

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM ARROZ CONTRA *Bipolaris oryzae* BREDA DE HANN, ATRAVÉS DA EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DE UM GENE DE QUITINASE

INDUCTION OF RESISTANCE IN RICE AGAINST *Bipolaris oryzae* BREDA DE HANN BY CONSTITUTIVE EXPRESSION OF ACHITINASE GENE

Maristela dos Santos REY¹; Daiane de Pinho BENEMAN²; Luciano da S. PINTO³; Fabio Sérgio Paulino da SILVA², Eugenia Jacira B. BRAGA²; Andréa B. MOURA¹, Carlos Roberto PIEROBOM¹; José A. PETERS²

1. Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário; 2. Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Cultura de Tecidos; 3. Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Biotecnologia

RESUMO: Este trabalho objetivou a transformação genética da cultivar de arroz BRS Taim, para obtenção de resistência ao fungo *Bipolaris oryzae*, agente da mancha parda. Para a transformação das plantas foi utilizada a cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com o plasmídeo pMOG 22 que codifica o gene da quitinase do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Mesocótilos de arroz foram imersos por 30 min. em solução bacteriana ($OD_{600} = 0,7$), contendo acetoceringona (100 Mm). Após os explantes foram co-cultivados por 72 horas em meio MS sem hormônio. Para seleção dos transformantes foi utilizado meio MS com 5 mg L⁻¹ de BAP e 15 mg L⁻¹ de higromicina, incubados a 25±1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram obtidas 5 plantas transformadas, perfazendo uma média de eficiência de transformação de 1,53 %. A resistência das plantas foi observada somente por um dos isolados. Os resultados permitem concluir que as plantas de arroz transformadas com o gene da quitinase (Chit 1) podem reduzir o desenvolvimento do fungo *B. oryzae*, porém existe uma diferença na reação entre isolados.

PALAVRAS-CHAVE: Doença. Patógeno. Mesocótilo. Quitinase.

INTRODUÇÃO

Plantas de arroz são atacadas por vários fungos que podem reduzir significativamente sua produção (MALAVOLTA et al., 2002) Atualmente, os mais importantes são *Pyricularia oryzae* Cavara e *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, sendo que este induz uma doença secundária causadora de manchas em grãos (BALARDIN; BORIN, 2001). Porém, nos últimos anos a ocorrência da mancha parda ou helmintosporiose causada pelo fungo *B. oryzae* vem aumentando, tendo assumido posição de doença economicamente importante devido à maior suscetibilidade da maioria das cultivares (MALAVOLTA et al., 2002).

O fungo *B. oryzae* é responsável por morte de plântulas e redução na produtividade quando incide em folhas e panículas (PRABHU; VIEIRA, 1999). O patógeno pode causar perdas de 30% no peso e 22% no número de grãos cheios por panícula, dependendo da cultivar considerada (PRABHU et al., 1980).

Associada ao estudo de medidas de controle mais eficazes, a engenharia genética vem apontando estratégias alternativas, como o desenvolvimento de plantas transformadas geneticamente resistentes (DATTA et al., 2000). Entretanto, a obtenção de

plantas transgênicas está intimamente ligada a bons protocolos de regeneração *in vitro* e também a disponibilidade de genes que confirmam resistência aos patógenos (KIM et al., 2003).

A maioria dos trabalhos relacionados à introdução de genes exógenos em plantas cultivadas sugere o uso de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PRPs) de origem vegetal, produzidas em resposta ao ataque de diferentes agentes fitopatogênicos. Neste caso, podemos citar as quitinases, β -glucanases e também, mais recentemente a osmotina, entre outras (MEDEIROS et al., 2003). Em outros casos os genes podem ser isolados de microrganismos, como aqueles que produzem proteínas capazes de interferir no desenvolvimento de insetos, inibindo a formação de quitina do exoesqueleto, como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* Metsch (BOGO et al., 1998). As proteínas exibem uma redução significativa dos sintomas de doenças fúngicas, mostrando inclusive, altos níveis de resistência em plantas transgênicas. Oldach et al. (2001) obteve plantas de trigo expressando uma quitinase de cevada, que mostrou-se eficiente em deter o desenvolvimento dos fungos *Sclerotinia clerotiorum* (Lib) De Bary e *Botrytis cinerea* Pers. Outros casos também são relatados na literatura com

resultados positivos em relação à resistência a patógenos e também a insetos com o uso de proteínas, como nas culturas da soja (ORNATOWSKI et al., 2004).

