

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS E
ANTAGONISMO ENTRE *Waitea circinata* Warcup & Talbot E
PATÓGENOS DO ARROZ**

JACQUELINE CAMPOS BORBA DE CARVALHO

GOIÂNIA, GO - Brasil

2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ **Dissertação** ☒ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

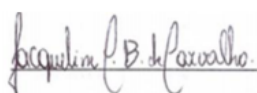
Nome completo do autor: Jacqueline Campos Borba de Carvalho

Título do trabalho: **Bioprospecção de moléculas bioativas e antagonismo entre *Waitea circinata* Warcup & Talbot e patógenos do arroz**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 26 / 06 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

JACQUELINE CAMPOS BORBA DE CARVALHO

**BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS E
ANTAGONISMO ENTRE *Waitea circinata* Warcup & Talbot E
PATÓGENOS DO ARROZ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como
exigência para obtenção do título de Doutora em
Agronomia e área de concentração em Fitossanidade.

Orientador(a):

Prof. Dra. Leila Garcês de Araújo

Coorientador(a):

Prof. Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi

Coorientador(a):

Prof. Dra. Lucília Kato

GOIÂNIA, GO - Brasil

2016

JACQUELINE CAMPOS BORBA DE CARVALHO

**Bioprospecção de moléculas bioativas e antagonismo entre *Waitea circinata*
Warcup & Talbot e patógenos do arroz**

Dissertação DEFENDIDA em 08 de julho de 2016, e APROVADA pela Banca
Examinadora constituída pelos membros:


Prof^ª. Dr^ª. Leila Garcês de Araújo
Presidente – ICB/UFG


Prof^ª. Dr^ª. Gisele Barata da Silva
Membro – UFRA


Prof. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto
Membro – IQ/UFG


Prof. Dr. Samuel Julio Martins
Membro – EA/UFG


Dr. Fábio José Gonçalves
Membro – Embrapa Arroz e Feijão

Goiânia – Goiás
Brasil

Carvalho, Jacqueline

Bioprospecção de moléculas bioativas e antagonismo entre Waitea circinata Warcup & Talbot e patógenos do arroz [manuscrito] /

Jacqueline Carvalho. - 2017.

CXXIII, 123 f.

Orientador: Prof. Dr. Leila Garcês; co-orientador Dr. Marta Filippi;
co-orientador Dr. Lucilia Kato.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Goiânia,
2017.

Bibliografia.

1. Arroz. 2. Biocontrole. 3. Produto Bioativo. 4. Doenças do Arroz. I.
Garcês, Leila, orient. II. Título.

CDU 631.4

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.”

(John Dewey)

Aos meus pais Fábio e Emilzabete pelo amor, carinho,
compreensão e dedicação.

DEDICO

Ao meu irmão Thiago que se sempre acreditou no
meu trabalho e tanto me ajudou. À minha avó Maria
que sempre esteve ao meu lado.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção, carinho, amor e bondade. Pelos momentos de alegria e conquistas que não seriam possíveis sem essa força espiritual e divina. Pelos ensinamentos, desafios e também pelos momentos ruins, pois estes nos fazem crescer, aprender e viver harmoniosamente. Pela saúde e força para continuar o trabalho mesmo diante de todos os percalços.

Ao Programa de Agronomia pela oportunidade, respaldo e zelo durante esse tempo. Agradeço a UFG, a Embrapa e ao CNPq pelo apoio financeiro e concomitante ao apoio intelectual.

Agradeço à Professora Leila Garcês pela confiança que tem depositado em meu trabalho. Pelos anos de orientação (desde o mestrado) e dedicação. Obrigada pelos ensinamentos e carinho. À professora Lucília Kato pelas valiosas dicas, ensinamentos e pelas conversas. Sempre vou lembrar-me desse jeito meigo, carinhoso e acolhedor. À professora Cristina Filippi pela compreensão, ensinamentos e toda a disposição em ajudar.

À Kellen Cristina pelas palavras de amizade, ajuda, carinho e pelos momentos de conforto. Sua alegria sempre foi minha inspiração e sua força minha vontade de prosseguir. Obrigada pelas sábias palavras e pelos conselhos. Ao Arthur Brandão pelos sorrisos e abraços. Já chegou e me encatou loucamente. À Denise Candine pelo companheirismo de todo dia. À Priscila Ferreira pela valiosa ajuda, pelas brincadeiras e por todo o carinho a mim depositado.

Sou grata a todas as pessoas que passaram pelo Laboratório de Genética de Microrganismos, principalmente ao Diogo Alfaix, Luís Paulo, Carlos Silva e Marcos Emílio. À vocês sou imensamente grata pelos momentos de distração, piadas, brincadeiras e por tornar o laboratório um local mais alegre.

Ao Laboratório de Produtos Naturais, nas pessoas de Vinícius e Marcelo. Obrigada pela ajuda no desenvolvimento da parte química do trabalho.

À Amanda Chaibub e Thatyane pela valiosa ajuda em muitos experimentos. Obrigada pelo carinho, atenção e pelos momentos de alegria. A todas as pessoas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão. Ao Márcio Côrtes sou grata pelos seus ensinamentos e cooperação nos experimentos.

Aos meus pais pela oportunidade de vida, pelo carinho, compreensão e pelos valiosos ensinamentos de amor e união. Ao meu irmão pela ajuda, pelas alegrias compartilhadas, pelos medos e anseios. Ao meu avô José Muniz pelas palavras sábias. A minha avó Maria pela lição de vida.

A todas as pessoas que tanto amo, obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO GERAL	14
GENERAL ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 ARROZ	18
2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS FÚNGICAS	19
2.2.1 Brusone	19
2.2.2 Mancha parda	20
2.2.3 Escaldadura	21
2.2.4 Podridão da bainha.....	21
2.2.5 Queima das bainhas e Mancha das bainhas.....	21
2.3 MANEJO INTEGRADO DA BRUSONE	22
2.3.1 Controle biológico.....	23
2.3.1.1 Antibiose	24
2.4 FUNGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS.....	26
2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS.....	27
2.6 TÉCNICAS QUÍMICAS	29
2.6.1 Ressonância Magnética Nuclear	29
2.6.2 Espectrometria de massas	30
2.6 REFERÊNCIAS.....	32
3 PERFIS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS DE <i>Waitea circinata</i> E BIOCONTROLE DE <i>Magnaporthe oryzae</i>	46
RESUMO 46	
ABSTRACT 47	
3.1 INTRODUÇÃO	48
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.2.1 Caracterização bioquímica de <i>Waitea circinata</i>	50
3.2.2 Caracterização enzimática de <i>Waitea circinata</i>	52

3.2.3	Potencial efeito e termoestabilidade <i>in vitro</i> do micélio de <i>Waitea circinata</i> na inibição do crescimento micelial de <i>Magnaporthe oryzae</i>	53
3.2.4	Germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Magnaporthe oryzae</i> pelo micélio de <i>Waitea circinata</i>	54
3.2.5	Supressão da brusone foliar pelo micélio de <i>Waitea circinata</i>	54
3.2.6	Potencial efeito de metabólitos não-voláteis de <i>Waitea circinata</i>	55
3.2.7	Obtenção dos extratos e análise por Cromatografia em Camada Delgada.....	56
3.2.8	Análise dos extratos de <i>W. circinata</i> em ESIQ-TOF.....	57
3.2.9	Obtenção dos compostos do Extrato da massa micelial (EMM).....	58
3.2.10	Potencial efeito <i>in vitro</i> do extrato da massa micelial de <i>Waitea circinata</i> na inibição do crescimento micelial de <i>M. oryzae</i>	58
3.2.11	Germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Magnaporthe oryzae</i> pelo extrato da massa micelial e pelos compostos de <i>Waitea circinata</i>	58
3.2.12	Potencial efeito <i>in vivo</i> do micélio, extratos e compostos na supressão da brusone foliar	59
3.2.13	Análise estatística	60
3.3	RESULTADOS	51
3.3.1	Caracterização bioquímica e enzimática de <i>Waitea circinata</i>	51
3.3.2	Potencial efeito e termoestabilidade <i>in vitro</i> do micélio de <i>Waitea circinata</i> na inibição do crescimento micelial de <i>Magnaporthe oryzae</i>	54
3.3.3	Germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Magnaporthe oryzae</i> pelo micélio de <i>Waitea circinata</i>	55
3.3.4	Supressão da brusone foliar pelo micélio de <i>Waitea circinata</i>	56
3.3.5	Potencial efeito de metabólitos não-voláteis de <i>Waitea circinata</i>	58
3.3.6	Obtenção dos extratos	59
3.3.7	Análise por Cromatografia em Camada Delgada dos extratos de <i>Waitea circinata</i> .	59
3.3.8	Análise dos extratos de <i>W. circinata</i> em ESIQ-TOF.....	61
3.3.9	Potencial efeito <i>in vitro</i> do extrato da massa micelial de <i>Waitea circinata</i>	64
3.3.10	Potencial efeito <i>in vivo</i> do micélio, extrato e compostos na supressão da brusone foliar	66
3.4	DISCUSSÃO	68
3.5	CONCLUSÕES	73
3.6	REFERÊNCIAS.....	74
4	INTERAÇÃO ENTRE <i>Waitea circinata</i> E PATÓGENOS DO ARROZ: AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO, EXTRATOS BIOATIVOS E PRODUÇÃO DE ENZIMAS LÍTICAS	80

