Sederoff RR. (1996) Variation in lignin content and composition. *Plant Physiology* **110**:3-13.
- Chance B, Maehley AC. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* **2**:764-775.

- Cakmak L, Host WJ. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activity in root tip of soybean (*Glicine max*). *Plant Physiology* **83**:463-468.
- Cohen Y, Gisi U, Niderman T. (1993) Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* **83**:1054-1062.
- Cools HJ, Ishii H. (2002) Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL 1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**:273-280.
- Cruz MF, Maciel JLN, Prestes AM, Bombonato EAS, Pereira JF, Consoli L. (2009) Caracterização genética e fenotípica de isolados de *Pyricularia grisea* do trigo. *Tropical Plant Pathology* **34**:393-401.
- Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MV, Pereira SC. (2011) Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice- *Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology* **101**:92-104.
- Dong X. (1998) AS, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**:316-323.
- Faize M, Faize L, Koike N, Ishizaka M, Ishii H. (2004) Acibenzolar-s-methyl-induced resistance to japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. *Genetics and Resistance* **94**:604-612.
- Fu J, Huang B. (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental Experimental Botany* **45**:105-114.
- Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**:205-227.
- Gomes FP, Garcia CH. (2002) Análise de grupos de experimentos In: Gomes FP, Garcia CH. (eds), Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais. Piracicaba, Fealq pp. 169-191.
- Gonçalves RC, Alfenas AC, Mafia RC. (2007) Armazenamento de microorganismos com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas AC, Mafia RC. (eds) Métodos em Firopatologia. Viçosa, UFV pp. 92-102.

- Goulart ACP, Paiva F. (1993) Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*). *Fitopatologia Brasileira* **18**:167-173.
- Goulart ACP, Paiva FA. (2000) Perdas no rendimento de grãos de trigo causadas por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. *Summa Phytopathologica* **26**:184-189.
- Haggag WM, Abd-El-Kareem F. (2009) Methyl jasmonate stimulates polyamines biosynthesis and resistance against leaf rust in wheat plants. *Archives of Phyttopathology and Plant Protection* **42**:16-31.
- Hammerschmidt R, Métrauz JP, Van Loon LC. (2001) Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on induced resistance to plant diseases, corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology* **107**:1-6.
- Harman GE, Hayes CK, Lorito M, Broadway RM, Di Pietro A, Peterbauer C, Tronsmo A. (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* **83**:313-318.
- Higara S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* **42**:462-468.
- Kar M, Miashra D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**:315-319.
- Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RNF. (1997) Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology* **114**:1237-1245.
- Keen NT, Yoshikawa M. (1983)  $\beta$ -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiology* **71**:460-465.
- Koehl J, Djulic A, Kirner V, Nguyen TT, Heiser L. (2002) Ethylene is required for elicitation-induced oxidative burst but not for cell death induction in tobacco cell suspension cultures. *Journal of Plant Physiology* **129**:1555-1563.
- Knoester M, Pieterse CMJ, Bol JF, Van Loon LC. (1999) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbiology Interaction* **12**:720-727.
- Lever M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* **47**:273-279.

- Lin TC, Ishii H. (2009) Accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in xylem fluids of cucumber stems during ASM-induced systemic acquired resistance (SAR) involves increased LOX activity and transient accumulation of shikimic acid. *European Journal of Plant Pathology*. **125**:119-130.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME. (2002). Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental Experimental Botany* **47**:239-247.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schimid J, Lawton KA. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* **26**:403-10.
- Mandal KM, Pandey D, Purwar S, Singh US, Kumar A. (2006) Influence of jasmonic acid as potential activator of induced resistance against karnal bunt in developing spikes of wheat. *Journal Bioscience* **31**:607-616.
- Ngadze E, Icishahayo D, Coutinho TA, van der Waals JE. (2011). The role polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and total soluble phenols in the resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease* **96**:186-192.
- Reis EM, Forcelini CA. (1995) Controle cultural. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L. (eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos. São Paulo, Agronômica Ceres, pp. 710-716.
- Roberts WK, Selitrennikoff CP. (1988) Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* **134**:169-176.
- Schweizer P, Gees R, Mosinger E. (1993) .Effect of jasmonic acid on the interaction of barley(*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Plant Physiology* **102**:503-511.
- Shaner G, Finney RF. (1997). The effects of nitrogen fertilization on the expression of show-mildwing in knox wheat. *Phytopathology* **67**:1051-1055.
- Silva RV, Oliveira RDL, Nascimento KJT, Rodrigues FA. (2010). Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicon. *Plant Pathology* **59**:586-593.
- Shah J, Tsui F, Klessig DF. (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai 1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the AS-inducible expression of the tms2 gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**:69-78.

- Statistical Analysis System. (2003) SAS: Statistical analysis system-getting started with the SAS Learning Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Urashima AS, Kato H. (1994) Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. *Summa Phytopathologica* **20**:107-112.
- Urashima AS, Lavorenti NA, Goulart ACP, Mehta YR. (2004) Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **29**:511-518.
- Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopatology* **36**:453-483.
- Vechet L, Burketova L, Sindelarova M. (2009). A comparative study of the efficiency of several sources of induced resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) in wheat under field conditions. *Crop Protection* **28**:151-154.
- Xavier Filha MS, Rodrigues FA, Domiciano GP, Oliveira HV, Silveira PR, Moreira WR. (2011) Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology* **40**:28-38.
- Xue L, Charest PM, Jabaji-Hare H. (1998) Systemic induction of peroxidases, 1,3- $\beta$ -glucanases, chitinases , and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Biological Control* **88**:359-365.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* **14**:415-421.
- Zucker M. (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology* **40**:779-784.

## TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1.** Análise de variância dos efeitos de cultivares e indutores no período de incubação (PI), número de lesões (NL) por cm<sup>2</sup> de área foliar, tamanho de lesões (TL) e área abaixo da curva do progresso da brusone (AACPB).

Causas de Variação	Valores de <i>F</i>				
	gl	PI (h)	NL	TL (mm)	AACPB
Cultivares (C)	1	6,87 <sup>*</sup>	31,20 <sup>**</sup>	84,00 <sup>ns</sup>	4,39 <sup>*</sup>
Indutores (I)	3	6,70 <sup>*</sup>	98,68 <sup>**</sup>	14,10 <sup>ns</sup>	472,80 <sup>**</sup>
C×I	3	0,53 <sup>ns</sup>	4,51 <sup>*</sup>	7,70 <sup>ns</sup>	1,56 <sup>ns</sup>

Níveis de probabilidade: <sup>ns</sup> = não significativo, \* = 0,05, \*\* = 0,01.

1 **Tabela 2.** Período de incubação (PI), número de lesão (NL) por cm<sup>2</sup> de área foliar, tamanho de lesões (TL) e área abaixo da curva do progresso  
 2 da brusone (AACPB) em plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 pulverizadas com água destilada, indutores ácido jasmônico (AJ),  
 3 acibenzolar-S-metil (ASM) e etileno (ET) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*.