Assim, o objetivo deste estudo foi transformar geneticamente plantas de arroz (*Oryza sativa*) com o gene de uma quitinase (Chit 1) extraída do fungo entomopatogênico *Metarhiziumanisopliae*, a partir da organogênese direta de mesocótilos e, verificar a resistência destas plantas ao fungo *Bipolaris oryzae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal utilizou-se a cultivar BRS Taim de arroz (*Oryza sativa* L.) pertencente ao grupo indico, obtidas da Embrapa-Terras Baixas. Para a regeneração de brotos foram utilizados mesocótilos extraídos de sementes recém germinadas. Após a desinfestação com hipoclorito 1% por três minutos, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 2 mg L⁻¹ de ácido α -naftaleno acético (ANA) e mantidas no escuro, à temperatura de 28°C \pm 1°C, por 3 a 4 dias. Em seguida as plântulas foram seccionadas, retirando-se os coleótilos e a base dos tecidos meristemáticos, e isolando-se somente os mesocótilos com 0,2 cm de

comprimento. Para regeneração de brotos utilizou-se meio de cultura composto por sais e vitaminas de MS, acrescidos de 100 mg L⁻¹ demio-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose e 5 mg L⁻¹ de benziladenina (BAP). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 2 g L⁻¹ de gelrite e, posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C e 1,0atm por cerca de 15 min. Após a introdução dos explantes no meio de cultura, estes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 42 μ mol m⁻² s⁻¹, durante 45 dias.

Para a transformação foi utilizado o vetor pMOG 22 contendo um gene que codifica uma quitinase (Chit 1) do fungo *Metarhiziumanisopliae* (BOGO et al., 1998). O vetor contém o promotor 35S Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV) e o gene *hpt* que confere resistência ao antibiótico higromicina (ARAGÃO et al., 2002).

A construção (Figura 1) foi transferida por Choque Térmico segundo o protocolo de BRASILEIRO & CARNEIRO (1998) para a cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, sendo esta incubada por 3 dias à 28°Cno escuro. A confirmação da presença do gene nas colônias de *A. tumefaciens* foi realizada com o GFX™ Micro PlasmidPrep kit (GE Healthcare) de extração de plasmídeos.

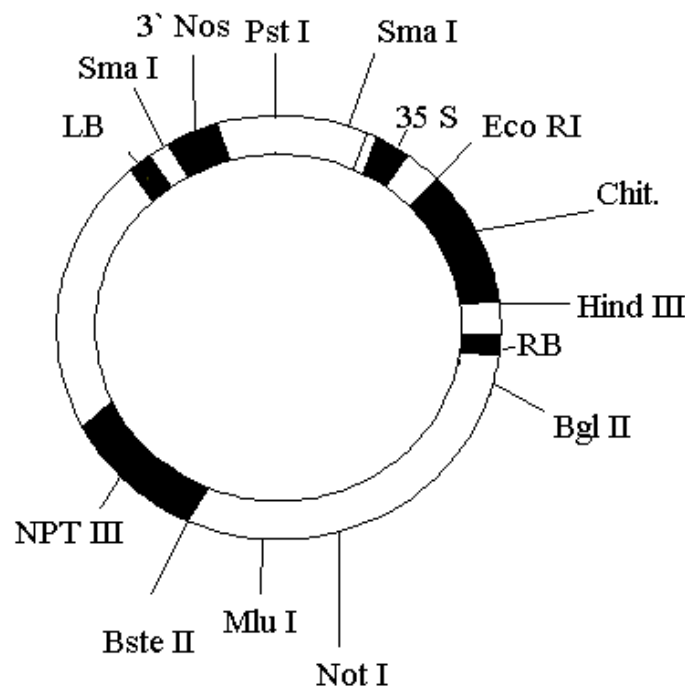


Figura 1. Mapa do plasmídeo pMOG 22 que codifica o gene da quitinase (Chit) do fungo entomopatogênico *Metarhiziumanisopliae*, que possui como promotor o gene 35 S do Mosaico do Vírus da Couve Flor (CaMV) e o gene *hpt* (higromicina). Pelotas, 2010.