RESUMO	80
4.1	INTRODUÇÃO 82
4.2	MATERIAL E MÉTODOS 84
4.2.1	Pareamento entre <i>Waitea circinata</i> e os patógenos do arroz 84
4.2.2	Potencial efeito de metabólitos voláteis e não-voláteis de <i>Waitea circinata</i> 85
4.2.3	Potencial efeito e termoestabilidade <i>in vitro</i> do micélio de <i>Waitea circinata</i> na inibição do crescimento micelial dos patógenos do arroz 86
4.2.4	Caracterização enzimática de <i>Waitea circinata</i> 87
4.2.5	Potencial efeito <i>in vitro</i> dos extratos de <i>Waitea circinata</i> na inibição do crescimento micelial dos patógenos do arroz 89
4.2.6	Análise estatística 89
4.3	RESULTADOS 90
4.3.1	Pareamento entre <i>Waitea circinata</i> e os patógenos do arroz 90
4.3.2	Potencial efeito de metabólitos voláteis e não-voláteis de <i>Waitea circinata</i> 92
4.3.3	Potencial efeito e termoestabilidade <i>in vitro</i> do micélio de <i>Waitea circinata</i> na inibição do crescimento micelial dos patógenos do arroz 93
4.3.4	Caracterização enzimática de <i>Waitea circinata</i> 94
4.3.5	Potencial efeito <i>in vitro</i> dos extratos de <i>Waitea circinata</i> na inibição do crescimento micelial dos patógenos do arroz 98
4.4	DISCUSSÃO..... 100
4.5	CONCLUSÕES 106
4.6	REFERÊNCIAS.....107

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Ciclo de <i>Magnaporthe oryzae</i> na folha de arroz	22
Figura 3.1	Obtenção dos extratos de <i>Waitea circinata</i> (EB: Extrato Bruto; EL: Extrato Liofilizado e EM: Extrato Micelial)	58
Figura 3.2	Obtenção do extrato da massa micelial (EMM) de <i>Waitea circinata</i>	59
Figura 3.3	Concentração de Ácido indol acético (AIA) em <i>Waitea circinata</i> .	63
Figura 3.4	Área da colônia (mm ²) de <i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>in vitro</i> , pela massa micelial de <i>Waitea circinata</i> (A) e não-voláteis (B). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey (p=0.05)	67
Figura 3.5	Efeito de <i>Waitea circinata</i> na germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Magnaporthe oryzae</i> . A e B) Micélio; C e D) Extrato da massa micelial; E e F) Compostos do extrato da massa micelial. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey (p=0.05)	68
Figura 3.6	Supressão de brusone foliar por <i>Waitea circinata</i> . A) Massa micelial; B) Extratos - EB: extrato bruto e EMM: extrato da massa micelial; C) Massa micelial, extratos e compostos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey (p=0.05)	69
Figura 3.7	Cromatografia em camada delgada analítica com sistema eluente Acetato de etila: Metanol (95:5 v/v) dos extratos de <i>Waitea circinata</i> : extrato da massa micelial (EMM), extrato micelial (EM), extrato bruto (EB), extrato liofilizado (EL). A: Visualização em luz ultravioleta (UV) à 254 nm. B: Visualização com solução de anisaldeído. C: Visualização com solução de ácido sulfúrico/metanol	71
Figura 3.8	Cromatografia em camada delgada analítica com sistema eluente Diclorometano: Metanol: Ácido acético glacial (95: 4,5: 0,5 v/v) dos extratos de <i>Waitea circinata</i> : extrato da massa micelial (EMM), extrato micelial (EM), extrato bruto (EB), extrato liofilizado (EL). A: Visualização em luz ultravioleta (UV) à 254 nm. B: Visualização com solução de anisaldeído. C: Visualização com solução de ácido sulfúrico/metanol	72
Figura 3.9	Espectro de massas ESI (+) Q-TOF do extrato da massa micelial de <i>Waitea circinata</i>	73
Figura 3.10	Espectro de massas ESI (+) Q-TOF do extrato liofilizado de <i>Waitea circinata</i>	74

Figura 3.11	Espectro de massas ESI (+) Q-TOF do extrato micelial de <i>Waitea circinata</i>	75
Figura 3.12	Espectro de massas ESI (+) Q-TOF do extrato bruto de <i>Waitea circinata</i>	76
Figura 3.13	Área da colônia de <i>Magnaporthe oryzae</i> na presença do extrato da massa micelial	77
Figura 4.1	A) Área da colônia dos patógenos do arroz. B) Área da colônia dos patógenos rhizoctonioides do arroz. Barra Branca: Pareamento de <i>W. circinata</i> frente aos patógenos do arroz. Barra Preta: Efeito inibitório de metabólitos voláteis de <i>Waitea circinata</i> . En07: <i>Waitea circinata</i> ; Mono: <i>Monographella albescens</i> ; Saro: <i>Sarocladium oryzae</i> ; Ho: <i>Cochliobolus miyabeanus</i> ; Ro88/Ro93: <i>Rhizoctonia oryzae</i> ; Rh24F1: <i>Rhizoctonia solani</i> . Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey (p=0.05)	78
Figura 4.2	Efeito inibitório de metabólitos não-voláteis de <i>Waitea circinata</i> . A) Área da colônia dos patógenos do arroz. B) Área da colônia dos patógenos rhizoctonioides do arroz. Barra Branca: Método de Celofane. Barra Preta: Método do Filtrado. En07: <i>Waitea circinata</i> ; Mono: <i>Monographella albescens</i> ; Saro: <i>Sarocladium oryzae</i> ; Ho: <i>Cochliobolus miyabeanus</i> ; Ro88/Ro93: <i>Rhizoctonia oryzae</i> ; 4F1: <i>Rhizoctonia solani</i> . Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey (p=0.05)	79
Figura 4.3	Área da colônia dos patógenos do arroz na presença dos extratos da micorriza. A) Área da colônia de <i>Cochliobolus miyabeanus</i> ; B) Área da colônia de <i>Monographella albescens</i> ; C) Área da colônia de <i>Sarocladium oryzae</i> ; D) Área da colônia de <i>Rhizoctonia solani</i> - Rh24F1; E) Área da colônia de <i>Rhizoctonia oryzae</i> - Ro88; F) Área da colônia de <i>Rhizoctonia oryzae</i> - Ro93. EB - Extrato bruto; EL - Extrato liofilizado; EM - Extrato micelial; EMM - Extrato da massa micelial. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey (p=0.05)	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Atividade específica de glucanase, quitinase e protease (U mg^{-1}) de <i>Waitea circinata</i> em presença da parede celular de <i>Magnaporthe oryzae</i> ..	64
Tabela 3.2	Atividade específica de glucanase, quitinase e protease (U mg^{-1}) de <i>Waitea circinata</i> em co-cultivo com <i>Magnaporthe oryzae</i>	65
Tabela 3.3	Progresso da brusone aos 4, 6 e 8 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i> e três diferentes concentrações da massa micelial de <i>Waitea circinata</i>	70
Tabela 3.4	Progresso da brusone aos 4, 6 e 8 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i> e extratos (EB – extrato bruto e EMM – extrato da massa micelial) de <i>Waitea circinata</i>	106
Tabela 3.5	Progresso da brusone aos 4, 6 e 8 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i> , extratos (EB – extrato bruto e EMM – extrato da massa micelial) e massa micelial (T2) de <i>Waitea circinata</i>	106
Tabela 4.1	Área da colônia (mm^2) dos patógenos do arroz, in vitro, pela massa micelial de <i>Waitea circinata</i>	108
Tabela 4.2	Atividade específica de glucanase, quitinase e protease (U mg^{-1}) de <i>Waitea circinata</i> em presença da parede celular dos patógenos do arroz ...	109
Tabela 4.3	Atividade específica de glucanase (U mg^{-1}) de <i>Waitea circinata</i> em co-cultivo com os patógenos do arroz	110
Tabela 4.4	Atividade específica de quitinase (U mg^{-1}) de <i>Waitea circinata</i> em co-cultivo com os patógenos do arroz	111
Tabela 4.5	Atividade específica de protease (U mg^{-1}) de <i>Waitea circinata</i> em co-cultivo com os patógenos do arroz	111

RESUMO GERAL

CARVALHO, J. C. B. Bioprospecção de moléculas bioativas e antagonismo entre *Waitea circinata* Warcup & Talbot e patógenos do arroz. 2016. 117 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.¹

O arroz é um dos cereais mais importantes do mundo, porém sua produtividade é afetada por doenças fúngicas como a brusone, mancha parda, escaldadura, podridão da bainha, queima da bainha e mancha da bainha. Fungos micorrízico, como *Waitea circinata* são capazes de produzir metabólitos secundários que podem ser utilizados no controle desses patógenos. Objetivou-se avaliar o potencial de *Waitea circinata* e de seus metabólitos secundários no antagonismo para os patógenos do arroz. O isolado micorrízico foi caracterizado bioquimicamente e enzimaticamente (parede celular e co-cultivo). Avaliou-se a eficiência do micélio micorrízico assim como seus extratos e compostos na inibição do crescimento micelial, da germinação de conídios e da formação de apressórios de *Magnaporthe oryzae* (M.o.) O pareamento, a eficiência de metabólitos voláteis e não-voláteis, e a eficiência do micélio de *Waitea circinata* para os demais patógenos do arroz foi realizado em dois ensaios. Quatro extratos de *W. circinata* (bruto, micelial, liofilizado e da massa micelial) foram obtidos e utilizados nos ensaios *in vitro* com os patógenos. Também foram conduzidos ensaios em casa de vegetação com o micélio, extratos e compostos da micorriza para a supressão da brusone foliar. *W. circinata* produziu AIA *in vitro* e apresentou atividade enzimática de glucanase, quitinase e protease quando em cultivo com a parede dos patógenos e em co-cultivo. O micélio micorrízico inibiu o crescimento micelial de todos os patógenos do arroz, *in vitro*. O isolado micorrízico foi eficiente na produção *in vitro* de metabólitos voláteis e não-voláteis reduzindo o crescimento micelial de *Sarocladium oryzae* em 94% e 53%, respectivamente. O micélio da micorriza na concentração 10 g/L reduziu o crescimento de *M. oryzae* em 97% e se mostrou eficiente e ativo mesmo após autoclavado, pois reduziu em 93%, 77%, 7% e 4% a área da colônia de *Cochliobolus miyabeanus*, *Monographella albescens*, e *Rhizoctonia oryzae* - Ro93 e Ro88, respectivamente. Em casa de vegetação, o micélio (10g/L En07 + M.o.) suprimiu a brusone foliar em 83%. Os metabólitos não-voláteis de *W. circinata* inibiram em 48% o crescimento de *M. oryzae*. A análise por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) mostrou que o extrato da massa micelial (EMM), extrato bruto (EB) e extrato liofilizado (EL) possuem o mesmo perfil químico que pode ser atribuída à

esfinganina. O EMM (700 µg/mL) 24 horas após a instalação do ensaio reduziu a formação de apressórios de *M. oryzae* em 75%. Em casa de vegetação, EMM + M.o. suprimiu a severidade de brusone foliar em 77% e reduziu a AACPD em 92%. Os resultados do presente estudo indicam que *W. circinata* é promissor no biocontrole das doenças do arroz *in vitro*.

