

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 259

A coleção de isolados de *Magnaporthe oryzae* da Embrapa Arroz e Feijão: uma micoteca para uso na pesquisa com brusone

*Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes
Lívia Teixeira Duarte
Marta Cristina Corsi de Filippi
Valácia Lemes da Silva Lôbo
Anne Sitarama Prabhu
Fábio José Gonçalves
Bruna Rengel de Freitas
Luciana Almeida Faria Guimarães
Adriane Wendland*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rod. GO 462, Km 12
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (0xx62) 3533 2100
Fax: (0xx62) 3533 2123
www.cnpaf.embrapa.br
sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Luís Fernando Stone*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*
Membro: *Flávia Rabelo B. Moreira*
Murillo Lobo Junior

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*
Capa: *Sebastião José de Araújo*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

versão online (2010)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Arroz e Feijão

A coleção de isolados de *Magnaporthe oryzae* da Embrapa Arroz e Feijão :
uma micoteca para uso na pesquisa com brusone / Marcio Vinicius de
Carvalho Barros Côrtes... [et al.]. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa
Arroz e Feijão, 2010.
20 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 259)

1. Arroz – Brusone – Identificação. 2. Microrganismo. 3. Arroz – Fungo -
Pyricularia oryzae. I. Côrtes, Marcio Vinicius de Carvalho Barros. II. Embrapa
Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 633.1894 (21. ed.)

© Embrapa 2010

Autores

Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes

Farmacêutico, Mestre em Bioquímica, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, marciov@cnpaf.embrapa.br

Lívia Teixeira Duarte

Farmacêutica, Mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, livia@cnpaf.embrapa.br

Marta Cristina Corsi de Filippi

Engenheira agrônoma, PhD em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, cristina@cnpaf.embrapa.br

Valácia Lemes da Silva Lôbo

Engenheira agrônoma, Doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, valacia@cnpaf.embrapa.br

Anne Sitarama Prabhu

Biólogo, PhD em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, prabhu@cnpaf.embrapa.br

Fábio José Gonçalves

Biólogo, Mestre em Agronomia, UFG, Goiânia,
GO, fabio@cnpaf.embrapa.br

Bruna Rengel de Freitas

Estudante de Graduação em Biologia da Uni-
anhanguera, bolsista da Embrapa Arroz e Feijão,
Santo Antônio de Goiás, GO,
brenge@cnpaf.embrapa.br

Luciana Almeida Faria Guimarães

Estudante de Graduação em Biologia da Uni-
anhanguera, bolsista da Embrapa Arroz e Feijão,
Santo Antônio de Goiás, GO,
lucianag@cnpaf.embrapa.br

Adriane Wendland

Engenheira agrônoma, Doutora em Fitopatologia,
pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo
Antônio de Goiás, GO,
adrianew@cnpaf.embrapa.br

Apresentação

Desde a fundação desta instituição, em 1974, as coletas de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em lavouras comerciais com sintomas de brusone sempre fizeram parte da rotina dos colaboradores atrelados ao Laboratório de Fitopatologia. As coletas, voltadas para a diagnose da doença ou para compor o banco de isolados do agente causal da brusone, *Magnaporthe oryzae* B. Couch (anamorfo *Pyricularia oryzae* (Cavra)), geravam, através do isolamento monospórico, material genético apto à aplicação a estudos epidemiológicos e ao programa de melhoramento genético do arroz para resistência à doença.

O número de isolados foi crescendo com o passar dos anos e, em meados da década de 1980, percebeu-se a necessidade de reorganizar e catalogar os isolados em uma coleção que estivesse prontamente disponível ao público interno da empresa, tanto para estudos aplicados ao melhoramento genético para resistência à doença, assim como para a pesquisa básica, servindo como um banco de referência. Por esse motivo, essa publicação comemora os 25 anos da reorganização da coleção de isolados de *M. oryzae* da Embrapa Arroz e Feijão.

Com a criação, em 2010, da Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa, liderada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, está sendo ressaltada a importância dessa coleção no contexto de patrimônio genético brasileiro. Com o apoio financeiro, está sendo possí-

vel a catalogação, monitoração e manutenção mais adequadas para a coleção.