Para a transformação das células dos explantes, uma colônia de *A. tumefaciens* transformada com o plasmídeo pMOG 22, foi repicada para um erlenmeyer de 100 mL contendo meio líquido LB (Luria Bertani- 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de triptona e 10 g L⁻¹ de cloreto de sódio, pH = 6,8) contendo 50 mg L⁻¹ de rifampicina, 50 mg L⁻¹ de canamicina e 100 µm de acetoceringona. As culturas permaneceram, sob agitação, a 150 rpm, em escuro por 16 horas, até obter-se uma OD₆₀₀ = 0,7. Após o crescimento da bactéria, os mesocótilos foram imersos, por 30 minutos na solução bacteriana, secos em papel-filtro, posteriormente transferidos para meio MS contendo 150 mg L⁻¹ de acetoseringona e incubados por 72 horas, no escuro, a temperatura de 23°C.

Após o co-cultivo, os explantes foram lavados com uma solução contendo 150 mg L⁻¹ de cefotaxima por 20 min., e transferidos para placas de petri com meio de seleção (MS contendo 5 mg L⁻¹ de benzilaminopurina e 20 mg L⁻¹ de higromicina), permanecendo neste por 45 dias. Este meio foi substituído a cada 15 dias, para evitar escapes (plantas sobreviventes ao antibiótico, mas que não continham o gene de interesse). Ao término deste período as brotações selecionadas foram transferidas para meio MS sem hormônio, acrescido de 60 g L⁻¹ de sacarose, para o enraizamento dos mesmos. Foram realizados três experimentos de transformação, sendo utilizados 50 explantes por ensaio, totalizando 150 explantes inoculados (sobreviventes do desenvolvimento em casa de vegetação).

A Análise molecular dos clones foi realizada através de PCR, utilizando-se DNA total extraído das plantas da G1 (plantas oriundas da transformação), em estágio vegetativo, com 21 dias de crescimento em casa de vegetação. A extração de DNA foi realizada conforme Ferreira e Grattapaglia (1998). Para a verificação da inserção do gene da quitinase nos clones obtidos, foram utilizados os *primers* que delimitavam uma região de 780 pb da seqüenciocodificante do gene da quitinase, tendo os *primers* seqüências 5' GGAGGGTGGACGTGGTCAAC 3' (MachFor) e 5' GCTGCCCAATCCCTTG 3' (MachRev). O ciclo do PCR consistiu de desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos à 50°C, 50 segundos a 72° e 7 minutos finais a 72°C. Com base no tamanho do fragmento, o produto de PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para verificar a resistência das plantas G1 ao fungo *B. oryzae*, foi elaborado um experimento com

folhas destacadas em caixas de gerbox (Bioteste). Foram utilizados fragmentos de folhas de 5 a 6 cm de comprimento extraído de 3 das 5 plantas transformadas (T21, T25 e T26) com aproximadamente 80 dias de desenvolvimento em casa de vegetação. Estes foram dispostos nas caixas sobre papel filtro umedecido com 10 mg L⁻¹ de cinetina. Foram alocadas 2 folhas por caixa e nas duas extremidades destas foram inoculados discos de micélio de 2 mm de diâmetro. As caixas foram incubadas a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Para avaliação foi usada um escala de notas de severidade onde: 0 = ausência total de sintomas; 1 = presença de micélio sem formação de colônia; 2 = presença de colônia; 3 = presença de colônia mais micélio; 4 = presença de colônia atingindo o papel filtro e 5 = presença de colônia atingindo o papel, micélio e início de esporulação. Realizaram-se duas avaliações, no segundo e quarto dias após a inoculação do fungo, prevalecendo à média das notas da última avaliação. Foram usados dois isolados do fungo *Bipolaris oryzae*, um da região de Pelotas e outro de Cachoeirinha (ambos do estado do Rio Grande do Sul). Como controle utilizou-se folhas de plantas não transformadas com os mesmos discos de micélio. Foram utilizadas quatro repetições de cada isolado e para a análise estatística foi realizado Teste de Médias de Scott Knott, em nível de 5% de probabilidade. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Para as análises foi utilizado o programa estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