Palavras-chave: Arroz; Biocontrole; Produto bioativo; Doenças do arroz.

¹Orientador: Prof. Dra. Leila Garcês de Araújo, EA-UFG.

Coorientador: Prof. Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi, Embrapa.

Coorientador: Prof. Dra. Lucília Kato, IQ-UFG.

GENERAL ABSTRACT

CARVALHO, J. C. B. Bioprospecting of bioactive molecules and antagonism between *Waitea circinata* Warcup & Talbot and rice pathogens. 2016. 117 f. Tesis (Doctorate in Agronomy) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.¹

Rice is one of the most important cereal in the world, but its productivity is affected by fungal diseases such as blast, brown spot, scald, sheath rot, sheath blight and stain of the sheath. Mycorrhizal fungi are capable of producing secondary metabolites that can be used to control pathogens. This study aimed to evaluate the potential of isolated mycorrhizal and their secondary metabolites in antagonism to the rice pathogens. The isolate mycorrhizal was characterized biochemically (cell wall and co - cultivation). We evaluated the mycorrhizal mycelia efficiency as well as their extracts and compounds in the inhibition of the mycelial growth, spore germination and formation of appressorium *Magnaporthe oryzae*. The efficiency of the pairing of volatile and non - volatile metabolites, and the efficiency of mycelium of *Waitea circinata* to other rice pathogens it was conducted in two trials. Four extracts of *W. circinata* (crude, mycelial, lyophilized and mycelial mass) were obtained and used in *in vitro* assays with pathogens. The tests for the suppression of leaf blast were also conducted in the greenhouse with the mycelium, extracts and mycorrhiza compounds. The completely randomized design was used for all tests. *W. circinata* produces Indolacetic Acid *in vitro* and showed enzymatic activity of glucanase, chitinase and protease when in cultivation with wall of the pathogens and co -cultivation. The mycorrhizal mycelia inhibited the mycelial growth of all rice pathogens *in vitro*. The isolated mycorrhizal was efficient *in vitro* production of volatile and non- volatile metabolites reducing mycelial growth of *Sarocladium oryzae* 94.41% and 53%, respectively. The mycelium of mycorrhiza to the concentration 10 g / L reduced the growth of *M. oryzae* by 97.92 % and has been effective and active even after autoclaving reducing the area of the colony by 93.53%, 77.30%, 31.07% and 4.42 % of *Cochliobolus miyabeanus* , *Monographella albescens* and *Rhizoctonia oryzae* - Ro93 and Ro88, respectively. In greenhouse the mycelium of mycorrhiza (10g/L En07 + M.o.) suppressed leaf blast at 83.89 %. Non- volatile metabolites of *W. circinata* inhibited in 48.95 % growth of *M. oryzae*. The analysis of spectrometric high resolution mass (HRMS) showed that the extract from the mycelial mass (MME), crude extract (CE) and lyophilized extract

(LE) had the same chemical profile that can be attributed to sphinganine. The MME (700 / mL) at 24 hours after installation of the test reduced the formation of appressorium of *M. oryzae* in 75.71 %, respectively. In the greenhouse, MME + M.o. suppressed the severity of leaf blast in 77.01 % and reduced AUDPC by 92.38 %. The results of this study indicate that the MME *W. circinata* is promising in biocontrol of the rice diseases.

Key words: Rice; Disease rice; Secondary metabolites; Biological control; Mycorrhiza.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um componente essencial da cesta básica de muitos brasileiros e é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo (FAO, 2015). A produtividade é afetada pela ocorrência de doenças, como a brusone (*Magnaporthe oryzae*), mancha parda (*Cochliobolus miyabeanus*), escaldadura (*Monographella albescens*), podridão da bainha (*Sarocladium oryzae*), queima da bainha (*Thanatephorus cucumeris*) e mancha da bainha (*Rhizoctonia oryzae*).

O controle das doenças do arroz deve ser feito adotando-se o manejo integrado, que requer um conjunto de práticas que tem como componentes a resistência genética das cultivares, as práticas culturais e o controle químico. Assim, um dos desafios da agricultura é aumentar a produção das culturas com sustentabilidade e um método que pode ser somado ao controle químico é o uso de fungos de controle biológico (BCFs) e promotores de crescimento vegetal. O uso do biocontrole diminui os resíduos químicos nos alimentos e no ambiente (Mizubuti & Maffia, 2009). Dessa forma, os BCFs controlam fitopatógenos, promovem resistência a estresses abióticos e aumentam a eficiência de uso do nitrogênio pelas plantas, proporcionando uma produção mais sustentável (Shoresh et al., 2010; Zhang & Li, 2012). Em arroz, *Epicoccum* sp. (Sena et al., 2013) e *Cladosporium* sp. (Chaibub et al., 2016 - no prelo), demonstraram antagonismo e indução de resistência à *M. oryzae*, *in vivo*.

Os fungos micorrízicos podem aumentar a produção das culturas, reduzir o uso de fertilizantes e proporcionar a recuperação de solos degradados, contribuindo para uma agricultura mais sustentável. Além disso, estes fungos durante a interação com plantas produzem metabólitos secundários que poderão ser usados no controle biológico de doenças de plantas (Siqueira et al., 2002). O gênero *Rhizoctonia* sp. (*Waitea circinata*) é produtor de metabólitos secundários, como alcaloides (Schneider et al., 1982; Harris et al., 1987; Pedras et al., 2005), esteroides como ergosterol (Ma et al., 2004; Aliferes & Jabaji et al.

2010; Liang et al., 2015) e sitostenona (Liang et al., 2015) que são capazes de inibir o crescimento de microrganismos e dessa forma, elicitar rotas metabólicas de defesa.

Em trabalho anterior, Carvalho et al. (2015) mostrou que *Waitea circinata* inibiu *M. oryzae*, *in vitro*. Seu extrato bruto inibiu a formação de apressórios em 100% e foi eficiente em suprimir a doença em condições de casa de vegetação. Ao estudarem quimicamente os compostos presentes no extrato bruto observaram a presença de benzofenonas, que podem ser os componentes ativos contra *M. oryzae*.

Assim, os objetivos do estudo foram: 1) Caracterizar *Waitea circinata* bioquimicamente; 2) Avaliar o efeito inibitório de metabólitos não-voláteis produzidos pelo isolado micorrízico; 3) Avaliar o potencial do micélio micorrízico e extrato da massa micelial no antagonismo *in vitro* e *in vivo* à *M. oryzae*; 4) Bioprospectar moléculas ativas do extrato da massa micelial capazes de elicitar rotas metabólicas no antagonismo, *in vitro* e *in vivo* para *M. oryzae*; 5) Avaliar o potencial do isolado micorrízico e dos seus extratos no antagonismo *in vitro* para os patógenos do arroz (*Magnaporthe oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Monographella albescens*, *Sarocladium oryzae*, *Rhizoctonia oryzae* e *Rhizoctonia solani*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ARROZ

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence ao Domínio Eukarya, Reino Plantae, Filo Magnoliophyta, Classe Liliopsida, Ordem Poales, Família Poaceae, Gênero *Oryza*, e a espécie mais conhecida e estudada é *Oryza sativa*. É um dos cereais mais consumidos no mundo e constitui-se como principal alimento para mais da metade da população mundial (FAO, 2015).

O arroz se destaca pela produtividade e área de cultivo (Fageria et al., 1991). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016), estima-se uma produção de 11.2 milhões de toneladas na safra 2015/2016 e abaixo do volume da safra 2014/2015. Essa produtividade é afetada pela ocorrência de doenças, destacando-se aquelas causadas por fungos, como a mancha parda (*Cochliobolus miyabeanus*), a podridão da bainha (*Sarocladium oryzae*), a escaldadura (*Monographella albescens*), a queima da bainha (*Thanatephorus cucumeris*) e principalmente a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*.

A incidência de doenças é um dos principais fatores que causam reduções na produtividade e qualidade dos grãos. Os danos diretos são redução no peso, número de grãos por panícula e mancha nos grãos, enquanto os indiretos são redução na produtividade e custo elevado devido a aplicação de defensivos (Scheuermann, 2015). Com o objetivo de diminuir as perdas de rendimento na produção do arroz, a aplicação de fungicidas no Brasil tem-se intensificado. Desse modo, o uso de indutores de resistência como estratégia para aumentar a durabilidade da resistência à doença reduzindo o uso de produtos químicos torna-se essencial para o cultivo do arroz (Filippi et al., 2006).

2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS FÚNGICAS

2.2.1 Brusone

A brusone, cujo agente causal é o fungo *Magnaporthe oryzae* B. Couch [anamorfo - *Pyricularia oryzae* Cav.] é uma das doenças mais disseminadas em todas as regiões do mundo em que o arroz é cultivado (Ebbola, 2007; Malavolta et al., 2008; Prabhu et al., 2009; Wilson & Talbot, 2009; Fernandez & Wilson, 2012; Fisher et al., 2012). Sua forma perfeita pertence ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Hemiascomycetes, Ordem Diaphortales, Família Magnaphortaceae (Mycobank, 2016). É um patógeno policíclico (Ou, 1985) e hemibiotrófico que pode atacar as plantas de arroz em todas as fases de desenvolvimento, podendo infectar folhas, caules, colmos, bainhas e panículas (Wilson & Talbot, 2009).

Os sintomas nas folhas iniciam-se com a formação de pequenas lesões necróticas, de coloração marrom e centro cinza ou esbranquiçado. Em condições favoráveis, as lesões coalescem causando morte das folhas e, muitas vezes, da planta inteira (Prabhu et al., 1989; Prabhu & Filippi, 2006). Os fatores climáticos, como temperatura variando entre 20 e 25 °C e umidade relativa do ar superior a 93% favorecem um rápido desenvolvimento da doença (Prabhu et al., 2002b).