A coleção de isolados de *M. oryzae* continua em plena expansão. Com o desenvolvimento de projetos como “Identificação, caracterização e incorporação de genes para resistência durável a brusone em arroz cultivado no Brasil”, pertencente ao Macroprograma 2 da Embrapa, em parceria com a Monsanto, o número de amostras e a diversidade de genótipos de origem do material contendo sintomas de brusone aumentou consideravelmente, resultando num incremento em número e em origem geográfica de isolados da referida coleção.

Os Autores

Sumário

Introdução	9
As coleções de cultura de microrganismos	9
A coleção de fitopatógenos da Embrapa Arroz e Feijão	10
A coleção de <i>Magnaporthe oryzae</i> da Embrapa	11
O fungo <i>Magnaporthe oryzae</i> (<i>Pyricularia oryzae</i>)	11
Metodologia	13
Recebimento do material vegetal	13
Indução da conidiogênese (formação de conídios)	14
Isolamento monospórico	14
Armazenamento dos isolados	15
Determinação de patótipos	17
Registro do isolado na coleção	18
Resultados e Discussão	18
Conclusão	20
Referências	20

A coleção de isolados de *Magnaporthe oryzae* da Embrapa Arroz e Feijão: uma micoteca para uso na pesquisa com brusone

Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes
Lívia Teixeira Duarte
Marta Cristina Corsi de Filippi
Valácia Lemes da Silva Lôbo
Anne Sitarama Prabhu
Fábio José Gonçalves
Bruna Rengel de Freitas
Luciana Almeida Faria Guimarães
Adriane Wendland

Introdução

As coleções de cultura de microrganismos

É fato que a manutenção, organização e o incremento contínuo das coleções de microrganismos, especificamente os fitopatogênicos, fazem parte do leque de estratégias para o desenvolvimento da pesquisa científica agrônômica de diversos países. No mundo existem diversas coleções de microrganismos, organizadas em bancos, catalogadas e quase que integralmente disponíveis para o uso em pesquisa. As coleções oficiais mais destacadas mundialmente são: “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell (DSMZ)”, na Alemanha, “United Kingdom National Culture Collection”, na Grã-Bretanha, e “American Type Culture Collection (ATCC)”, nos Estados Unidos da América (ABREU; TUTUNJI, 2004). A diversidade de microrganismos abrigada nestas coleções possibilitou inúmeros estudos como a descoberta de novas espécies, raças ou outras variações de patógenos importantes, que sofreram modificações ao longo do tempo.

Nos países em desenvolvimento, historicamente, as coleções de cultura não mereceram a devida atenção, sendo consideradas por décadas como subprodutos, em especial da pesquisa básica, com sua manutenção e preservação atribuídas aos próprios investigadores (ABREU; TUTUNJI, 2004). Contudo, devido ao esforço de alguns cientistas

brasileiros em convencer as autoridades da importância das coleções de cultura e a valoração da biodiversidade como fonte de recursos diversos, esse panorama negativo está se modificando.

Atualmente no Brasil são conhecidas algumas coleções de referência e que continuam se desenvolvendo continuamente. Destacam-se entre elas: a Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa (âmbito nacional), a Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (Campinas-SP), a Coleção de Culturas IBSBF do Instituto Biológico (Campinas-SP), a Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro-RJ), a Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-SP), dentre outras.

Os bancos de microrganismos são os pontos de partida para que pesquisadores das diversas áreas façam estudos relacionados à variabilidade de populações de patógenos, seja quanto a características genéticas de interesse como quanto à patogenicidade, produção de moléculas de interesse econômico com aplicabilidade industrial, entre outras. A caracterização da variabilidade de diferentes espécies enriquece as opções para as tomadas de decisão, em diferentes áreas da pesquisa.

A coleção de fitopatógenos da Embrapa Arroz e Feijão

A Embrapa Arroz e Feijão possui uma extensa e valiosa coleção de microrganismos patogênicos a essas culturas. A coleção está vinculada à Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa, sob coordenação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

São mantidos isolados de microrganismos patogênicos à cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.): *Xanthomonas axonopodis*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pseudocercospora griseola*, entre outros. Além de *M. oryzae*, também são mantidos outros isolados de microrganismos patogênicos ao arroz como *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Drechslera oryzae*, entre outros. Dentre todas estas espécies, destaca-se a coleção de *M. oryzae*, que conta atualmente com mais de 10.000 isolados (Figura 1), obtidos e mantidos desde a fundação da empresa.