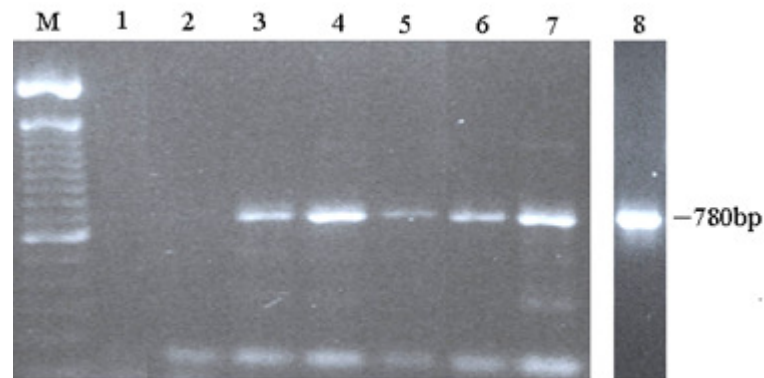
Mesmo utilizando concentrações de 20 mg L⁻¹ nos experimentos de transformação, ocorreu a regeneração de brotações no período de 45 dias após a infecção e co-cultivo dos explantes na solução de *Agrobacterium*. Verificou-se uma taxa de regeneração de 33,3% dos explantes, com 326 brotações, sendo que em apenas cinco delas foi confirmado a presença do gene inserido, representando uma eficiência de 1,53 % em relação ao total de brotações regeneradas (Tabela 1).

As plântulas regeneradas, após enraizamento *in vitro* foram transferidas para casa de vegetação. Através de PCR, verificou-se que apenas 5 clones (T20, T21, T23, T25 e T26) de um total de 150, amplificaram o fragmento correspondente ao gene da quitinase, com cerca de 780 pb (Figura 2).

Tabela 1. Percentual médio de regeneração de brotações e eficiência de transformação de mesocótilos de arroz, cv. BRS Taim.

Expl. por experimento	Expl. regenerantes	Regeneração %	Nº. Brotos regenerados	Nº. Brotos transformados	Efic. de transformação (%)
50	17	34	155	3	1,93
50	20	40	92	2	2,17
50	13	26	79	0	-
150	50	33,3*	326	5	1,53**

* Eficiência Média de regeneração; ** Eficiência Média de Transformação

**Figura 2.** Fragmentos amplificados das plantas transformadas, que codificam o gene da quitinase de *Metarhiziumanisopliae*. 1- Planta não transformada; 2- Mix PCR; 3(T20), 4 (T21), 5 (T23), 6(T25) e 7(T26)- Plantas positivas para o gene da quitinase; 8- vetor vazio (pMOG 22). Pelotas, 2010.

As plantas transformadas T21, T25 e T26 demonstraram diferentes notas de severidade, sempre evidenciando um atraso no desenvolvimento do fungo com relação à testemunha. A planta T25, mostrou menor lesão do fungo, obtendo um grau de severidade 2 (Figura 3); ou seja, observando-se apenas o desenvolvimento de colônias do fungo sobre as folhas. Já nas plantas T21 e T26, o fungo inoculado desenvolveu micélio e também formou colônia sobre a folha, ou seja, grau de severidade 3, nota inferior as determinadas nas plantas testemunhas.

Outro aspecto a ser salientado é que ocorreu um atraso no aparecimento dos sintomas quando utilizado somente o isolado Pelotas. Já para o isolado de Cachoeirinha, não foram observadas diferenças significativas em relação à planta não transformada.

O protocolo de transformação, utilizando mesocótilos como explantes e regeneração de brotações através de organogênese direta, foi consideravelmente rápido e eficiente, desde que foram obtidos brotos transformados num período

médio de 45 dias. Assim, a organogênese direta dos explantes, mostrou ser uma alternativa eficiente na transformação de plantas de arroz, pois foi obtido um maior número de brotos transformados. Isto também foi comprovado em estudo realizado por OGAWA et al. (2007), que verificaram maior eficiência de transformação genética nas culturas de tomate e tabaco quando utilizando o processo de organogênese direta, em relação a obtida em arroz, via calogênese.

A eficiência média de transformação obtida neste trabalho pode ser considerada baixa, quando comparado com outros resultados, como o de Banerjee et al. (2006) que obtiveram uma eficiência de transformação de 35,6% e Rachmawati et al., (2004) que demonstraram uma eficiência de transformantes de 23% para uma cultivar javânica de arroz.