O ciclo de vida de *M. oryzae* tem início com a produção dos conídios, geralmente liberados e disseminados durante a noite. Depois de fixados no hospedeiro, os conídios germinam e formam o tubo germinativo. Na extremidade do tubo germinativo inicia-se a diferenciação celular que leva a formação da célula gancho, um inchaço considerado como início da formação do apressório, estrutura desenvolvida por vários fungos para penetrar a superfície foliar do hospedeiro. Posteriormente, a penetração ocorre na epiderme da folha do hospedeiro através do rompimento da cutícula da planta e formação da hifa de infecção. Após 72 horas da inoculação, as lesões começam a aparecer e crescem em tamanho e número até coalescerem (Prabhu & Filippi, 2006; Figura 2.1).



Figura 2.1 Ciclo de *Magnaporthe oryzae* na folha de arroz (Ramos, 2009).

A brusone apesar de ser uma doença endêmica pode tornar-se epidêmica quando as condições ambientais são favoráveis. O uso de cultivares resistentes é um dos métodos mais eficientes de controle da doença, o principal componente do manejo integrado da brusone e a necessidade básica para o melhoramento do arroz (Prabhu & Filippi, 2001; Araújo & Prabhu, 2004; Malavolta et al., 2008). Em condições propícias, o patógeno pode ocasionar epidemias e a perda da produtividade pode chegar a aproximadamente 100% da cultura (Prabhu et al., 2009). Os prejuízos advindos da doença dependem do grau de resistência da cultivar, da época de incidência, das práticas culturais e das condições climáticas (Prabhu et al., 1999; Dario et al., 2005).

2.2.2 Mancha parda

A mancha parda é causada pelo fungo necrotrófico *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi)] (Ou, 1985; Kim et al., 2014). O patógeno pode causar perdas de 30% na massa e 22% no número de grãos cheios por panícula, dependendo do cultivar (Prabhu et al., 1980) e

pode ocorrer tanto em arroz irrigado quanto em sequeiro (Scheuermann, 2015). A doença é favorecida por temperaturas entre 20 e 30 °C e por umidade relativa do ar elevada (maior que 89%). O estresse por excesso ou falta de água, a baixa fertilidade do solo e o uso de nitrogênio em níveis muito altos ou muito baixos aumentam a suscetibilidade da planta à doença (Scheuermann, 2015).

2.2.3 Escaldadura

O fungo necrotrófico *Monographella albescens* (Thümen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth (*Metasphaeria albescens* Thümen), forma imperfeita *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) é causador da escaldadura e provoca perdas na produtividade de até 30% (Ou, 1985; Filippi et al., 2005). Manifesta-se com maior intensidade nas Regiões Norte e Centro-Oeste, tanto em arroz irrigado quanto em sequeiro (Scheuermann, 2015). Esta doença pode ocorrer nas folhas, colmo e panículas e se manifestar nas fases de perfilhamento e emborrachamento (Prabhu & Filippi, 1997). As condições climáticas favoráveis para a incidência da escaldadura das folhas são alta pluviosidade, temperatura variando entre 24 e 28 °C, períodos prolongados de orvalho, alta densidade de plantas e adubação nitrogenada em excesso (Ou, 1985).

2.2.4 Podridão da bainha

Sarocladium oryzae (Sawada) W. Gams & D. Hawksw (1976) (basônimo *Acrocylindrium oryzae* Sawada (1922) e sinônimo *Cephalosporium caerulens* Matsumae, Kamio & Hata (1963) / *Sarocladium attenuatum* W. Gams & D. Hawksw (1976) (Ou, 1985; Lobo et al., 2011), é o agente causal da podridão da bainha do arroz que pode ocorrer tanto no sistema irrigado quanto no de terras altas (Lobo et al., 2011).

2.2.5 Queima das bainhas e Mancha das bainhas

A queima das bainhas é provocada pelo fungo necrotrófico *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) cujo anamorfo é *Rhizoctonia solani* Kuhn que pode gerar perdas de 30% no número de grãos/panícula e de até 100% da cultura, além de ser a segunda doença de maior importância do arroz (Prabhu et al., 2002a; Zhao et al., 2008).

A queima pode ocorrer tanto em sistema irrigado quanto de terras altas (Nunes et al., 2004). A mancha da bainha por sua vez é causada pelo patógeno necrotrófico *Rhizoctonia oryzae* Ryker & Gooch (*Waitea circinata* Warcup & Talbot). Estas são doenças de difícil controle, pois apresentam um grande número de plantas hospedeiras, além de apresentar estruturas de resistência denominadas escleródios, que podem sobreviver no solo por vários anos ((Prabhu et al., 2002a). O cultivo de arroz sucedido por hospedeiros desse fungo leva à continuidade do ciclo do patógeno e ao aumento de fontes de inóculo. Alguns fatores agravam a incidência e severidade da queima das bainhas, como a utilização excessiva de adubação nitrogenada, alta densidade de plantas e plantio de cultivares de ciclo precoce e de alto perfilhamento (Nunes et al., 2004).

2.3 MANEJO INTEGRADO DA BRUSONE

Para um controle eficiente da brusone se faz necessária a utilização de um manejo integrado, o qual tem como objetivo o aumento da quantidade e da qualidade do produto por meio da redução da população do patógeno à níveis toleráveis (Prabhu et al., 2002b). Além disso, requer a resistência genética da cultivar, principal componente no manejo integrado da brusone (Prabhu & Filippi, 2001), práticas culturais e controle químico. Também os danos causados pelos métodos utilizados para o controle da doença devem ser mínimos ao ambiente e à saúde humana (Prabhu et al., 2002b).

Práticas culturais como a nutrição das plantas, preparo do solo, substituição de cultivares e irrigação adequada, diminuem o inóculo e conseqüentemente, o estabelecimento da doença (Dias Neto, 2008). O tratamento do arroz com fungicida torna-se um método essencial no controle da brusone do arroz, quando o grau de resistência da cultivar não é eficaz (Prabhu & Filippi 2006).

O manejo da doença visa ao estabelecimento de um balanço entre a doença e a cultura no campo com o objetivo de prevenir ações desfavoráveis e, dessa forma, envolve um conjunto de práticas agronômicas com práticas de controle biológico (Gonçalves et al., 2012). A combinação de antagonistas e fungicidas pode ser um dos meios de se otimizar o seu uso, aumentando a sua eficiência e permitindo a inserção do controle biológico em um sistema de manejo integrado de doenças (Duffy, 2000; Sanjay et al., 2008).

2.3.1 Controle biológico

A definição de controle biológico, segundo Méndez & Mondino (1999), é o uso de microrganismos antagônicos que, de alguma forma, interferem na vida dos patógenos ou no desenvolvimento de atividades determinantes da doença, tornando-se uma estratégia sustentável para a proteção de plantas (Chan et al., 2003). O controle biológico é uma medida de controle que pode ser somada ao controle químico, possibilitando a diminuição do número de aplicações de fungicidas (Melo & Azevedo, 1988; Kupper et al., 2003), e que quando inserido no manejo integrado pode assegurar uma agricultura sustentável resultando em uma maior viabilidade econômica (Lahlali & Hijri, 2010).

O biocontrole abrange a interação entre patógeno, hospedeiro e microrganismos não patogênicos, sob a influência do ambiente (Melo & Azevedo, 1988). Este pode ser alcançado por práticas que favoreçam os microrganismos nativos ou selecionados pelas propriedades antagônicas (Angonese et al., 2009). O controle biológico possui vantagens e desvantagens em relação ao controle químico. A principal vantagem é a ausência de resíduos químicos nos alimentos e no ambiente. Já a desvantagem é a ineficiência do antagonista contra alguns patógenos (Mizubuti & Maffia, 2009), e a reprodução dos resultados em condições de campo nem sempre ser consistente (Bedendo et al., 2011).

O controle biológico com o objetivo de estudar a relação entre a ecologia e os seus mecanismos de ação pode atuar como uma alternativa para a redução de agroquímicos no controle de fitopatógenos (Lanna Filho et al., 2010). Além disso, o conhecimento sobre métodos de controle da doença que sejam seguros ainda é restrito (Côrtes et al., 2014).

Alguns gêneros de fungos são considerados importantes agentes de biocontrole de doenças de plantas assim como de atenuar o estresse abiótico. Os benefícios ocorrem devido a capacidade destes agentes de reprogramar a expressão de genes na planta, possivelmente através da ativação de um número limitado de rotas metabólicas no hospedeiro (Shoresh et al., 2010). Os fungos micorrízicos favorecem a absorção de água e nutrientes pelas plantas e podem constituir uma barreira física para patógenos, atuando como supressores de doenças em plantas (Cruz et al., 2005). Já

existem relatos que a simbiose com fungos micorrízicos desencadeiam alterações sistêmicas na expressão gênica e conferem maior resistência a brusone (Campos-Soriano et al., 2011).

Segundo Mizubuti & Maffia (2009) existem diferentes mecanismos para que um organismo possa exercer o controle biológico sobre os patógenos, como a antibiose, competição, hiperparasitismo, indução de resistência, alelopatia e hipovirulência. Em arroz, de acordo com Filippi et al. (2011) o uso de indutores bióticos e abióticos de resistência é uma das principais estratégias de controle biológico da brusone do arroz para aumentar a durabilidade da resistência e reduzir os resíduos tóxicos provocados pelos fungicidas.

Além disso, outros mecanismos de ação foram observados no controle biológico de fitopatógenos, como a produção de enzimas hidrolíticas, produção de compostos antifúngicos voláteis e não voláteis, indução de resistência, produção de sideróforos e compostos promotores de crescimento vegetal, além de micoparasitismo (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006).

Na presente revisão será detalhado o mecanismo de biocontrole de antibiose por ser um dos objetos de estudo do trabalho.

2.3.1.1 Antibiose

Para Mizubuti & Maffia (2009) a antibiose é a produção, por parte de um microrganismo, de compostos tóxicos para outros microrganismos que inibem o crescimento ou levam a morte do patógeno. Ainda de acordo com Kupper et al. (2003), os microrganismos que desempenham-se como antagônicos possuem um amplo espectro de ação por inibirem o crescimento micelial pela produção de substâncias tóxicas.