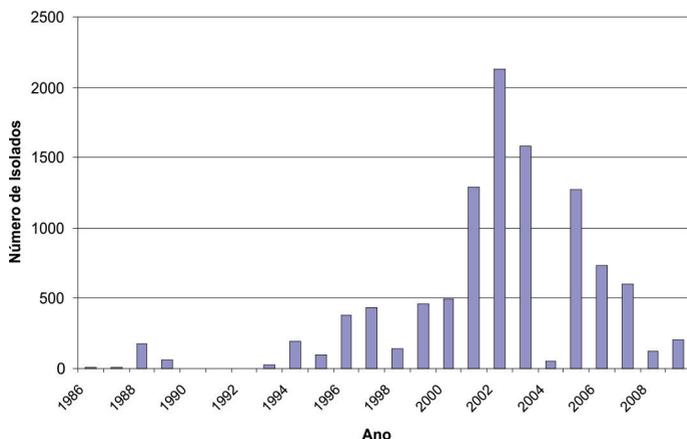


Figura 1. Evolução anual do número de isolados monospóricos de *Magnaporthe oryzae* da coleção de culturas da Embrapa Arroz e Feijão.

A coleção de *Magnaporthe oryzae* da Embrapa

Trata-se de uma coleção bastante variada, contendo isolados de *M. oryzae* oriundos de plantas de arroz e outras gramíneas obtidas em diversas localidades do Brasil. Como exemplo, nessa coleção, também são encontrados, em menor escala, isolados dessa espécie obtidos em outras culturas como, por exemplo, no trigo (*Triticum* spp.). Cerca de 90% dos isolados desse patógeno foram obtidos a partir das últimas duas décadas e são provenientes das principais regiões produtoras de arroz do país. Além de ser utilizada como ferramenta para o melhoramento de plantas de arroz em termos de resistência à brusone, doença mais crítica para esta cultura, outra função da coleção é prover material adequado para o estudo de populações desse patógeno. Dessa forma, é possível definir quais os patótipos prevalentes nas diversas regiões produtoras de arroz no Brasil e direcionar os esforços do melhoramento de arroz para se obter plantas mais resistentes à brusone.

O fungo *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*)

O fungo *M. oryzae* pertence ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Hemiascomycetes, Ordem Diaphortales, Família Magnaphortaceae, é o agente causador da brusone, principal

doença da cultura do arroz, tendo sua presença sido relatada por Hebert (1971), em 85 países. Ele também infecta outras gramíneas, como trigo e centeio, causando anualmente grandes perdas na agricultura.

O ciclo de vida de *Pyricularia oryzae* inicia-se quando os conídios produzidos nas lesões são disseminados pelo vento e respingos d'água e caem sobre as folhas e cachos de arroz. Ao entrar em contato com uma superfície hidrofóbica e indutora, característica clássica das folhas do arroz, em condições de alta umidade (acima de 90%), os conídios germinam e produzem uma estrutura especializada que possibilita a infecção, chamada apressório, permitindo a adesão e colonização do tecido aéreo da planta (Figura 2).

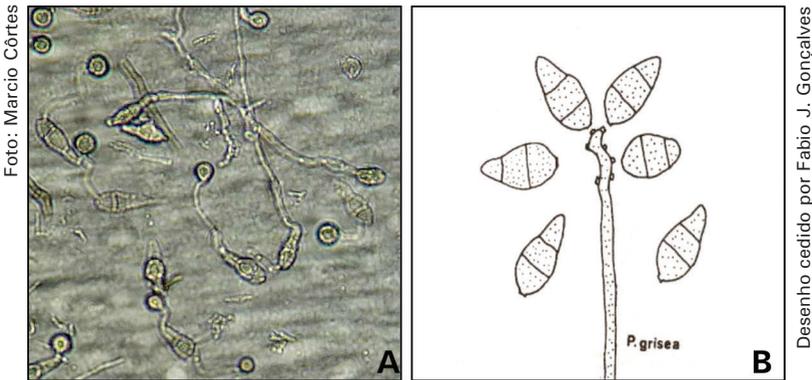


Figura 2. (A) Conídios de *Pyricularia oryzae* germinados com apressórios formados; (B) Conidióforo e conídios de *P. oryzae*.