Tratamentos	BRS-229				BR-18			
	PI (h)	NL	TL (mm)	AACPB	PI (h)	NL	TL (mm)	AACPB
Água destilada	66,93 A	25,35 a	1,94 a	859,50 a	60,56 a	18,07 a	1,69 a	809,01 a
AJ	66,75 A	7,68 c	1,65 a	371,63 c	62,43 a	6,70 c	1,49 a	378,79 c
ASM	65,06 A	15,81 b	1,45 a	561,00 b	61,31 a	10,72 b	1,65 a	524,55 b
ET	64,87 A	8,03 c	1,46 a	337,80 c	63,06 a	6,11 c	1,55 a	329,60 c
C.V. (%)	5,08	21,53	32,33	8,62	3,70	25,16	24,05	7,81

4 Médias dentro de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C.V.= coeficiente de  
 5 variação.

6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

1 **Tabela 3.** Análise de variância dos efeitos de cultivares, indutores e épocas de coleta  
 2 para a concentração de aldeído malônico (MDA) e atividade das enzimas peroxidases  
 3 (POX), polifenoloxidasas (PFO), fenilalanina amônia-liases (FAL) quitinasas (QUI) e  
 4  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU).

Causas de Variação	Valores de <i>F</i>						
	gl	MDA	POX	PFO	FAL	QUI	GLU
Cultivares (C)	1	0,09 <sup>ns</sup>	6,69*	24,37 <sup>**</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	167,45 <sup>**</sup>	1,39 <sup>ns</sup>
Indutores (I)	3	62,05 <sup>**</sup>	3,74*	10,15 <sup>**</sup>	4,22 <sup>**</sup>	0,81 <sup>ns</sup>	2,49 <sup>ns</sup>
Épocas de coleta (EC)	4	5,40 <sup>**</sup>	130,84 <sup>**</sup>	23,90 <sup>**</sup>	37,05 <sup>**</sup>	1,32 <sup>ns</sup>	46,63 <sup>**</sup>
C × I	3	0,87 <sup>ns</sup>	2,73*	0,51 <sup>ns</sup>	0,52 <sup>ns</sup>	0,89 <sup>ns</sup>	0,80 <sup>ns</sup>
C × EC	3	2,67 <sup>ns</sup>	6,11 <sup>**</sup>	3,65*	3,01*	1,09 <sup>ns</sup>	4,27*
I × EC	12	2,46*	3,25 <sup>**</sup>	1,02 <sup>ns</sup>	0,69 <sup>ns</sup>	1,86*	2,07*
C × I × EC	9	0,48 <sup>ns</sup>	3,38 <sup>**</sup>	1,88 <sup>ns</sup>	0,54 <sup>ns</sup>	1,26 <sup>ns</sup>	2,43*

5 Níveis de probabilidade: <sup>ns</sup> = não significativo, \* = 0,05, \*\* = 0,01.

6

7

8 **Tabela 4.** Análise de variância dos efeitos de cultivares, indutores e épocas de coleta  
 9 para a lipoxigenase (LOX).

Causas de Variação	Valores de <i>F</i>	
	gl	LOX
Cultivares (C)	1	117,15 <sup>**</sup>
Indutores (I)	2	16,38 <sup>**</sup>
Épocas de coleta (EC)	4	21,61 <sup>**</sup>
C × I	2	4,18 <sup>ns</sup>
C × EC	3	1,49 <sup>ns</sup>
I × EC	8	0,06 <sup>ns</sup>
C × I × EC	6	3,76*

10 Níveis de probabilidade: <sup>ns</sup> = não significativo, \* = 0,05, \*\* = 0,01.

11

**Tabela 5.** Concentração de aldeído malônico ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF) em folhas de plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 pulverizadas com água destilada, ácido jasmônico (AJ), acibenzolar-S-metil (ASM) e etileno (ET) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*.

Tratamentos	BRS-229					BR-18				
	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai
Água destilada	9,06 c	14,16 ab	11,84 b	17,71 b	15,46 b	10,12 b	11,96 b	12,50 b	14,07 b	17,62 a
AJ	12,98 b	13,12 b	11,74 b	13,34 b	10,90 c	13,15 b	12,99 b	14,72 b	13,00 b	12,62 b
ASM	18,90 a	15,83 a	15,99 a	23,19 a	21,97 a	22,03 a	18,76 a	20,01 a	20,47 a	20,75 a
ET	9,93 c	11,14 c	11,44 b	14,41 b	11,69 c	11,35 b	12,33 b	11,29 b	12,85 b	11,49 b
C.V. (%)	15,42	6,91	9,86	18,13	8,33	12,02	18,42	13,52	14,50	31,88

Médias dentro de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. C.V. = coeficiente de variação. MF= massa fresca.

**Tabela 6.** Atividade de peroxidases ( $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em folhas de plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 pulverizadas com água destilada, ácido jasmônico (AJ), acibenzolar-S-metil (ASM) e etileno (ET) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*.

Tratamentos	BRS-229					BR-18				
	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai
Água destilada	0,196 b	0,380 b	0,486 b	0,736 a	0,672 b	0,369 a	0,542 a	0,535 b	0,676 a	0,607 ab
AJ	0,280 a	0,581 a	0,612 ab	0,647 a	0,585 c	0,331 a	0,543 a	0,735 a	0,634 a	0,696 a
ASM	0,218 ab	0,494 ab	0,756 a	0,849 a	0,604 c	0,378 a	0,450 a	0,601 ab	0,687 a	0,544 b
ET	0,219 ab	0,591 a	0,646 a	0,602 a	0,794 a	0,373 a	0,465 a	0,726 a	0,737 a	0,646 a
C.V. (%)	17,17	14,95	10,39	17,16	4,86	9,86	14,31	11,05	13,78	11,45

Médias dentro de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. C.V. = coeficiente de variação.

**Tabela 7.** Atividade das polifenoloxidasas ( $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em folhas de plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 pulverizadas com água destilada, ácido jasmônico (AJ), acibenzolar-S-metil (ASM) e etileno (ET) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*.

Tratamentos	BRS-229					BR-18				
	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai
Água destilada	0,084 a	0,130 a	0,136 b	0,154 b	0,154 a	0,095 ab	0,072 b	0,080 b	0,134 b	0,104 c
AJ	0,126 a	0,134 a	0,140 b	0,197 a	0,149 a	0,120 a	0,134 a	0,135 a	0,149 ab	0,165 ab
ASM	0,113 a	0,127 a	0,179 ab	0,160 b	0,176 a	0,077 b	0,130 a	0,109 a	0,153 ab	0,179 a
ET	0,095 a	0,138 a	0,186 a	0,168 ab	0,190 a	0,110 a	0,103 ab	0,126 a	0,175 a	0,142 b
C.V. (%)	21,90	22,55	13,02	9,81	12,01	12,45	17,53	11,14	10,12	11,65

Médias dentro de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. C.V. = coeficiente de variação.

**Tabela 8.** Atividade de fenilalanina amônia-liases ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em folhas de plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 pulverizadas com água destilada, ácido jasmônico (AJ), acibenzolar-S-metil (ASM) e etileno (ET) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*.