Durante o processo da antibiose ocorre a interação entre organismos, em que a produção de metabólitos, principalmente antibióticos, por um destes microrganismos tem um efeito prejudicial sobre o outro. Essa produção pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular, e independe do contato físico entre os microrganismos (Bettiol & Ghini, 1995). Dessa forma, os antibióticos produzidos na antibiose suprimem o crescimento e a germinação de outros microrganismos (Owley & Windham, 2010).

São vários os fungos que já tiveram sua propriedade antagonista comprovada. De acordo com Almança (2008), microrganismos específicos quando

introduzidos no ambiente podem proporcionar efeitos benéficos nas plantas, como no crescimento e desenvolvimento. Muitos agentes de biocontrole são produtores de compostos antibióticos ou metabólitos secundários (Punja & Utkhede, 2003). Segundo Barra et al. (2007), são vários os grupos de pesquisas que buscam, selecionam e testam microrganismos capazes de controlar enfermidades de plantas.

Fungos que decompõem substâncias celulósicas são encontrados no solo, colonizando vegetais e reciclando nutrientes (Ruegger & Tauk-Tornisielo, 2004), além de que sua característica patogênica pode ser sugerida pela caracterização de enzimas extracelulares (Silva et al., 2006). As enzimas líticas presentes na parede celular dos microrganismos são muito utilizadas no biocontrole de doenças de plantas. Os fungos produtores de quitina podem inibir o crescimento de muitas doenças fúngicas e dessa forma, podem contribuir para a formulação de biofungicidas e assim contribuir para uma agricultura mais sustentável (Brzezinska et al., 2014). Lopes et al. (2012) ao avaliar a produção enzimática por isolados de *Trichoderma* na presença da parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* concluiu que todos os isolados testados secretaram as enzimas glucanase, quitinase e protease.

Muitos microrganismos possuem a capacidade de produzir o ácido-indol-acético (AIA) que é responsável por promover o crescimento das raízes e aumento de pelos radiculares, o que pode melhorar a absorção de nutrientes e água elevando o crescimento da planta (Raven et al., 2001; Taiz & Zeiger, 2004). Filippi et al. (2011) ao observar que quatro de 18 isolados de Rhizobactérias produziam AIA puderam concluir que estes estimularam o aumento da biomassa, tamanho das raízes e parte aérea do arroz. Oliveira et al. (2012) observaram que todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados foram capazes de produzir AIA tanto na presença quanto na ausência do percussor L-triptofano.

Os fungos de controle biológico também podem produzir fósforo que, por sua vez, pode atuar como um mecanismo de ação dentro do controle biológico. O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o metabolismo dos organismos e apesar de ser encontrado em grande quantidade no solo, boa parte é indisponível às plantas. Assim, por mecanismos de solubilização e mineralização, os microrganismos são capazes de aumentar a disposição de fosforo às plantas. Diversos microrganismos do solo solubilizam diferentes formas de fosfatos inorgânicos e entender essa capacidade e eficiência pode facilitar a seleção de isolados com potencial para inoculação em plantas (Souchie et al., 2005). Segundo Cattelan (1999) a adição de fosfato insolúvel ao meio o

torna turvo e, dessa forma, os organismos capazes de solubilizar esse fosfato produzem halo claro ao redor de suas colônias. De acordo com Silva Filho & Vidor (2000), a intensidade de solubilização de fosfato pode ser influenciada por fatores como, as condições de realização do trabalho e o tipo de microrganismo utilizado.

Outro mecanismo de ação utilizado no controle biológico de fitopatógenos é a produção de sideróforos pelos antagonistas. Sideróforos são metabólitos de baixo peso molecular produzidos por alguns microrganismos em condições limitantes de ferro. Tem-se relatado o uso de sideróforos na agricultura por meio do aumento de crescimento das plantas e como biofertilizantes visando ao aumento da concentração de micronutrientes em grãos destinados ao consumo humano (Benite et al., 2002).

Dentre os antagonistas mais estudados para os mais variados tipos de patógenos, principalmente para *Sclerotium rolfsii*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Alternaria* spp. e *Bipolaris sorokiniana* estão a bactéria *Bacillus* sp. (Remuska & Pria, 2007; Angonese et al., 2009) e o fungo *Trichoderma* (Martins-Corder & Melo, 1988; Melo & Azevedo, 1988; Silva et al., 1999; Remuska & Pria, 2007; Carvalho et al., 2008; Carvalho et al., 2011; Silva et al., 2012). Fungos e bactérias antagonistas e/ou indutores de resistência à *M. oryzae* em arroz já foram descritos na literatura (Kawamata et al., 2004; Araújo et al., 2010; Filippi et al., 2011; Li et al., 2011; Gonçalves et al., 2012; Sena et al., 2013; Carvalho et al., 2015).

2.4 FUNGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS

A família Orchidaceae inclui, aproximadamente, 35.000 espécies e 800 gêneros, e é a maior dentro do grupo das angiospermas (Faria et al., 2012). Essa família pertence à Ordem Asparagales, Classe Liliopsida, Divisão Magnoliophyta, ao Reino Plantae e ao Domínio Eukarya (Pereira & Ribeiro, 2004).

As espécies da família Orchidaceae estabelecem associações mutualísticas com fungos micorrízicos formando a associação micorrízica de orquídeas com o objetivo principal de aumentar a absorção de nutrientes (Peterson et al., 2004). Além disso, os fungos micorrízicos oferecem às orquídeas aumento na absorção da água, de nutrientes essenciais, como fósforo, zinco, manganês e cobre, e também as protegem contra o ataque por fungos patogênicos e nematoides (Raven et al., 2001).

Segundo Ogoshi (1987) o gênero *Rhizoctonia* sp. foi descrito em 1815 por De Candolle, e a espécie *R. solani* é a mais conhecida por ser um fitopatógeno de importância agrícola e florestal. *Rhizoctonia* sp. engloba espécies micorrízicas, fitopatogênicas e saprófitas (Agarwall, 2010). Sabe-se que o gênero *Rhizoctonia* sp. pode ocorrer em associação endofítica com espécies florestais, como por exemplo *Pinus* spp. (Sen et al., 2002), e também em associações micorrízicas com *Epidendrum nocturnum* (Sousa, 2012).

São poucos os trabalhos encontrados na literatura sobre uso de fungos rizoctonioides micorrízicos de orquídeas utilizados no biocontrole de fitopatógenos. Mosquera-Espinosa et al. (2013) avaliaram a patogenicidade de isolados micorrízicos de orquídeas de *Ceratobasidium* spp. em arroz e verificaram que alguns isolados produziram sintomas de queima da bainha, mas com incidência significativamente menor que na testemunha (*R. solani*). Entre os isolados de orquídeas *Ceratobasidium* spp. e *Tulasnella* spp., não houve diferença quanto a incidência de queima da bainha. Os autores também estudaram o biocontrole de *R. solani* em plantas de arroz com isolados de *Ceratobasidium* spp. de orquídeas, e verificaram que quando os isolados de *Ceratobasidium* spp. foram pulverizados em plântulas de arroz três dias antes da inoculação de *R. solani* houve redução significativa da severidade da doença.

2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS

O estudo dos metabólitos de um microrganismo em uma determinada condição biológica chama-se metabolômica. O metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorrem em uma célula e os metabólitos são compostos químicos formados, degradados ou transformados (Rasmussen et al., 2012). Os metabólitos podem ser divididos em primários e secundários. Os primários são essenciais para o crescimento vegetativo dos organismos e estão relacionados com funções nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, absorção de nutrientes e diferenciação celular (Taiz & Zeiger, 2004).

Por outro lado, os metabólitos secundários dividem-se em três grupos principais que são os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados. Os terpenos constituem o maior grupo de metabólitos secundários e têm funções específicas na defesa da planta contra herbívoros, enquanto os compostos fenólicos

constituem um grupo heterogêneo com cerca de 10.000 compostos que defendem as plantas contra herbívoros e patógenos, atraem polinizadores de frutos e protegem contra a radiação (Taiz & Zeiger, 2004). Já os compostos nitrogenados incluem aminoácidos, alcaloides, aminas e glicosídeos cianogênicos (Sepúlveda-Jiménez et al., 2004). Os alcaloides são compostos capazes de atuar no controle biológico de pragas, além de apresentarem atividade antimicrobiana (Schwan-Estrada et al., 2004).

Os microrganismos associados às plantas são capazes de produzir metabólitos que podem ser encontrados nas plantas realizando diversas funções, como algumas micromoléculas bioativas (destruxinas e estrobilurinas) que são utilizadas como defensivos naturais (Pinto et al., 2002). Os estudos nessa área estão voltados para o isolamento de metabólitos de fungos endofíticos, micorrízicos e, principalmente de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Para Finlay (2004) as interações simbióticas entre plantas e fungos micorrízicos podem influenciar no ambiente de várias formas como no biocontrole de fitopatógenos, crescimento das plantas, transporte de nutrientes, entre outros. No entanto, sabe-se que a extração de metabólitos de fungos micorrízicos de orquídeas ainda é um processo novo e que pode integrar o controle biológico de plantas.

Alguns microrganismos, como os fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas, são capazes de produzir metabólitos que podem ser de natureza volátil ou não volátil (Lobo Junior & Abreu, 2000). Alguns autores testaram a eficiência desses voláteis, *in vitro*, contra vários patógenos como relatado por Silva et al. (2012); Qualhato et al. (2013) e Isaias et al. (2014).

Vários são os metabólitos isolados de endófitos, como exemplo tem-se a talaroxantona obtida do micélio do fungo *Talaromyces* sp. (Koolen et al., 2013). De acordo com os autores, a xantona é responsável pela pigmentação amarelada da estirpe. Pastre et al. (2007) detectaram em uma cepa de *Penicillium* isolada de *Murraya paniculata* a presença de uma metilxantona e observaram por espectrometria de massas que a substância isolada tem uma massa molecular de 258 Da. Em trabalho semelhante, foram isolados derivados de xantona com atividade antitumoral para isolados de *Penicillium* sp. (Sato et al., 1997). Outros endófitos já foram relatados quanto a produção de benzofenonas, como isolados de *Daldinia concentrica* (Hashimoto et al., 1994) e *Emericella nidulans* (Kawahara et al., 1994).