A parte aérea da planta doente é a região mais comprometida pela doença. As folhas, os nós do colmo, o colmo, as bainhas e várias partes das panículas ou cachos e grãos podem apresentar sintomas de brusone. Nas folhas, pequenos pontos castanhos são encontrados no início da infecção, porém logo aumentam de tamanho, dando origem a lesões que podem atingir 2,0 cm de comprimento e 0,5 cm de

largura. Seu formato é elíptico, com centro geralmente cinza e borda marrom, às vezes circundado por um halo amarelado. Com o aumento do tamanho e número, as lesões podem coalescer, necrosando a área foliar e provocando a morte das plantas na fase vegetativa (Figura 3).

Foto: Marcio Côrtes



Figura 3. Lesões típicas de brusone em folhas de arroz.

Para um controle adequado e ecologicamente correto, as medidas de manejo da brusone devem ser tomadas desde o preparo do solo até a colheita, tanto para arroz de terras altas como para o irrigado.

Metodologia

Recebimento do material vegetal

O material vegetal com sintomas de brusone somente é recebido pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão quando sua identificação é considerada satisfatória, contendo os seguintes dados: nome da cultivar de origem, responsável pela coleta, município da coleta, data da amostragem, tratamento químico, caso tenha sido utilizado, entre outras informações julgadas importantes. Em

seguida, as amostras são submetidas a procedimentos padronizados, descritos a seguir.

Indução da conidiogênese (formação de conídios)

Para o isolamento de *Pyricularia oryzae* (*M. oryzae*) é necessária a indução da conidiogênese no material vegetal (geralmente folhas) lesionado (Figura 4A). A indução da formação de conídios no material é efetuada em câmara úmida. Uma lavagem prévia do material vegetal em água corrente é necessária, devido à presença de microrganismos saprófitas na superfície da planta, onde também pode ser efetuada a desinfecção do material com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 0,2%. Neste caso é importante enxaguar o material com água corrente, para eliminar o álcool e o hipoclorito utilizados.

A câmara úmida consiste na incubação do material vegetal em placas de Petri recobertas por papel de filtro e algodão embebidos em água esterilizada (Figura 4B). O material com lesões esporulativas (acinzentadas) e as ramificações das panículas são geralmente as porções da planta escolhidas. Nesse ambiente úmido, com temperatura de aproximadamente 27 °C, em torno de 24 horas ocorre a formação de conídios.

A formação de conídios é observada em microscópio estereoscópico ou lupa (Figura 4C).

Isolamento monospórico

Uma folha ou panícula com sintomas de brusone pode conter mais de um patótipo de *M. oryzae* e, por este motivo, é muito importante realizar o isolamento monospórico. Caso esse procedimento não seja realizado, é possível se obter mais de um isolado do patógeno numa mesma amostra, o que impossibilita sua identificação por meio de variedades diferenciadoras.

Utilizando-se um alfinete entomológico e microscópio estereoscópico, os conídios presentes na superfície do material previamente incubado em câmara úmida são transferidos diretamente para a superfície de

placas de Petri contendo ágar simples. Os conídios são espalhados e isolados individualmente. Com auxílio de bisturi esterilizado, blocos de ágar simples contendo um único conídio são transferidos para outra placa de Petri contendo o meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA), acrescentado de antibiótico tetraciclina 0,002 mg.mL⁻¹. As placas são incubadas a 25 °C, sendo observado o desenvolvimento do material isolado (Figura 4D).

Armazenamento dos isolados

Existem diversas metodologias para armazenamento prolongado de microrganismos. A eficiência do método varia com relação ao tempo de armazenamento e ao tipo de microrganismo. Para a coleção de *M. oryzae*, selecionou-se a utilização do armazenamento em papel de filtro, com baixa umidade, sob congelamento. Esse procedimento é adotado por todos os laboratórios que trabalham com essa espécie de microrganismo.

Os isolados monospóricos obtidos em etapa anterior, são transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA e papel de filtro esterilizado sobre o meio de cultivo. Após a colonização integral do papel, este é transferido para a placa de Petri vazia e esterilizada, para secagem lenta em estufa sob temperatura variando entre 28-30 °C por 10 dias (Figura 4E).

Depois de completamente seco, o disco de papel de filtro é cortado em quadrados de aproximadamente 0,5 cm². Os fragmentos de papel são armazenados em envelopes de papel-manteiga ou tubos criogênicos de 2 mL previamente esterilizados (Figura 4H). Todo o procedimento é executado assepticamente, utilizando-se material esterilizado, em ambiente de câmara de fluxo laminar.