Tratamentos	BRS-229					BR-18				
	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai
Água destilada	1,89 b	19,6 a	27,6 a	40,6 a	19,4 a	3,91 a	20,6 a	30,1 a	22,8 a	24,4 a
AJ	1,75 b	11,8 b	23,1 ab	32,5 ab	13,7 a	1,75 b	18,1 a	28,9 a	25,2 a	22,0 a
ASM	1,25 b	6,3 c	13,3 b	25,5 b	15,9 a	1,38 b	20,6 a	22,4 b	16,9 b	22,3 a
ET	2,36 a	13,1 b	22,6 ab	30,1 b	17,5 a	4,68 a	17,8 a	25,2 ab	18,0 b	28,2 a
C.V. (%)	21,39	17,48	21,91	19,38	28,91	21,75	18,50	9,69	7,55	20,56

Médias dentro de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. C.V. = coeficiente de variação.

**Tabela 9.** Atividade de quitinases ( $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em folhas de plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 pulverizadas com água destilada, ácido jasmônico (AJ), acibenzolar-S-metil (ASM) e etileno (ET) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*.

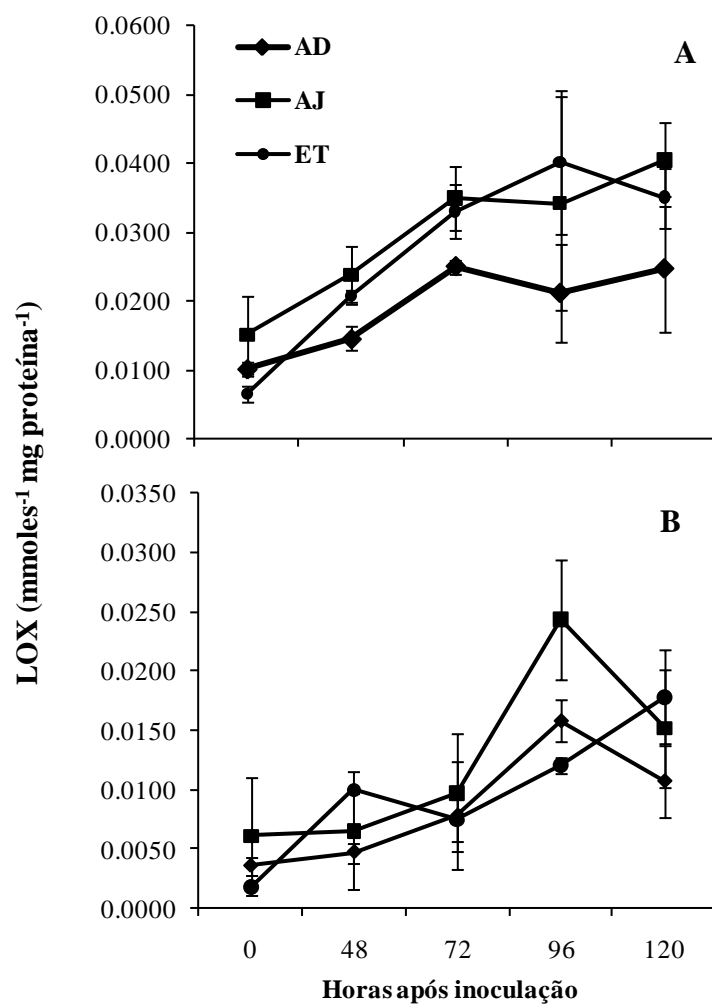
Tratamentos	BRS-229					BR-18				
	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai
Água destilada	0,062 a	0,072 ab	0,059 a	0,053 a	0,058 a	0,014 b	0,019 b	0,015 b	0,023 ab	0,013 b
AJ	0,057 a	0,082 a	0,040 b	0,066 a	0,087 a	0,013 b	0,026 a	0,017 ab	0,026 a	0,021 ab
ASM	0,059 a	0,055 bc	0,062 a	0,043 a	0,083 a	0,017 ab	0,017 b	0,022 ab	0,029 a	0,014 b
ET	0,064 a	0,036 c	0,050 ab	0,063 a	0,058 a	0,019 a	0,019 b	0,025 a	0,018 b	0,029 a
C.V. (%)	21,67	14,93	13,59	24,92	24,86	13,89	9,96	19,15	14,50	31,88

Médias dentro de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. C.V. = coeficiente de variação.

**Tabela 10.** Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (absorbância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em folhas de plantas de plantas de trigo das cultivares BRS-229 e BR-18 pulverizadas com água destilada, ácido jasmônico (AJ), acibenzolar-S-metil (ASM) e etileno (ET) e inoculadas com *Pyricularia oryzae*.

Tratamentos	BRS-229					BR-18				
	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai	0 h	48 hai	72 hai	96 hai	120 hai
Água destilada	44,78 b	116,45 a	109,93 b	78,44 a	63,97 b	67,36 a	113,11 a	89,51 b	80,82 b	71,79 a
AJ	63,81 a	120,38 a	102,45 b	104,39 a	118,18 a	76,19 a	120,43 a	96,14 ab	116,56 a	79,55 a
ASM	60,86 a	121,53 a	113,22 ab	102,59 a	95,02 ab	64,41 a	98,95 a	114,45 a	89,84 ab	85,99 a
ET	39,77 b	114,76 a	127,99 a	103,44 a	118,05 a	65,50 a	111,20 a	118,74 a	99,42 ab	78,27 a
C.V. (%)	20,38	5,82	6,64	22,70	21,84	15,32	9,35	11,25	13,55	11,72

Médias dentro de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. C.V. = coeficiente de variação.



**Figura 1.** Atividade de lipoxigenases (LOX) em folhas de plantas de trigo das cultivares BR-18 (A) e BRS-229 (B), que receberam a aplicação de água destilada (AD), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) e foram inoculadas com *Pyricularia oryzae*. Barras representam o intervalo de confiança.

## **Capítulo 2**

### **Elaboração e Validação de uma Escala Diagramática para Estimar a Severidade da Brusone do Trigo**

## RESUMO

O presente trabalho objetivou elaborar e validar uma escala diagramática para quantificar a severidade da brusone do trigo, causada por *Pyricularia oryzae*. Para elaboração da escala, foram considerados os limites de severidade mínima e máxima da doença na folha bandeira de plantas de trigo cultivadas em casa de vegetação e os níveis intermediários seguindo incrementos logarítmicos. A escala possui dez níveis: 0,1; 1; 2; 4; 8; 16; 24; 32; 52; 72% de severidade. Para a validação da escala, 10 avaliadores inexperientes estimaram a severidade da doença. A princípio, a estimativa da severidade foi realizada sem o uso da escala em 50 folhas bandeira com diferentes níveis de severidade. Em seguida, os mesmos avaliadores estimaram a severidade utilizando a escala proposta. A acurácia e a precisão dos avaliadores foram analisadas pelo coeficiente de correlação concordante de Lin's ( $\rho_c$ ) e regressão linear simples entre a severidade real e a severidade estimada sem e com o uso da escala. A escala proporcionou satisfatória acurácia e precisão ( $R^2$  médio de 94,5%) com erros absolutos em torno de 15%. Os valores de  $u$ ,  $v$  e  $\rho_c$  melhoraram para 90, 100 e 90% dos avaliadores, respectivamente, quando a escala foi utilizada. A reprodutibilidade entre os avaliadores utilizando a escala foi elevada ( $R^2$  superior a 0,90 para 64,4% dos casos). A escala proposta foi considerada adequada para estimar a severidade da brusone do trigo, podendo ser utilizada em qualquer estudo onde faz-se necessário quantificar a ocorrência dessa doença.

## INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que afetam o trigo (*Triticum aestivum* L.), a brusone, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc, pode ser responsável por perdas de até 70% na produtividade dos grãos (Goulart e Paiva, 2000). O fungo infecta todos os órgãos aéreos das plantas, incluindo folhas, colmo e espigas (Reis e Forcelini, 1995). Nas folhas, os sintomas da brusone são manchas elípticas ou arredondadas com margem marrom escura e centro acinzentado (Reis e Forcelini, 1995). Segundo Talbot (1995), há ocorrência de pequenas lesões ovais que são acompanhados por cloroses locais, estas lesões desenvolvem e tornam-se necróticas antes de coalescerem. Os sintomas da brusone nas espigas são bem característicos, ocorrendo um branqueamento e morte dos tecidos acima dos sítios de infecção, além do escurecimento do ráquis (Reis e Forcelini, 1995). Os danos causados pela brusone na produção de grãos de trigo são decorrentes do momento da infecção da espiga pelo fungo e do local onde acontece a sua penetração, podendo afetar a espiga parcial ou totalmente (Urashima et al., 2004). Como consequência da infecção na espiga pelo fungo, não ocorre a passagem de nutrientes, ocasionando diminuição do tamanho dos grãos (Reis e Forcelini, 1995). Os grãos oriundos destas espigas possuem aspecto enrugado, pequenos, deformados e de baixo peso (Goulart e Paiva, 2000). As condições favoráveis para a ocorrência da brusone são períodos chuvosos, temperaturas entre 24 e 28 °C, dias nublados e alta umidade relativa do ar, a severidade da brusone está diretamente relacionada com o período de molhamento foliar (Bedendo e Prabhu, 1995).

A quantificação de doenças possui grande importância no seu manejo, porém é um procedimento difícil de execução e relativamente oneroso (Capucho et al., 2010). Os dados obtidos em uma quantificação de doenças são importantes para avaliar as diferentes medidas de controle, resistência varietal e testar a eficiência de produtos fitossanitários (Vale et al., 2004). A maneira mais apropriada de quantificar as doenças como a brusone do trigo é por meio da severidade, a qual representa a porcentagem de tecido foliar doente em relação à área foliar sadia (Amorim, 1995). A avaliação de uma determinada doença utilizando critérios subjetivos induz, na maioria das vezes, ao erro, sendo necessária a adoção de critérios precisos na quantificação delas (Lenz et al., 2009). Dentre as estratégias para quantificar a severidade de doenças com precisão, as escalas diagramáticas surgem como a

principal ferramenta de avaliação (Bergamin Filho e Amorim, 1996; Martins et al., 2004). Estas representam ilustrações de plantas, folhas, ou partes de plantas apresentando os sintomas em diferentes níveis de severidade (Bergamin Filho e Amorim, 1996). A utilização de escalas diagramáticas pode diminuir a subjetividade das estimativas da severidade entre os avaliadores, melhorando a acurácia e a precisão nas avaliações (Martins et al., 2004). As características desejáveis para uma escala diagramática envolvem a facilidade e a rapidez em utilizá-las, a obtenção de resultados reproduzíveis, a aplicabilidade, bem como a presença de intervalos que representem todos os estádios de desenvolvimento da doença e que permitam uma avaliação imediata (Berger, 1980). Assim, na construção de uma escala, alguns aspectos importantes devem ser considerados tais como os limites superiores e inferiores da escala correspondentes, respectivamente, a máxima e a mínima severidade da doença observada no campo, sendo os sintomas representados os mais próximos possíveis dos observados em condições de infecção natural (Horsfall e Barrat, 1945). Antes de serem propostas como um método padrão de quantificação de doenças, as escalas diagramáticas devem ser validadas e se os resultados produzidos forem insatisfatórios, essas devem ser prontamente corrigidas (Martins et al., 2004).

Diante da necessidade de realização de estudos epidemiológicos da brusone, associado com ausência de um método padronizado de quantificação dessa doença, este trabalho buscou elaborar e validar uma escala diagramática para avaliar a severidade dessa doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Crescimento das plantas de trigo:** O experimento foi conduzido em vasos de plástico com capacidade para 1 dm<sup>3</sup> de substrato. O substrato comercial utilizado foi o Tropstrato<sup>®</sup> (Vida Verde, Mogi Mirim, São Paulo), a base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida. Para cada dm<sup>3</sup> de substrato, foi adicionado 1,63 g de fosfato de cálcio monobásico. Em cada vaso plástico foram semeadas 10 sementes de trigo das cultivares BR-18 e BRS-229, suscetíveis à *P. oryzae*. Após a emergência, deixou-se sete plântulas por vaso. As plantas foram adubadas com solução nutritiva. Adicionou-se 50 mL de solução nutritiva por vaso contendo, em mg L<sup>-1</sup>, 192 KCl; 104,42 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 150,35 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 61 uréia; 100 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,27 NH<sub>4</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O; 1,61 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 6,67 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,74 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 4,10 MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 4,08 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 5 EDTA-bisódico. Essa mesma solução foi utilizada na segunda e na terceira semana após a emergência das plântulas.

**Inoculação das plantas com *P. oryzae*:** O isolado monospórico de *P. oryzae* (UFV/DFP-01) foi obtido de espigas de trigo da cultivar BR-18 em Viçosa-MG. O isolado foi preservado pelo método do papel-filtro (Gonçalves et al., 2007) dentro de microtubos de plástico contendo sílica gel e armazenado a 4 °C. O isolado foi reativado em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, o fungo foi inoculado em plantas de trigo da cultivar BR-18 para verificar a sua patogenicidade. Fragmentos de folhas de plantas com sintomas da brusone foram transferidas para meio aveia-ágar (aveia 60 g/L e ágar 17 g/L) e mantidas sob temperatura de 25 °C e luminosidade constante por 10 dias. As placas de Petri foram lavadas com 10 mL de água destilada esterilizada contendo gelatina 1% (p/v) e, com auxílio de um pincel de cerdas macias, realizou-se a raspagem superficial do micélio para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze para eliminação de fragmentos de micélio e meio de cultura. Após a filtragem, a concentração da suspensão foi ajustada para 10<sup>5</sup> conídios/mL por meio de contagens em hemacitômetro.