A concentração de higromicina utilizada possibilitou o desenvolvimento de muitas brotações “escape” (brotos não transformados). A presença de escapes pode ser atribuída possivelmente pela ocorrência de proteção de células transformadas que

circundam células não transformadas na presença do

antibiótico (DEROLES; GARDNER, 1988).

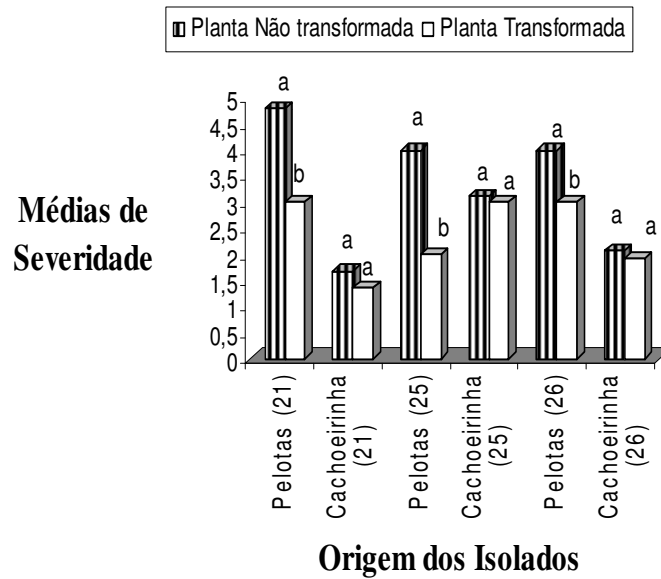


Figura 3. Médias de notas de severidade das plantas transformadas T21, T25 e T26 e plantas não transformadas de arroz, cv. BRS Taim, em relação à inoculação dos isolados do fungo *Bipolaris oryzae* originados de Pelotas e Cachoeirinha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

Vários trabalhos têm ratificado o efeito positivo do processo de transformação genética para a obtenção de plantas resistentes a patógenos. Jha e Chattoo(2010) demonstraram que plantas de arroz transformadas com o gene de resistência Rs-AP2 extraído de rabanete, evidenciaram uma supressão no desenvolvimento dos fungos *Magna porthegrisea* Cavara e *Rhizoctonia solani* Kuhn. Dong et al. (2007) trabalhando com plantas de arroz transformadas com o gene da β -1,3 glucanase obtiveram resistência aos fungos *Rhizoctoniasolanie Pyricularia oryzae*.

Com relação aos resultados dos testes de inoculação em folhas nas três plantas estudadas, apenas um isolado mostrou-se responsivo a resistência da planta ao fungo. Em resistência vertical, monogênica, tipicamente ocorre interação raça-cultivar, sendo que raríssimos são os casos de resistência a todas as raças atribuídas a apenas um gene. Um aspecto a ser mencionado é a grande variabilidade do fungo *B. oryzae*. MISRA (1985) demonstrou que isolados deste patógeno provocaram diferentes reações de resistência ou suscetibilidade, quando inoculados em uma variedade de arroz. Souza et al., (1984) também relataram que a inoculação de isolados em uma série de variedades cultivadas permitiu evidenciar a ocorrência de biótipos fortemente e fracamente virulentos. Por outro lado, segundo Moretti, (2006),

as proporções dos componentes da parede celular variam grandemente de fungo para fungo. Essa também pode ser uma hipótese para a diferença de reação entre os isolados do fungo *B. oryzae* nas plantas transgênicas. Além disso, fungos podem apresentar mecanismos de desativação de enzimas, além de outros tipos de defesa contra armas do hospedeiro.

Os resultados também indicaram graus de severidade que variaram de 2 a 3 para o isolado de Pelotas (Figura 4), nas três plantas estudadas, porém em todas foi observado um atraso no desenvolvimento do fungo em relação às plantas testemunhas.

Estes resultados concordam com Nishizawa et al., (1999), quando estes afirmam não terem obtido uma resistência total ao fungo *P. oryzae*, após transformarem plantas de arroz com diferentes genes de quitinases. Porém, corroborando com este estudo, ocorreu uma redução do ataque da doença comparando-se com a planta não transformada.