Os envelopes ou tubos criogênicos contendo isolados são devidamente identificados e finalmente armazenados em frascos (Figura 4H) de polipropileno, contendo sílica gel indicadora para evitar o acúmulo de umidade, e colocados em freezer sob temperatura de aproximadamente -10 °C (Figura 4I).

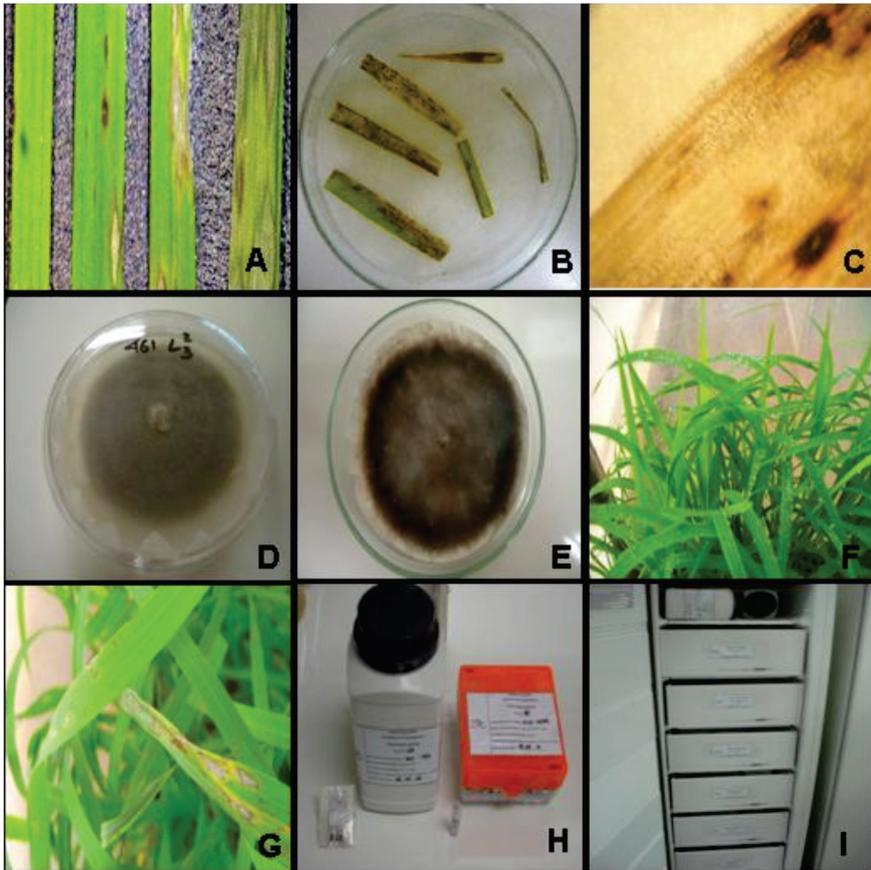


Figura 4. (A) Lesões esporulativas típicas de brusone em folhas de arroz; (B) Câmara úmida montada com folhas de arroz contendo lesões esporulativas típicas de brusone; (C) Visualização de lesões de brusone em folhas de arroz com a presença de conidióforos de *P. oryzae* originados após 48h em câmara úmida; (D) Crescimento micelial dos conídios de *P. oryzae* sobre meio de cultura ágar batata dextrose; (E) Papel de filtro contendo micélio seco de isolado de *P. oryzae*; (F) Plantas de arroz, 21 dias após o plantio, apresentando gotículas de inóculo, cinco minutos após a inoculação com suspensão de conídios de *P. oryzae*; (G) Planta de arroz apresentando sintomas de brusone, sete dias após a inoculação com *P. oryzae*; (H) Material utilizado para o armazenamento e a manutenção de isolados de *P. oryzae*, envelope de papel manteiga, criotubo e caixas de polipropileno com etiqueta contendo identificação do material: número do isolado, forma de armazenamento, data de manutenção, nome do responsável pela coleção, etc; (I) Freezer para manutenção da coleção sob temperatura de -10°C .