Plantas no estágio de crescimento 45 (60 dias após emergência) de acordo com Zadoks (1974) foram inoculadas, em ambas as faces da folha, pulverizando-se 25 mL de suspensão de conídios por planta utilizando-se o atomizador De Vilbiss no. 15. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos de polietileno molhados

e transferidas para câmara de nevoeiro com temperatura de  $25 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $95 \pm 2\%$ , onde permaneceram por 24 h no escuro. Após esse período, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro com umidade relativa de  $85 \pm 5\%$  e temperatura de  $20 \pm 5$  °C. As plantas foram mantidas nessas condições até o final das coletas das folhas bandeiras.

**Elaboração da escala diagramática:** Para a elaboração da escala, um total de 150 folhas bandeira com diferentes níveis de severidade da brusone foram coletadas das plantas de trigo das cultivares BR-18 e BRS229. As folhas coletadas foram digitalizadas individualmente para obtenção de imagens com resolução de 300 dpi. Em seguida, cada folha foi analisada quanto à proporção de área lesionada utilizando-se o programa QUANT (Vale et al., 2003). A partir da severidade mínima e máxima encontrada nas folhas estabeleceu-se outros oito níveis intermediários da brusone para compor a escala diagramática. Após o estabelecimento dos níveis de severidade da escala, uma folha padrão de área conhecida foi utilizada para representar os dez níveis de severidade da escala, de maneira a reproduzir os sintomas observados nas folhas.

**Validação da escala diagramática:** A validação da escala foi realizada por 10 avaliadores inexperientes na quantificação da brusone do trigo. Na primeira etapa, foram inseridas 50 imagens de folhas com diferentes níveis em slides individuais para a visualização no programa PowerPoint, ocasião na qual os avaliadores não utilizaram a escala diagramática proposta para determinar a severidade da brusone. Na segunda etapa de validação da escala, os avaliadores com a escala proposta estimaram a severidade da brusone do mesmo conjunto de imagens de folhas de trigo. Para avaliar cada folha, o avaliador comparou a imagem da folha à escala e, em seguida fez uma estimativa da percentagem de área doente (necrose e clorose).

A partir dos dados de cada avaliador, determinou-se a acurácia e a precisão pelo coeficiente de correlação concordante de Lin's ( $\rho_c$ ) e regressão linear simples entre a severidade real (variável independente quantificada no programa QUANT) e a severidade estimada (variável dependente) realizando a análise separadamente com dados sem e com o uso da escala. A precisão foi avaliada por meio do coeficiente de correlação ( $r$ ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pela variância dos erros (severidade estimada menos a real). A acurácia das estimativas foi determinada pelo teste- $t$  aplicada ao intercepto ( $a$ ) da regressão linear para verificar se foi

significativamente diferente de zero e ao coeficiente angular da reta ( $b$ ) para testar se foi significativamente diferente de 1 ao nível 5% de probabilidade. Valores de intercepto significativamente diferentes de zero indicaram a presença de desvios constantes; enquanto que valores de  $b$  que desviaram significativamente de 1 indicaram a presença de desvios sistemáticos (Nutter Júnior et al., 1993).

O coeficiente de correlação concordante de Lin's ( $\rho_c$ ) é a análise mais apropriada para este tipo de experimento, pois combina as medidas de acurácia e precisão e é baseado na relação dos dados com a linha concordante ( $45^\circ$ ):  $\rho_c = C_b \cdot r$  onde:  $C_b$  é um fator que mede a distância da linha ajustada dos desvios em relação à linha concordante e, portanto, é uma medida de acurácia e  $r$  é o coeficiente de correlação entre a severidade estimada ( $Y$ ) e severidade real ( $X$ ) no qual é uma medida de precisão.  $C_b$  é derivado de:  $C_b = 2 / [(v + 1/v + u^2)]$  onde:  $v = \sigma_y / \sigma_x$  sendo  $\sigma$  o desvio padrão de  $Y$  e  $X$ , respectivamente; e  $u = (\mu_y - \mu_x) / \sqrt{(\sigma_y \cdot \sigma_x)}$  onde  $\mu$  é o valor médio de  $Y$  e  $X$ , respectivamente,  $\sigma$  é definido como acima. O componente  $v$  mede a diferença na escala entre os valores de severidade estimada ( $Y$ ) e severidade real ( $X$ ) que essencialmente é definida pela diferença na inclinação das duas linhas (linha da regressão com a linha concordante). Inclinações iguais das duas linhas significa valor de  $v$  igual a 1. O termo  $u$  reflete a diferença de localização da linha da regressão em relação à linha concordante, a qual é refletida pela diferença de altura entre as linhas. Alturas iguais significa um valor de  $u$  igual a 0. Uma medida perfeita de acurácia é quando os dados estão todos em cima da linha concordante como, por exemplo,  $r = 1$ ,  $C_b = 1$  [ $v = 1$ ,  $u = 0$ ] e, conseqüentemente,  $\rho_c = 1$ ) (Bock et al., 2010; Nita et al., 2003).

A reprodutibilidade das avaliações foi determinada baseada nos valores de  $R^2$  da regressão linear entre as severidades estimadas pelos diferentes avaliadores combinados aos pares (Nutter Júnior e Schultz, 1995). As regressões entre a severidade real e a estimada para cada avaliador, bem como entre os avaliadores foram realizadas utilizando-se o programa MINITAB versão 14.

## RESULTADOS

A escala proposta neste trabalho possui dez níveis, os quais são: 0,1; 1; 2; 4; 8; 16; 24; 32; 52; 72% de severidade (Fig. 1). Os primeiros sintomas surgiram como lesões individuais ao longo da folha bandeira e, a partir de 16% de severidade, observou-se a coalescência dessas lesões, as quais foram consideradas no desenvolvimento da escala (Fig. 1). Para todos os avaliadores que utilizaram a escala diagramática, a severidade estimada aproximou-se da severidade real (Fig. 2). Baseando-se nas análises de regressão e nos parâmetros estatísticos, observou-se que a acurácia e a precisão dos avaliadores melhoraram com o uso da escala para a maioria deles (Tabela 1, Fig. 2).

A acurácia dos avaliadores foi determinada pelo intercepto ( $a$ ) e a inclinação ( $b$ ) através da análise de regressão linear entre os valores de severidade real e estimada. Os valores do intercepto ( $a$ ) para 50% dos avaliadores (1, 2, 3, 4 e 7) que não utilizaram a escala não diferiram estatisticamente de zero. Quando utilizaram a escala diagramática, os valores do intercepto ( $a$ ) não diferiram estatisticamente de zero para 60% dos avaliadores (1, 3, 7, 8, 9 e 10), indicando que mesmo com o uso da escala ocorreram desvios constantes (Tabela 1). O coeficiente angular da reta ( $b$ ) para 90% dos avaliadores (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) que não utilizaram a escala diferiu estatisticamente de um. Quando a escala diagramática foi utilizada, o coeficiente angular da reta ( $b$ ) diferiu estatisticamente de um para 40% dos avaliadores (1, 3, 7 e 10), indicando que com o uso dela houve redução dos desvios sistemáticos (Tabela 1). As estimativas de severidade da brusone com o uso da escala apresentaram a tendência de superestimar os valores de severidade. Essa tendência pode ser confirmada analisando os erros absolutos positivos na maioria das estimativas, bem como observando os valores positivos de  $u$  para 60% dos avaliadores (Fig. 3).