Ainda são escassos os estudos descritos na literatura referentes ao uso dos metabólitos produzidos por microrganismos no controle de *M. oryzae*. Côrtes et al.

(2014) ao avaliarem a ação da cerulenina produzido por *Sarocladium oryzae* sobre o desenvolvimento de *M. oryzae*, observaram a inibição do desenvolvimento micelial decorrente da atividade antifúngica do metabólito e afetou a formação do apressório. Assim, cerulenina tem grande potencial como bio-fungicida no controle da brusone do arroz. Khalil et al. (2014) ao estudarem os compostos brutos obtidos a partir do cultivo de *Streptomyces flavotricini* em meio líquido observaram que após sete dias de crescimento houve redução do crescimento de *Pyricularia grisea* através da formação de zonas de inibição. Carvalho et al. (2015) observaram que os metabólitos secundários presentes no extrato bruto de *Waitea circinata* reduziram a formação de apressórios de *M. oryzae* em 100%, e a severidade de brusone foliar em 25% quando comparado ao controle.

O gênero *Rhizoctonia* sp. é um grande produtor de metabólitos secundários, como alcaloides (Scnheider et al., 1982; Harris et al., 1987; Pedras et al., 2005), esteroides como ergosterol (Ma et al., 2004; Aliferes & Jabaji 2010; Liang et al., 2015) e sitostenona (Liang et al., 2015). Dessa forma, torna-se importante o estudo químico dos extratos produzidos por esses isolados fúngicos com ênfase no seu uso no controle de doenças de plantas.

2.6 TÉCNICAS QUÍMICAS

Como exemplo de tecnologias que podem auxiliar na metabolômica tem-se a ressonância magnética nuclear (RMN), a qual é possível obter informações sobre o esqueleto carbono-hidrogênio da substância; a espectrometria de massas, a fórmula molecular de uma substância, e até certas características estruturais (Bruice, 2006). Além de oferecer uma combinação de seletividade, sensibilidade e alta precisão (Lei et al., 2011). A espectrometria, ao contrário da RMN, não requer radiação eletromagnética (Bruice, 2006). Embora sejam distintas, a RMN e a espectrometria de massas baseiam-se na absorção da energia por uma molécula, e as duas medem a resposta da molécula à esta absorção (Carey, 2011).

2.6.1 Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN foi desenvolvida para estudar os núcleos atômicos e suas propriedades. A designação “RMN”, de modo geral, significa RMN ^1H (ressonância magnética nuclear de hidrogênio), já que os núcleos de hidrogênio (prótons) foram os primeiros núcleos estudados pela ressonância magnética nuclear. Mais tarde, espectrômetros para RMN ^{13}C , RMN ^{15}N , RMN ^{19}F , RMN ^{31}P e outros núcleos magnéticos foram desenvolvidos. A RMN torna possível identificar a funcionalidade de um carbono específico e também permite determinar com que os carbonos vizinhos se parecem. A estrutura inteira de uma molécula, muitas vezes, pode ser determinada pela espectroscopia (Bruice, 2006).

2.6.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas fornece o peso molecular e a fórmula, da molécula em si e das diversas unidades estruturais inseridas. Uma pequena amostra da substância é introduzida na espectrometria de massas, em um instrumento chamado espectrômetro. Neste instrumento ocorre a volatilização e posterior ionização como resultado da remoção de um elétron de cada molécula (Carey, 2011).

O espectrômetro de massas registra um gráfico da abundância relativa de cada fragmento plotado contra o seu valor de m/z (o espectro de massas). Como a carga (z), em todos os fragmentos que atingem a placa coletora, é +1, o m/z representa a massa molecular (m) do fragmento. Cada valor de m/z é a massa molecular nominal do fragmento – a massa molecular relativa ao número inteiro mais próximo. O pico de maior valor de m/z no espectro é relativo ao fragmento que resulta da retirada de um elétron de uma molécula 38 da amostra injetada. Ou seja, o pico com maior valor de m/z representa o íon molecular (M). O valor de m/z do íon molecular fornece a massa molecular da substância. Os picos com valores menores de m/z – chamados picos de fragmento iônico – representam os fragmentos carregados positivamente da molécula (Bruice, 2006).

Um avanço da EM foi o desenvolvimento de novas fontes de ionização à pressão atmosférica, como *Electrospray Ionization* (ESI) e *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) que não precisam de vácuo para gerar os íons. Com o desenvolvimento de novos métodos de ionização e de analisadores de alta resolução

como o *Time of Flight* (TOF) uma ampla gama de compostos químicos passaram a ser analisados por EM.

2.6 REFERÊNCIAS

AGARWALL, D. K. *Rhizoctonia* D.C.: Taxonomy, Ecology and Management. In: MUKERJII, K. G.; MANOHARACHARY, C. (Ed.). **Taxonomy and Ecology of Indian Fungi**. 2010. 4 cap.

ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. ¹H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia. **Metabolomics**, v. 6, p. 96-108, 2010.

ALMANÇA, M. A. K. **Aspectos da interação arroz-*Trichoderma* spp. em solos alagados**. 2008. 69 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ANGONESE, M. T.; DELLA GIUSTINA JÚNIOR, L. H. P.; PANSEIRA, M. R.; PAGNO, R. S.; MEZZOMO, F.; ZORZI, E.; PEREIRA, C. O. F.; RIBEIRO, R. T. S. Efeito Fungistático de *Bacillus* Spp. sobre Fungos Fitopatogênicos. **Revista Brasileira De Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 97, 2009.

ARAÚJO, L.; PRABHU, A. S. Resistência parcial à brusone em somaclones da cultivar de arroz CICA-8. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 29, n. 4, p. 394-398, 2004.

ARAÚJO, L. G.; MENDANHA, R. A.; GONÇALVES, F. J.; SILVA, G. B.; FILIPPI, M. C. C.; PRABHU, A. S. Antibiose de fungos do filoplano de plantas de arroz a *Magnaporthe oryzae*. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia-GO, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2010.

BARRA, R.; FERRAZ, H.; MACAGNAN, D.; SILVA, H.; MOURA, A.; HALFELD-VIEIRA, B.; MENDONÇA, H.; VIEIRA JÚNIOR, J. Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. II. **Summa Phytopathologyca**, v. 34, p. 121-126, 2008.

BEDENDO, I. P.; MASSOLA JR, N. S.; AMORIM, L. Controle cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA, 2011. p. 367-387. 17 cap.

BENITE, A. M. C.; DE PMACHADO, S.; DA CMACHADO, B. Sideróforos: " uma Resposta dos Microorganismos". **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1155-1164, 2002.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.

BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current microbiology**, v. 68, n. 1, p. 71-81, 2014.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. Tradução: Débora Omena Futuro, Alessandra Leda Valverde, Carlos Magno Rocha Ribeiro, Estela Maris Freitas Muri, Maria Behrens, Thelma de Barros Machado. 4 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 20006.

CAMPOS-SORIANO, L.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SEGUNDO, B. S. The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 6, p. 579-592, 2012.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. Tradução: Kátia A. Roque, Jne de Moura Menezes, Telma Regina Matheus; Revisão Técnica: Gil Valdo José da Silva. v. 1. 7 ed. Porto Alegre: AMGH, 2011.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa-MG, v. 36, n. 1, p. 028-034, 2011.

CARVALHO, D. D. C. C.; OLIVEIRA, T.; BRAÚNA, L.; MELLO, S. **Isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *Fusarium oxysporum***. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008, 5 p. Circular Técnica 178.

CARVALHO, J. C. B.; SOUSA, K. C. I.; BRITO, D. C.; CHAIBUB, A. A.; LUZINI, A. P.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; FILIPPI, M. C. C. F.; KATO, L.; VAZ, B. G.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; ARAÚJO, L. G. Biocontrol potential of *Waitea circinata*, an orchid mycorrhizal fungus, against the rice blast fungus. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 151-159, 2015.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja. Documentos**, 1999.

CHAN, Y.-K.; MCCORMICK, W. A.; SEIFERT, K. A. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 4, p. 253-262, 2003.

CHAIBUB, A.A.; CARVALHO, J.C.B.; SILVA, C.S.; COLLEVATTI, R.G.; GONÇALVES, F.J.; CÔRTEZ, M.V.C.B.; FILIPPI, M.C.C.; FARIA, F.P.; LOPES, D.C.B.; ARAÚJO, L.G. Defence responses in rice plants in prior and simultaneous applications of *Cladosporium* sp. during leaf blast suppression. Environmental Science and pollution research. No prelo.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: sétimo levantamento**, abril 2016. Brasília. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_07_08_59_54_boletim_graos_a_gosto_2014.pdf>.pdf. Acesso em: 18/Maio/2016.

CÔRTEZ, M. V.; SILVA-LOBO, V. L.; FILIPPI, M. C.; LIMA, D.; PRABHU, A. S. Potential for using crude extract of *Sarocladium oryzae* for suppression of rice blast. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 28-34, 2014.

CRUZ, J. C. S.; DE MELO ROCHA, M.; JUNIOR, O. C. Saúde ambiental: microrganismos de solo e o controle de fitopatógenos. **O Mundo da Saúde-São Paulo**, v. 29, n. 2, p. 252-257, 2005.

DARIO, G. J. A.; MANFRON, P. A.; BONNECARRÉRE, R. A. G.; NETO, D. D.; MARTIN, T. N.; CRESPO, P. E. N. Controle químico de brusone em arroz irrigado. **Revista da FZVA**, v. 12, n. 1, 2005.

DIAS NETO, J. J. **Magnaporthe grisea: Biologia e identificação de patótipos isolados de plantas de arroz na região tropical do Brasil**. 2008. 97 f. Mestrado (Mestrado em Produção Vegetal)–Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2008.

DUFFY, B. Combination of pencycuron and *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 for integrated control of rhizoctonia root rot and take-all of spring wheat. **Crop Protection**, v. 19, n. 1, p. 21-25, 2000.