Determinação de patótipos

A determinação dos patótipos é realizada por meio da inoculação dos isolados obtidos e a avaliação da reação destes nas cultivares diferenciadoras nacionais e internacionais, executadas em condições controladas de casa de vegetação, com alta umidade e temperatura de 30 °C. São utilizadas oito cultivares diferenciadoras brasileiras: Carajás, Confiança, Maravilha, BRS Primavera, Progresso, Caiapó, IAC 47 e IAC 201 e oito cultivares diferenciadoras internacionais: Raminad, Zenith, NP 125, Usen, Dular, Kanto 51, Sha-tiao-tsao e Caloro (PRABHU; FILIPPI, 2006).

A inoculação das diferenciadoras é efetuada por meio da pulverização com uma suspensão de conídios com concentração definida em 3×10^5 conídios. mL⁻¹, realizada aos 21 dias após o plantio. O procedimento de pulverização deve ser continuado até que as plantas fiquem totalmente recobertas por gotículas de suspensão do inóculo (Figura 4F) (PRABHU; FILIPPI, 2006).

Noves dias após a inoculação é avaliada a extensão da reação das plantas ao inóculo. A avaliação foi efetuada nas folhas, utilizando-se escala visual de notas que vai de 0 a 9, baseando-se no tipo de reação/lesão (Figura 5). As plantas apresentando tipos de reação variando de 0 a 3 são consideradas como resistentes ou incompatíveis e de 4 a 9 são consideradas suscetíveis ou compatíveis (LING; OU, 1969; PRABHU; FILIPPI, 2006).

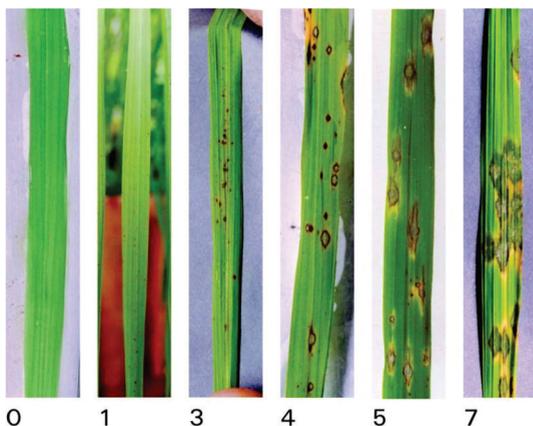


Figura 5. Escala de notas relativas aos tipos de lesões encontradas nas plantas com brusone.

Os dados obtidos com o conjunto de notas das diferenciadoras nacionais e internacionais são relacionados com a chave proposta por Ling e Ou (1969) e Prabhu e Filippi (2006), respectivamente, sendo determinado o patótipo do isolado obtido.

Registro do isolado na coleção

Os isolados com patótipo determinado são inseridos na coleção. Seu registro é feito pela inclusão das informações relevantes do isolado em banco de dados próprio, contendo as seguintes informações: nome da cultivar de origem, responsável pela coleta, local da coleta, tratamento submetido, patótipo, entre outras informações julgadas importantes (coordenadas de GPS, época de plantio, etc). Ressalte-se que nem todos os isolados da coleção possuem patótipo definido, principalmente os obtidos antes do ano 2000. Todavia, é possível fazer esta identificação pelos mesmos procedimentos apresentados na Figura 5.

Resultados e Discussão

Para demonstração dos trabalhos mais recentes da coleção de isolados de *M. oryzae*, foram recuperados os dados das coletas e isolamentos monospóricos realizados nos anos de 2009 e 2010 (até o mês de agosto) nas diversas amostras recebidas com sintomas de brusone.

Durante a safra 2008-2009 foram coletadas mais de 200 amostras (Figura 6). Os estados onde foram efetuadas as maiores coletas foram: Minas Gerais, Rondônia, Tocantins, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. A frequência de cada patótipo dos isolados obtidos, separados por estados, está representada nas Figuras 7 e 8 (respectivamente, safras 2008-2009 e 2009-2010). Nem todo material coletado apresentando sintomas de brusone é passível de isolamento. Muitas vezes, mais da metade do material coletado é perdido. Os principais fatores que levam a essa perda de material são: material submetido a tratamento químico (pulverização com fungicidas) e material contaminado com saprófitas, cuja população aumentou no decorrer do transporte do local de coleta ao laboratório, resultante das condições inadequadas de acondicionamento e transporte.