A precisão é determinada pelo coeficiente de determinação  $R^2$  e foi observado que com o uso da escala, esse coeficiente variando de 91,8 a 96,7% com média de 94,5% (Tabela 1). Sem o uso da escala, os valores de  $R^2$  variaram de 76,3 a 93% com média de 87,73% (Tabela 1). O aumento da precisão também foi confirmado pela redução dos erros (Fig. 3). Sem a utilização da escala, foi observado que os avaliadores apresentaram maiores desvios nos erros absolutos sendo que 60% deles (avaliadores 1, 2, 4, 6, 7 e 9) chegaram a apresentar erros superiores a 38% sendo

que para todos os eles, os erros foram menores que 56% (Fig. 3). No entanto, com a utilização da escala, os erros ficaram em torno de 15% para a maioria dos avaliadores, sendo que para todos eles os erros foram menores que 21,44% (Fig. 3).

O coeficiente de correlação concordante de Lin's ( $\rho_c$ ) foi maior para 90% dos avaliadores que utilizaram a escala, sendo observado que com o uso da escala o valor médio de  $\rho_c$  aumentou de 0,83 para 0,96 (Fig. 2). Para todos os avaliadores utilizando a escala, os valores de  $u$  e  $v$  aproximaram de 0 e 1, respectivamente (Fig. 2). O valor de  $C_b$ , que é formado pelo valor de  $u$  e  $v$ , aproximou-se de 1 para todos os avaliadores que utilizaram a escala (Fig. 2).

A reprodutibilidade é baseada no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) entre os avaliadores aos pares. Sem o uso da escala, 82,1% das comparações dos avaliadores aos pares foram menores que 89 e 17,9% foram maiores que 90% (Tabela 2). Quando os avaliadores foram comparados aos pares utilizando a escala, 35,6% foram menores que 89% e 65,4% foram maiores que 0,90 (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

As escalas diagramáticas são importantes ferramentas na quantificação dos níveis da severidade de doenças podendo ser utilizadas em estudos epidemiológicos e estratégias de controle de doenças (Vale et al., 2004). Uma grande variedade de escalas diagramáticas já foram elaboradas para diversas doenças entre elas a ferrugem da soja (Godoy et al., 2006) e do cafeeiro (Capucho et al., 2011), mancha branca do milho (Capucho et al., 2010) e ramularia do algodoeiro (Aquino et al., 2008). No entanto, inexistente uma escala diagramática para estimar, com precisão e acurácia, a severidade da brusone.

A tendência dos avaliadores na validação da escala para a brusone do trigo foi de superestimar os valores de severidade, corroborando com trabalhos anteriores (Newton & Hackett, 1994; Parker et al., 1995; Diaz et al., 2001; Leite et al., 2002; Capucho et al., 2010; Lenz et al., 2010). Contudo, em alguns casos, os níveis de severidade tem sido subestimados (Michereff et al., 1998; Michereff et al., 2000; Gomes et al., 2004). Soluções para corrigir a superestimação dos níveis de severidade da doença variam de acordo com a magnitude do erro e o nível do treinamento dos avaliadores (Nutter Júnior & Schultz, 1995). A precisão é definida como a exatidão de uma operação onde há rigor e ou refinamento na medida (Bergamin Filho & Amorim, 1996). Os valores de  $R^2$  foram superiores a 90% para todos os avaliadores que utilizaram a escala, sendo considerado ideal para este tipo de avaliação de acordo com Bergamin Filho & Amorim (1996). Os níveis de precisão encontrados com o uso da escala proposta no presente estudo estão próximos aos encontrados em outros estudos (Capucho et al., 2010; Gomes et al., 2004).

A acurácia refere-se à proximidade existente entre a severidade estimada e a severidade real na avaliação de uma doença (Nutter Júnior & Schultz, 1995). Assim, avaliadores considerados acurados apresentam a média das estimativas de severidade próxima à média da severidade real (Martins et al., 2004). Além disso, a acurácia também pode ser definida como sendo a exatidão de uma medida sem erros sistemáticos medida pelo intercepto ( $a$ ) e pelo coeficiente angular ( $b$ ) da regressão linear entre a severidade estimada e a real (Bergamin Filho & Amorim, 1996). Com a utilização da escala foi verificado pequena redução dos erros constantes e uma significativa redução dos erros sistemáticos. Mesmo com utilizando a escala, os

avaliadores não eliminaram os erros sistemáticos e constantes apesar da alta precisão dos mesmos. Segundo Gomes et al. (2004), as avaliações realizadas com menor acurácia e maior precisão não caracteriza um problema sério, pois normalmente os desvios seguem o mesmo padrão.

Outro indicador da eficiência de uma escala diagramática é a reprodutibilidade das estimativas entre os avaliadores (Berger, 1980). Quando diferentes avaliadores utilizam a mesma escala na determinação da severidade de determinadas amostras, esses devem estimar os mesmos valores (Nutter Júnior & Schultz, 1995). A reprodutibilidade pode ser caracterizada como sendo a repetibilidade das estimativas, a qual é estimada pela correlação das severidades estimadas pelos avaliadores aos pares. Na comparação entre dois avaliadores, quando o coeficiente de determinação aproxima-se de 100%, as estimativas dos avaliadores se repetem (Belasque et al., 2005; Leite & Amorim, 2002). A confiabilidade das severidades estimadas entre os avaliadores foi maior com o uso da escala desenvolvida nesse trabalho. Nas avaliações sem o uso da escala, os coeficientes de determinação foram inferiores a 80% em 28,8% das comparações entre os avaliadores. Com o uso da escala proposta, foi observado que em nenhum caso o coeficiente de determinação foi inferior a 80% e que os coeficientes de determinação foram superiores a 90% em todos os casos, indicando que as estimativas realizadas com a escala são reproduzíveis.

O uso da escala para avaliar a severidade da brusone proporcionou redução dos erros absolutos. A associação desta escala ao treinamento dos avaliadores poderá reduzir ainda mais estes erros (Nutter Júnior & Schultz, 1995). Além da redução dos erros, a estimativa de severidade utilizando a escala aumenta a eficiência da avaliação, bem como padroniza os resultados (Stonehouse, 1994).