EBBOLE, D. J. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 45, p. 437-456, 2007.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Biomedical and Life Sciences**, v. 47, n. 1, p. 25-35, 2006.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; JONES, C. A. **Growth and mineral nutrition of field crops**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1991. 624p.

FAO. **Situación alimentaria mundial**. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 18/Maio/2016.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina-PR: Mecenias, 2012, 124 p.

FERNANDEZ, J.; WILSON, R. Why No Feeding Frenzy? Mechanisms of Nutrient Acquisition and Utilization During Infection by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, n. 10, p. 1286-1293, 2012.

FILIPPI, M.; PRABHU, A.; DA SILVA, G. **Escaldadura do arroz e seu controle**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. Circular Técnica 72.

FILIPPI, M. C.; CORTES, C.; BECKERMAN, J.; SWEIGARD, J.; VALENT, B.; GONZALEZ, C.; EBBOLE, D. **Novos aspectos da patogenicidade de *Magnaporthe grisea***. 1 ed. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, 36 p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.

FILIPPI, M. C. C.; DA SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; MORAES, A. J. G.; PRABHU, A. S. Leaf Blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v. 58, p. 160-166, 2011.

FINLAY, R. D. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. **Mycologist**, v. 18, n. 2, p. 91-96, 2004.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186-194, 2012.

GONÇALVES, F. J.; ARAÚJO, L. G.; SILVA, G. B.; FILIPPI, M. C. C. Controle químico da brusone em arroz de terras altas: efeitos nos fungos não alvos do filoplano. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia-GO, v. 1, n. 1, 2012.

HASHIMOTO, T.; TAHARA, S.; TAKAOKA, S.; TORI, M.; ASAKAWA, Y. Structures of a novel binaphthyl and three novel benzophenone derivatives with plant-growth

inhibitory activity from the fungus *Daldinia concentrica*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 42, n. 7, p. 1528-1530, 1994.

HARRIS, T. M.; HARRIS, C. M.; HILL, J. E.; UNGEMACH, F. S.; BROQUIST, H. P.; WICKWIRE, B. M. (1S,2R,8aS)-1,2-Dihydroxyindolizidine formation by *Rhizoctonia leguminicola*, the fungus that produces slaframine and swainsonine. **J. Org. Chem.**, v. 52, p. 3094-3098, 1987.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; UDAGAWA, S.-I.; KAWAI, K.-I. Structures of a new dihydroxanthone derivative, nidulin A, and a new benzophenone derivative, nidulalin B, from *Emericella nidulans*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 42, n. 9, p. 1720-1723, 1994.

KAWAMATA, H.; NARISAWA, K.; HASHIBA, T. Suppression of rice blast by phylloplane fungi isolated from rice plants. **Journal of General Plant Pathology**, v. 70, n. 2, p. 131-138, 2004.

KHALIL, M. S.; Moubasher, H.; Hasan, F. F. Biological Control of Rice Blast Disease by *Streptomyces flavotricini*. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 5, p. 1453-1461, 2014.

KIM, J. Y.; WU, J.; KWON, S. J.; OH, H.; LEE, S. E.; KIM, S. G.; WANG, Y.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.; KANG, K. Y. Proteomics of rice and *Cochliobolus miyabeanus* fungal interaction: insight into proteins at intracellular and extracellular spaces. **Proteomics**, v. 14, n. 20, p. 2307-2318, 2014.

KOOLEN, H. H.; MENEZES, L. S.; SOUZA, M. P.; SILVA, F.; ALMEIDA, F. G.; DE SOUZA, A. Q.; NEPEL, A.; BARISON, A.; SILVA, F. H. D.; EVANGELISTA, D. E. Talaroxanthone, a novel xanthone dimer from the endophytic fungus *Talaromyces* sp.

associated with *Duguetia stelechantha* (Diels) RE Fries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 880-883, 2013.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LAHLALI, R.; HIJRI, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS microbiology letters**, v. 311, n. 2, p. 152-159, 2010.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, 2010.

LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 29, p. 25435-25442, 2011.

LI, Q.; JIANG, Y.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; JIANG, D.; HSIANG, T. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 139-148, 2011.

LIANG, X.; WANG, X.-H.; LUO, R.-Y.; LU, S.-Q.; GUO, Z.-J.; WANG, M.-A.; YANG, L.; ZHOU, L.-G. Secondary metabolites of rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn and their biological activities. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 1, p. 80-87, 2015.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 521-526, 2000.

LOBO, V. D. S.; LINS, L.; FILIPPI, M.; CORTÊS, M. D. C.; PRABHU, A. **Infecção de grãos de arroz irrigado por *Sarocladium oryzae* no Estado do Tocantins e grau de resistência de genótipos à podridão da bainha em casa de vegetação**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. Comunicado Técnico.

LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; GERALDINE, A. M.; BRANDÃO, R. S.; MONTEIRO, V. N.; JÚNIOR, M. L.; COELHO, A. S. G.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal biology**, v. 116, n. 7, p. 815-824, 2012.

MA, Y.; LI, Y.; LIU, J.; SONG, Y.; TAN, R. Anti *Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 451-456, 2004.

MALAVOLTA, V. M. A.; AZZINI, L. E.; BASTOS, C. R.; SALOMON, M. V.; CASTRO, J. L. Progresso da brusone nas folhas e panículas de genótipos de arroz de terras altas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 186-188, 2008.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 1-7, 1998.

MYCOBANK. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic&Lang=Por>>.

Acesso em: 16/jan./2016.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariuna, SP: Embrapa-CNPMA, 1998, 262 p.

MENDÉZ, S.; MONDINO, P. Control biológico postcosecha en Uruguay. **Horticultura Internacional**, v. 7, p. 29-36, 1999.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2009, 190 p.

MOSQUERA-ESPINOSA, A. T.; BAYMAN, P.; PRADO, G. A.; GOMEZ-CARABALI, A.; OTERO, J. T. The double life of *Ceratobasidium*: orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice. **Mycologia**, v. 12, 2013.

NUNES, C. D.; RIBEIRO, A. S.; TERRES, A. L. **Principais doenças do arroz irrigado e seu controle**. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. de (Ed.). Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004, p.579-633.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Annual review of phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 125-143, 1987.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; DOS SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

OU, S. H. **Rice diseases**. 2º ed. England: Commonwealth Mycological Institute, 1985, 380 p.

OWLEY, B. H.; WINDHAM, M. T. Controle biológico de fitopatógenos. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. (Ed.). **Fitopatologia: Conceitos e exercícios de laboratório**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 447-460. 37 cap.

PASTRE, R.; MARINHO, A. M.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A. Q.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867, 2007.

PEDRAS, M. S. C.; YU, Y.; LIU, J.; TANDRON-MOYA, Y. A. Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*: isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 9-10, p. 717-722, 2005.

PEREIRA, U. Z.; RIBEIRO, L. F. Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, v. 2, n. 2, p. 52-60, 2004.

PETERSEN, R.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. **Mycorrhizas**: anatomy and cell biology. NRC Research Press, 2004.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PRABHU, A. S.; FARIA, J. C.; ZIMMERMANN, F. J. P. Comparative yield loss estimates due to blast in some upland rice cultivars. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 14, n. 3, p. 227-232, 1989.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. Arroz (*Oryza sativa* L.) controle de doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997, v.1. 554p.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Graus de resistência a brusone e produtividade de cultivares melhoradas de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 36, n. 12, p. 1453-1459, 2001.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; RIBEIRO, A. S. Doenças e seu controle. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. 1 ed. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p. 262-307.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; MORAIS, O. P. An Unprecedented Outbreak of Rice Blast on a Newly Released Cultivar BRS Colosso

in Brazil. In: WANG, G. L. V., B. (Ed.). **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast**. Netherlands: Springer Science, 2009. p. 257-267.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. 1 ed. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, 323-387 p.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; SILVA, G. B. D.; SANTOS, G. R. D. Resistance of rice cultivars to *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia oryzae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 589-595, 2002a.

PRABHU, A. S.; GUIMARÃES, C. M.; SILVA, G. B. **Manejo da brusone no arroz de terras altas**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa, 2002, 6 p. Circular Técnica 22b.

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.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

QUALHATO, T. F.; LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; BRANDÃO, R. S.; JESUINO, R. S. A.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 9, p. 1461-1468, 2013.

RAMOS, L. N. **Estrutura populacional e parâmetros epidemiológicos de isolados de *Magnaporthe grisea* (Barr)**. 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

RASMUSSEN, S.; PARSONS, A. J.; JONES, C. S. Metabolomics of forage plants: a review. **Annals of Botany**, v. 110, n. 6, p. 1281-1290, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de

Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 906 p.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa-PR, v. 3, n. 13, p. 31-36, 2007.

RUEGGER, M. J.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Rev Bras Bot**, v. 27, n. 2, p. 205-11, 2004.

SANJAY, R.; PONMURUGAN, P.; BABY, U. I. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against grey blight disease of tea in the field. **Crop Protection**, v. 27, n. 3-5, p. 689-694, 2008.

SCHEUERMANN, K. K. Manejo de doenças. In: BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. (Eds.). **Arroz do plantio à colheita**. UFV, 2015. p. 199-219.

SCHNEIDER, M. J.; UNGEMACH, F. S.; BROQUIST, H. P.; HARRIS, T. M. Biosynthesis of swainsonine in *Rhizoctonia leguminicola*. Epimerization at the ring fusion. **J. AM. Chem. Soc.**, v. 104, p. 6863-6864, 1982.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. D. A. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2004.

SEN, R.; HIETALA, A. M.; ZELMER, C. D. Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratorhiza* spp. from orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. **New Phytologist**, v. 144, n. 2, p. 331-341, 2002.

SENA, A.; CHAIBUB, A. A.; CÔRTEZ, M. V.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; ARAÚJO, L. G. Increased enzymatic activity in rice leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 387-397, 2013.

SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. S.; DUCOING, H. P.; SOSA, M. R. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. **Revista Mexicana de Fitopatología**, México, v. 21, n. 3, 2004.

SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R. E.; MELO, I. S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 395-399, 1999.