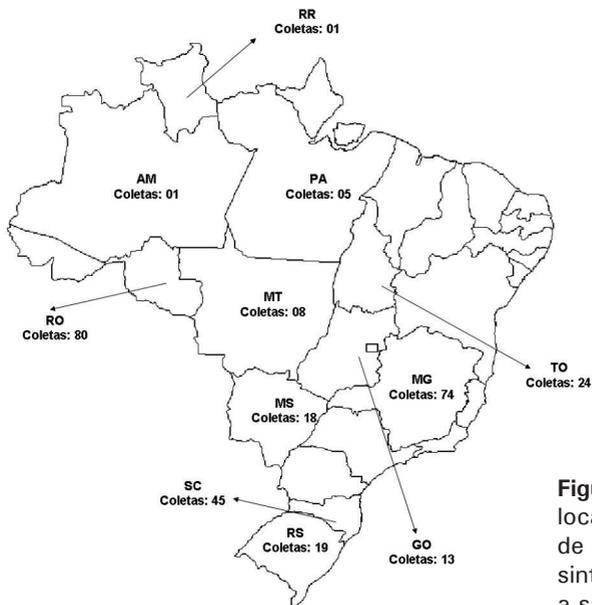


Figura 6. Mapa com localização das coletas de plantas de arroz com sintomas de brusone durante a safra 2008-2009.

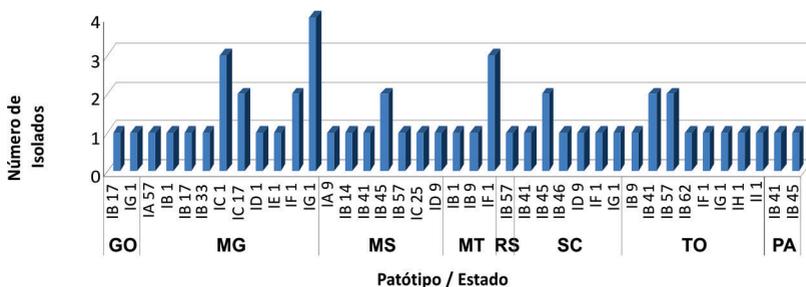


Figura 7. Frequência de patótipos obtidos, por estado brasileiro, safra 2008-2009.

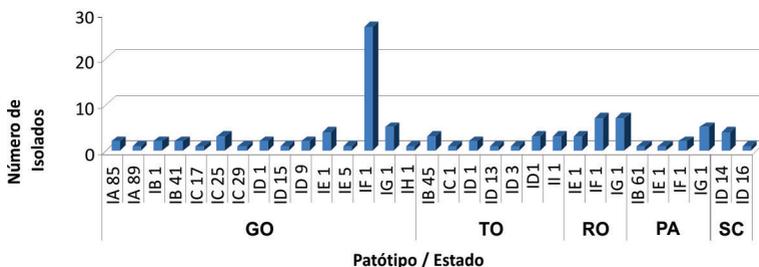


Figura 8. Frequência de patótipos obtidos, por estado brasileiro, ano 2009-2010 (até o mês de agosto/2010).

Conclusão

Com a metodologia citada, a equipe do Laboratório de Fitopatologia conseguiu obter ao longo de 35 anos mais de 10.000 isolados de *M. oryzae*, com alto grau de conservação e variabilidade patogênica, servindo como base para a pesquisa em brusone não somente na Embrapa Arroz e Feijão, como também em outras instituições.

O desafio atual é a implantação do banco de dados informatizado e um sistema de busca, disponível ao público interno e externo da Embrapa, com as informações mais relevantes aos usuários, futuramente inclusive com dados obtidos com o uso de marcadores moleculares.

Dessa forma, além de facilitar o acesso à informação contida no acervo para o público interno da empresa, também será facilitado o acesso à informação por outros grupos de pesquisa externos, contribuindo mais intensamente para o desenvolvimento da pesquisa relacionada ao patossistema arroz x *M. oryzae*.

Referências

- ABREU, M. M. V. de; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, DF, v. 2, n. 2, p. 236-251, 2004.
- HEBERT, T. T. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n. 1, p. 83-87, Jan. 1971.
- LING, K. C.; OU, S. H. Standardization of the international race numbers of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 3, p. 339-342, Mar. 1969.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. **Brusone em arroz**: controle genético, progresso e perspectivas. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 387 p.