A escala diagramática proposta no presente trabalho aumentou a acurácia, a precisão e a reprodutibilidade na avaliação da severidade da brusone do trigo. Portanto, esta escala torna-se uma ferramenta valiosa para estudos epidemiológicos da doença visando reduzir os danos causados por essa doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim L (1995) Avaliação de doenças. In: Bergamim Filho A, Kimathi H, Amorim L (eds) Manual de Fitopatologia. Ceres, São Paulo, pp. 647-671.
- Aquino LA, Berger PG, Rodrigues FA, Zambolim L, Hernandez JFR, Miranda LM. (2008) Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da ramulária do algodoeiro. *Summa Phytopathologica* **34**:361-363
- Bedendo IP, Prabhu AS. (1995) Doenças do arroz. In: Kimathi H, Amorim L, Resende JAM, Bergamim Filho AE, Camargo LEA. (eds) Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas. São Paulo, Agronômica Ceres. pp. 331-341.
- Belasque J, Bassanezi RB, Spósito MB, Ribeiro LM, Jesus Júnior WC, Amorim L. (2005) Escalas diagramáticas para a avaliação da severidade do cancro cítrico. *Fitopatologia Brasileira* **30**:387-393.
- Bergamim Filho A, Amorim L (1996) Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico. Editora Ceres, São Paulo. 289 p.
- Berger RD (1980) Measuring Disease Intensity. In: Teng PS, Krupa SV (eds) Crop loss assessment with constrain production and crop improvement in agriculture and forestry. St. Paul, University of Minnesota, pp. 28-31.
- Bock CH, Poole G, Parker PE, Gottwald TR. (2010) Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**:59-107.
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS, Parreira DF, Ferreira PA, Lanza FE, Costa RV, Casela CR, Cota LV. (2010) Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. *Crop Protection* **29**:1015-1020.
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS, Vaz GRO. (2011) Development and validation of a standard área diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology* **60**:1144-1150.
- Diaz CG, Bassanezi RB, Bergamin Filho A. (2001) Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. *Summa Phytopathologica* **27**:35-39.
- Godoy CV, Koga LJ, Canteri MG. (2006) Diagramatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* **31**:63-68.

- Gomes AMA, Michereff SJ, Mariano RLR. (2004) Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. *Summa Phytopathologica* **30**:38-42.
- Goulart ACP, Paiva FA. (2000) Perdas no rendimento de grãos de trigo causadas por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. *Summa Phytopathologica* **26**:184-189.
- Horsfall JG, Barrat RW. (1945) An improved grading system for measuring plant disease. *Phytopathology* **35**: 655.
- Leite RMVBC, Amorim L. (2002) Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de alternaria em girassol. *Summa Phytopathologica* **28**:14-19.
- Lenz A, Balardin RS, Corte GD, Marques LN, Debona D. (2010) Escala diagramática para a avaliação de severidade de mancha-parda em arroz. *Ciência Rural* **40**:752-758.
- Martins MC, Guerzoni RA, Câmara GMS, Mattiazzi P, Lourenço SA, Amorim L. (2004) Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatologia Brasileira* **29**:179-184.
- Michereff SJ, Maffia LA, Noronha MA. (2000) Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. *Fitopatologia Brasileira* **25**:612-629.
- Newton AC, Hackett CA. (1994) Subjective components of mildew assessment on spring barley. *European Journal of Plant Pathology* **100**:395-412.
- Nita M, Ellis MA, Madden LV. (2003) Reliability and accuracy of visual estimation of Phomopsis leaf blight of strawberry. *Phytopathology* **93**:995-1005.
- Nutter FW, Schultz PM. (1995) Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Canadian Journal of Plant Pathology* **17**:174-184.
- Nutter FW, Gleason ML, Jenco JH, Christinas NC. (1993) Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. *Phytopathology* **83**:806-812.
- Parker SR, Shaw MW, Royle DJ. (1995) The reliability of visual estimates of disease severity on cereal leaves. *Plant Pathology* **43**:856-865.
- Reis EM, Forcelini CA. (1995) Controle Cultural. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, pp. 710-716.
- Stonehouse J. (1994) Assessment of andean bean diseases using visual keys. *Plant Pathology* **43**:519-527

Talbot, N.J. (1995). Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Trends in microbiology* **3**:9-16.

Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato JR (2003) QUANT: A software for plant disease severity assessment. In: Close R, Braithwaite M, Havery I (eds) Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, New Zealand, pp. 105.

Vale FXR, Jesus Junior WC, Zambolim L. (2004) Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. Perffil, Belo Horizonte. 531 p.

## TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1.** Estimativas da interseção da reta ( $a$ ), dos coeficientes angulares ( $b$ ) e dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das equações de regressão linear calculadas entre a severidade real e estimada da brusone do trigo realizada por avaliadores sem experiência com e sem a utilização da escala diagramática.

Avaliadores	Sem escala			Com escala		
	$a$	$b$	$R^2$	$a$	$b$	$R^2$
1	-3,88 <sup>ns</sup>	1,43 <sup>*</sup>	85,7	-1,25 <sup>ns</sup>	0,92 <sup>ns</sup>	93,3
2	-0,39 <sup>ns</sup>	1,45 <sup>*</sup>	93,9	1,97 <sup>*</sup>	0,92 <sup>*</sup>	95,6
3	-4,79 <sup>ns</sup>	1,08 <sup>ns</sup>	78,2	0,86 <sup>ns</sup>	0,91 <sup>*</sup>	94,5
4	2,40 <sup>ns</sup>	1,44 <sup>*</sup>	89,4	4,27 <sup>*</sup>	0,96 <sup>ns</sup>	92,9
5	-0,52 <sup>*</sup>	1,00 <sup>*</sup>	91,5	2,91 <sup>*</sup>	0,95 <sup>ns</sup>	91,8
6	4,78 <sup>*</sup>	1,37 <sup>*</sup>	88,5	2,83 <sup>*</sup>	1,03 <sup>ns</sup>	94,6
7	5,49 <sup>ns</sup>	1,40 <sup>*</sup>	76,3	-1,44 <sup>ns</sup>	1,08 <sup>*</sup>	94,4
8	-1,82 <sup>*</sup>	0,87 <sup>*</sup>	93,0	-0,16 <sup>ns</sup>	0,94 <sup>ns</sup>	96,7
9	-3,74 <sup>*</sup>	1,37 <sup>*</sup>	90,7	0,28 <sup>ns</sup>	1,01 <sup>ns</sup>	95,1
10	-4,90 <sup>*</sup>	1,11 <sup>*</sup>	90,1	0,45 <sup>ns</sup>	0,92 <sup>*</sup>	96,2
Média	-0,73	1,25	87,73	1,07	0,96	94,5