O atraso do desenvolvimento da doença nas plantas transgênicas poderia reduzir o número de aplicações de fungicidas no controle da doença a campo, mostrando-se como uma alternativa de redução de custos para o produtor e aumento da produtividade. Seria necessário também confirmar em condições de campo a resistência observada em folhas destacadas

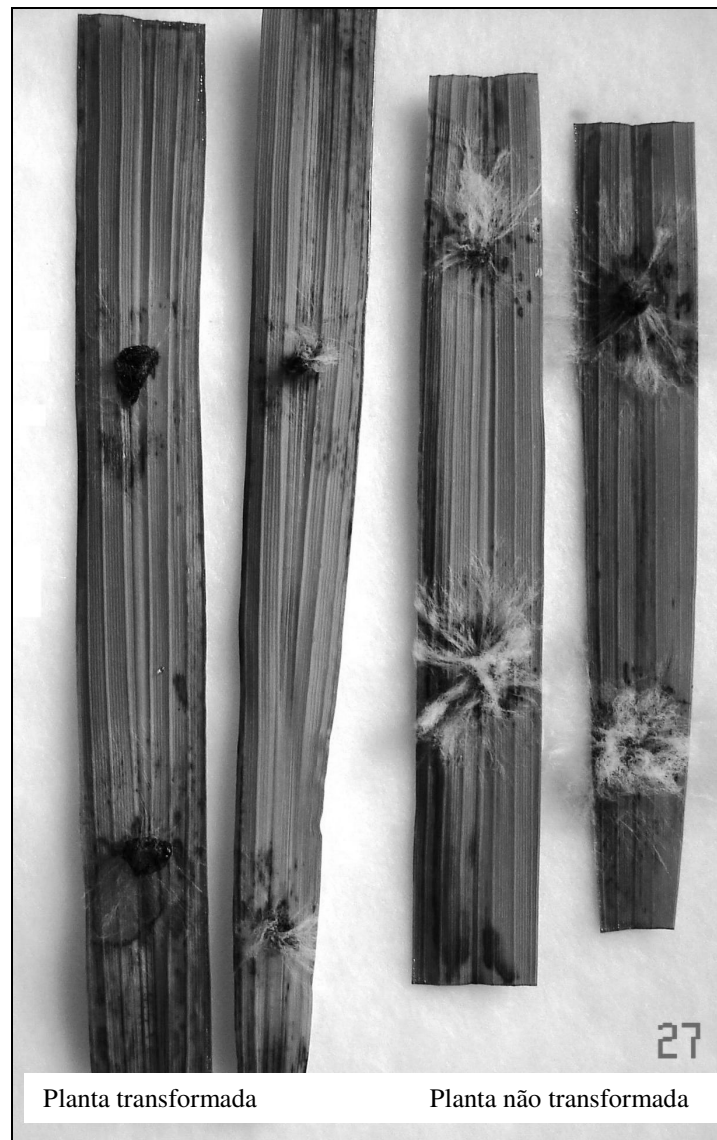


Figura 4. Reação dos fragmentos das plantas de arroz após o Teste de Inoculação do fungo *Bipolaris oryzae*, isolado Pelotas, inoculado na planta T25 (planta transformada) e planta não transformada. Pelotas, 2010.

ABSTRACT: This study aimed at a rice transformation for resistance to *Bipolaris oryzae* causal organism of Brown Spot, the cultivar BRS Taim and the line LBA 4404 of *Agrobacterium tumefaciens* transformed with plasmid pMOG 22 that codifies the chitinase gene *Metarhizium anisopliae* was used. Rice mesocotils immersed for 30 min in bacterial solution of $OD_{600} = 0,7$ with acetoceringone (100Mm), were co-cultivated for 72 hours in MS medium free of hormones and with 100Mm of acetoceringone. Mesocotils were then transferred to MS with $5mg L^{-1}$ de BAP and $15 mg L^{-1}$ of higromicin for 45 days at $25^{\circ}C$ and 16 lighth hours. The five transformed plants obtained (1,53 transformation rate) were inoculated with two *B. oryzae* isolates. Resistance was observed only with one of the isolates. The results indicate that rice plants transformed with chitinase gene (Chit 1) can reduce the colonization by some isolates of *B. oryzae*.

KEYWORDS: Pathogen. Disease. Mesocoptile. Chitinase.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, F. J. L.; SANTOS, M. O.; MORAIS, L. S; ROMANO, E. Transformação genética de plantas. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/179678/1/ct015.pdf>. Acesso em: 20 de janeiro de 2012.

- BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria: [s.n], 48p. 2001.
- BANERJEE, A. K.; SALOMÉ, P.; HANNAPPEL, D. J. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation. **Plant Science**, v. 170, p. 732-738, 2006.
- BOGO, M. R.; ROTA, C. A. PINTO, H. JR., OCAMPOS, M.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. A. Chitinase Encoding Gene (*chit1* Gene) from the Entomopathogen *Metarhiziumanisopliae*: Isolation and Characterization of Genomic and Full-Length cDNA. **Current Microbiology**, v. 37, p. 221–225, 1998.
- BRASILEIRO, A. C. M. E CARNEIRO, V. T. C. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: **Manual de transformação genética de plantas**. Ed. Embrapa, Brasília. Cap. 6, pág. 93-109, 1998.
- CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24. 2001.
- DATTA, K.; KOUKOLÍKOVÁ-NICOLA, Z. BAISAKH, N. OLIVA, N.; DATTA, S. K. *Agrobacterium*-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. **Theor Appl Genet**, v. 100, p. 832–839, 2000.
- DEROLES, S.; GARDNER, R. C. Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated *Agrobacterium* – mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, v. 11, p. 365-377, 1988.
- DONG, S.; TREDWAY, L. P.; SHEW, H. D. WANG, G-L.; SIVAMANI, E. Q. R. Resistance of transgenic tall fescue to two major fungal diseases. **Plant Science**, v. 173, p. 501–509, 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- KIM, J.; JANG, I-C.; WU, R.; ZUO, W-N.; BOSTON, R. S.; LEE, Y-H. AHN, I-P.; NAHM B. H. Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. **Transgenic Research**, v. 12, pag. 475–484, 2003.
- JHA, S.; CHATTOO, B. B. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. **Transgenic Research**, v. 19, pag. 373–384, 2010.
- MALAVOLTA, V. M. A.; PARISI, J. J. D.; TAKADA, H. M.; MARTINS, M. Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos, transmissão do patógeno às plântulas e produção. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 336-340, 2002.
- MEDEIROS, R. C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta patógeno. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 2003, 290 p.
- MISRA, A. K. Variability in *Dreschlera oryzae* - the causal organism of brown spot disease of rice. **Indian Phytopathology**, v. 38, p. 168-169. 1985.
- MORETTI, P. E. Fungos. Microbiologia, Saúde e Ambiente. Disponível em: http://www.fam.br/microrganismos/micologia_citologia.htm. Acesso em: maio de 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

- NISHIZAWA, Y.; NISHIO, Z.; NAKAZONO, K.; SOMA, M.; NAKAJIMA, E.; UGAKI, M.; HIBI, T. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 383–390, 1999.
- OGAWA, Y.; MII, M. Meropenem and moxalactam: Novel β -lactam antibiotics for efficient Agrobacterium-mediated transformation. **Plant Science**, v. 172, p. 564–572, 2007
- OLDACH, K. H.; BECKER, D. LORZ, H. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. **Molecular Plant – Microbe Interactions** v. 14, p. 832-838, 2001.
- ORNATOWSKI, W.; JAYARAJ, J.; TODD, T. C.; SCHAPAUGH, W. T.; MUTHUKRISHNAN, S.; TRICK, H. N. Introduction and constitutive expression of a tobacco hornworm (*Manduca sexta*) chitinase gene in soybean. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** v. 40, n. 3, p. 260–265, 2004
- PRABHU, A. S.; LOPES, A. M.; ZIMMERMANN, F. J. P. Infecção da folha e do grão de arroz por *Helminthosporium oryzae* e seus efeitos sobre os componentes de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v.15, p. 183-189, 1980.
- PRABHU, A. S.; VIEIRA, N. R. A. Sementes de arroz infectadas por *Drechslera oryzae*: germinação, transmissão e controle. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 39p. 1989.
- RACHMAWAT, D.; HOSAKA, T.; INOUE, E.; ANZAI, H. Agrobacterium-mediated transformation of javanica Rice cv. Rojoele. **Biosciences Biotechnology Biochemistry**, v. 68, p.1193-1200, 2004.
- SOUSA, N. R. Q.; RIBEIRO, A. S.; GALLI, J. Variabilidade do fungo *Helminthosporium oryzae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p. 1335-1343, 1984.