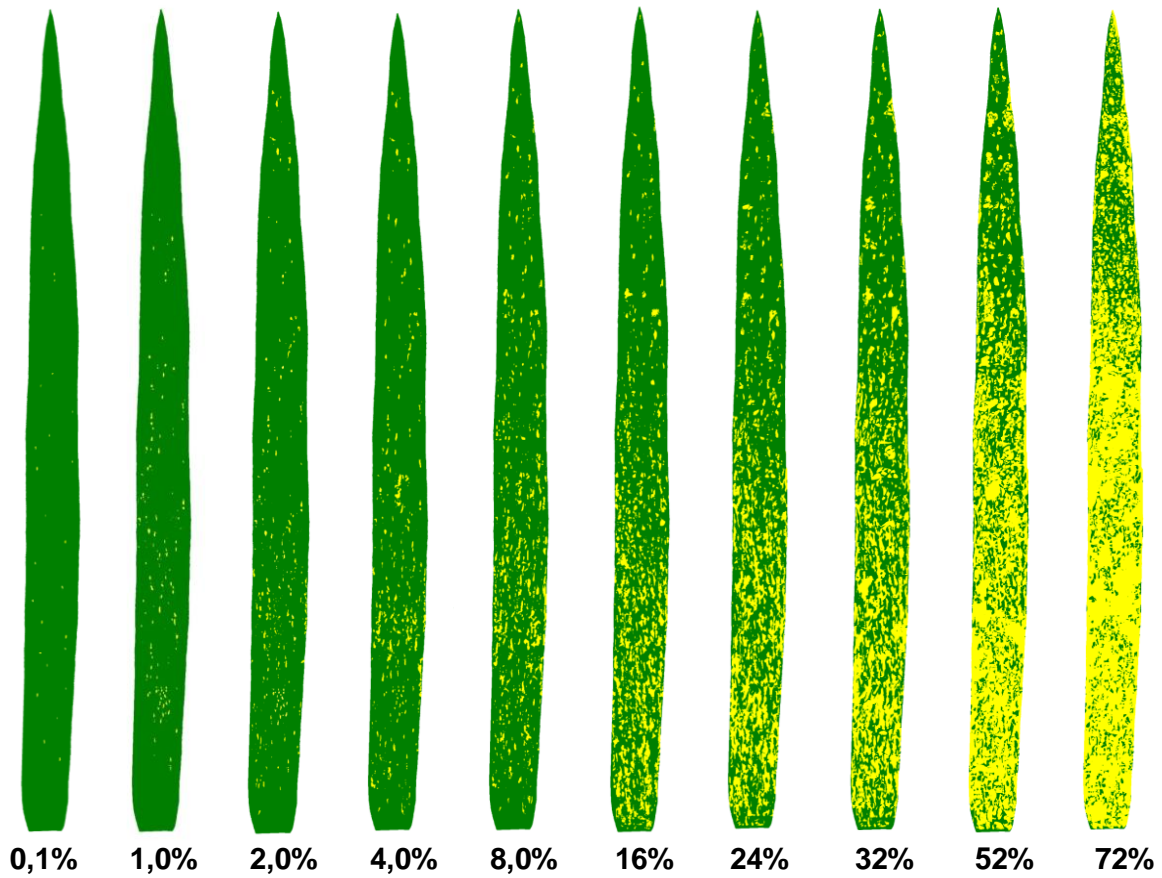
\* situações onde o valor da interseção da reta ( $a$ ) ou o coeficiente angular ( $b$ ) foi diferente de “0” e “1”, respectivamente, pelo teste- $t$  ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup> = não significativo.

**Tabela 2.** Reprodutibilidade das estimativas da severidade da brusone do trigo representada pela frequência dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das equações de regressão linear simples relacionando as estimativas entre avaliadores com e sem o uso da escala proposta.

Valor de $R^2$	Frequência (%) <sup>*</sup>	
	Sem escala	Com escala
< 0,80	28,8	0,0
0,80 - 0,89	53,3	35,6
0,90 - 1,00	17,9	64,4

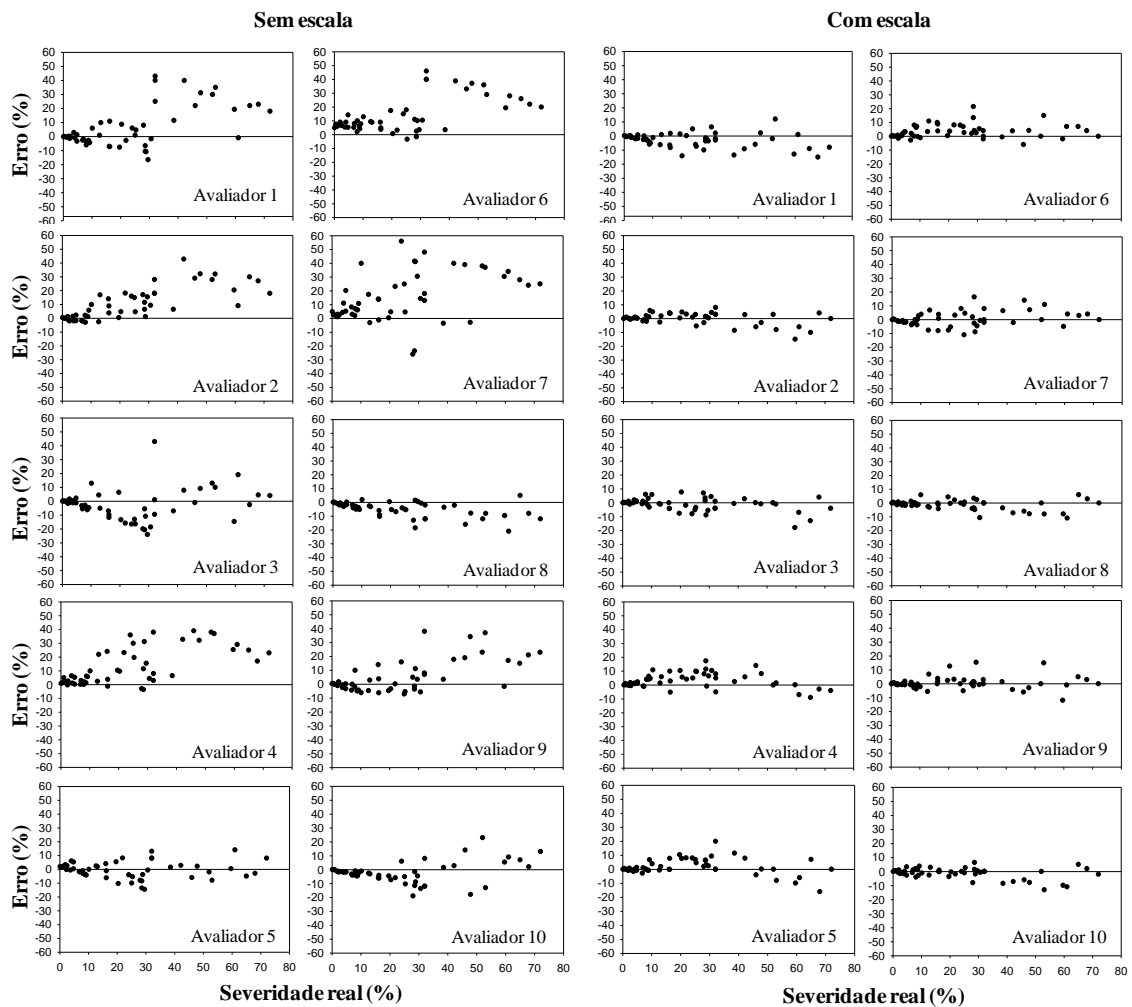
\* a frequência foi calculada considerando o número de ocorrências do intervalo em relação ao total de 45 combinações possíveis entre os dez avaliadores para cada avaliação da severidade da brusone.



1

2 **Figura 1.** Escala diagramática para avaliação da severidade da brusone do trigo causada por *Pyricularia oryzae*. Valores em porcentagem (%) de  
3 área foliar com sintomas da doença.





1  
 2 **Figura 3.** Erro absoluto (EA) (severidade estimada menos a severidade real) da  
 3 severidade estimada da brusone do trigo pelos 10 avaliadores com e sem o uso da escala  
 4 diagramática. Os valores menores de erro absoluto indicam que a severidade estimada  
 5 foi similar a severidade real.  
 6