SILVA FILHO, G.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311-319, 2000.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta bot. bras.**, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SILVA, J. C.; TORRES, D. B.; LUSTOSA, D. C.; DE FILIPPI, M. C. C.; DA SILVA, G. B. Rice sheath blight biocontrol and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 55, n. 4, p. 243-250, 2012.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STURRMER, S. L. Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, v. 25, 2002.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 21-43, 2010.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; DA SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUSA, K. C. I. **Caracterização morfológica de fungos rizoctonioides e endofíticos para a germinação *in vitro* de sementes de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. e *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae).** 2012. 126 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)–Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. D. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciênc. rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WILSON, R. A.; TALBOT, N. J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 185-195, 2009.

ZHANG, H.; LI, M. Transcriptional profiling of ESTs from the biocontrol fungus *Chaetomium cupreum*. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

ZHAO, C.-J.; WANG, A.-R.; SHI, Y.-J.; WANG, L.-Q.; LIU, W.-D.; WANG, Z.-H.; LU, G.-D. Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, n. 4, p. 501-516, 2008.

3 PERFIS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS DE *Waitea circinata* E BIOCONTROLE DE *Magnaporthe oryzae*

RESUMO

A brusone, principal doença do arroz é responsável por perdas de até 100% na produtividade. O controle é feito pelo manejo integrado e o uso de agentes de biocontrole, assim como seus metabólitos podem constituir como mais uma prática de manejo. Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial de *Waitea circinata*, de seus extratos e metabólitos secundários no antagonismo a *Magnaporthe oryzae* (M.o.) *in vitro* e *in vivo*. Em delineamento inteiramente casualizado, os ensaios *in vitro* definiram a eficiência do micélio, extrato e metabólitos, na inibição do crescimento micelial, da germinação e formação de apressórios de *M. oryzae*. Os ensaios *in vivo* determinaram a eficiência na supressão da brusone do micélio, extratos e metabólitos. Caracterizou-se bioquimicamente o micélio micorrízico e bioprospectou-se por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) os compostos bioativos do extrato da massa micelial (EMM). O micélio da micorriza [10 g/L] reduziu o crescimento de *M. oryzae* em 98% e suprimiu a brusone foliar em 84%. O EMM (700 µg/mL) reduziu a formação de apressórios de *M. oryzae* em 76%, respectivamente. Em casa de vegetação, EMM + M.o. suprimiu a severidade da brusone foliar em 77% e reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em 92%. Metabólitos não-voláteis de *W. circinata* inibiram em 49% o crescimento de *M. oryzae*. *W. circinata* produziu ácido indolacético *in vitro* e apresentou atividade das enzimas glucanase, quitinase e protease. O extrato da massa micelial (EMM), extrato bruto (EB) e extrato liofilizado (EL) apresentaram o mesmo perfil químico que pode ser atribuído à esfinganina. Os resultados do presente estudo indicam que o EMM de *W. circinata* é promissor no biocontrole da brusone do arroz.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, Brusone; Metabólitos secundários; Controle biológico; Micorriza.

ABSTRACT

The blast, the main rice disease is responsible for losses of up to 100% in productivity. The control is done by the integrated management and the use of biocontrol agents as well as their metabolites may be more as a management practice. This study aimed to evaluate the potential of mycorrhizal mycelia, its extracts and secondary metabolites in antagonism to *M. oryzae* *in vitro* and *in vivo*. In a completely randomized design, *in vitro* assays defined mycelium efficiency, extracts and metabolites in the inhibition of mycelial growth, germination and formation of appressoria. *In vivo* assays determine the efficiency in suppressing the blast of the mycelium extracts and metabolites. The mycorrhizal mycelia was characterized biochemically (two methods of cultivation) and the bioprospection of bioactive compounds of the mycelial mass extract (MME) was realized by spectrometric high resolution mass (HRMS). The mycelium of mycorrhiza 10 g / L reduced the growth of *M. oryzae* 97.92% and suppressed leaf blast at 83.89 %. The MME (700 µg/mL) reduced the formation of appressorium of *M. oryzae* in 75.71 %, respectively. In the greenhouse, MME + M.o. suppressed the severity of leaf blast in 77.01 % and reduced AUDPC by 92.38 %. Non- volatile metabolites of *W. circinata* inhibited in 48.95 % growth of *M. oryzae*. *W. circinata* produces Indolacetic Acid *in vitro* and showed the enzymatic activity of Glucanase, chitinase and protease in the two methods of cultivation. The extract from the mycelial mass (MME), crude extract (CE) and lyophilized extract (LE) had the same chemical profile that can be attributed to sphinganine. The results of this study indicate that the MME *W. circinata* is promising in biocontrol of rice blast.

Key words: *Oryza sativa*; blast; Secondary metabolites; Biological control; Mycorrhiza.

3.1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento essencial na dieta de muitos brasileiros, porém sua produtividade pode ser reduzida, principalmente pela incidência de doenças fúngicas (Scheuermann, 2015). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016), a safra 2015/2016 será inferior à safra 2014/2015 com redução de 10.2%, devido à diminuição da área plantada aliada ao excesso de chuvas. A brusone, cujo agente causal é o fungo *Magnaporthe oryzae* B. Couch [anamorfo - *Pyricularia oryzae* Cav.] é uma das doenças mais disseminadas em todas as regiões do mundo em que o arroz é cultivado (Malavolta et al., 2008; Prabhu et al., 2009; Fernandez & Wilson, 2012; Fisher et al., 2012). Em condições propícias, o patógeno pode ocasionar epidemias e a perda da produtividade pode chegar a aproximadamente 100% da cultura (Prabhu et al., 2009).

O controle de doenças de plantas é realizado com o manejo que integra a resistência genética da cultivar, as práticas culturais e o controle químico (Lahlali & Hijri, 2010). Com o objetivo de reduzir as perdas de produtividade por brusone têm-se intensificado o uso de fungicidas (Filippi et al., 2011). Assim, um dos desafios da agricultura é aumentar a produção das culturas com sustentabilidade e uma medida que pode ser somada ao controle químico é o uso de fungos de controle biológico (BCFs) e promotores de crescimento vegetal. Dessa forma, a implementação do biocontrole apresenta vantagens, como a diminuição de resíduos químicos nos alimentos e no ambiente (Mizubuti & Maffia, 2009).

BCFs como *Epicoccum* sp. (Sena et al., 2013) e *Cladosporium* sp. (Chaibub et al., 2016 no prelo), obtidos do filoplano em sistema orgânico de produção do arroz demonstraram ser antagonista e indutor de resistência à *M. oryzae*, respectivamente. Carvalho et al. (2015) observaram que o isolado micorrízico, *Waitea circinata*, proveniente de uma orquídea do Cerrado, foi eficiente em inibir, *in vitro*, o

desenvolvimento de *M. oryzae* e o seu extrato bruto demonstrou antagonismo *in vitro* e *in vivo* para *M. oryzae*. Silva et al. (2016 - no prelo) verificaram que *Epidendrum nocturnum* possui associação natural com fungos micorrízicos e que estes, principalmente *Waitea circinata*, podem ser usados na micorrização de plântulas aumentando o vigor.

Sabe-se que o gênero *Waitea circinata* (anamorfo *Rhizoctonia*) é um grande produtor de metabólitos secundários, como alcaloides (Schneider et al., 1982; Harris et al., 1987; Pedras et al., 2005), esteroides como ergosterol (Ma et al., 2004; Aliferes & Jabaji, 2010a; Liang et al., 2015) e sitostenona (Liang et al., 2015). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: 1) Caracterizar *Waitea circinata* obtida de *Epidendrum nocturnum* bioquimicamente; 2) Avaliar o efeito inibitório de metabólitos não-voláteis pelo isolado micorrízico; 3) Avaliar o potencial do micélio micorrízico e extrato da massa micelial no antagonismo *in vitro* e *in vivo* para *M. oryzae*; 4) Bioprospectar moléculas ativas do extrato da massa micelial capazes de elicitar rotas metabólicas no antagonismo, *in vitro* e *in vivo* para *M. oryzae*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Caracterização bioquímica de *Waitea circinata*

3.2.1.1 Produção de pectinase

Um disco do isolado micorrízico (En07 - BRM 32644) foi transferido para placas de Petri contendo meio M9 (2 g de sacarose; 6 g de Na₂HPO₄; 3 g de KH₂PO₄; 0.5 g de NaCl; 1 g de NH₄Cl e 15 g de ágar) complementado com 1.2 g de extrato de levedura e 4 g de pectina por litro. Após autoclavagem adicionou-se 10 mL de CaCl₂ 0.01 M e 1 mL da solução de MgSO₄.7H₂O 1 M. As três placas foram incubadas a 28-30 °C. Após o crescimento retirou-se o micélio com o auxílio de uma bucha de algodão e adicionou-se HCL 2N até cobrir o meio de cultura. As colônias que formaram halo claro foram consideradas produtoras de pectinase (Cattelan, 1999).

3.2.1.2 Produção de celulase

Um disco do isolado micorrízico foi transferido para placas de Petri contendo meio Trypticaseína de Soja Ágar (TSA) suplementado com 10 g celulose em pó/L. As três placas foram incubadas por cinco dias e, logo após, verteu-se sobre elas uma solução contendo o corante Vermelho Congo 0.03%. Após 30 minutos, retirou-se o excesso de corante e adicionou-se solução de NaCl 1M durante 15 minutos. A produção de celulase foi verificada pela formação de uma zona clara em volta da colônia (Cattelan 1999; Strauss et al., 2001).

3.2.1.3 Produção de sideróforos

O isolado micorrízico foi cultivado em BD (Batata – Dextrose: 20 g de dextrose, 1 L de água e 200 g de batata) por 3 dias em agitador orbital em triplicata. No controle utilizou-se o BD sem o antagonista em três placas. Após esse período foi feita a

centrifugação e 1 mL do sobrenadante foi misturado com 1 mL da solução indicadora de cromo azurol S (CAS). A mudança de cor de azulado para amarelo-avermelhado no período de 15 minutos indicou a produção de sideróforos (Schwyn & Neilands, 1987; Cattelan, 1999; Filippi et al., 2011).

3.2.1.4 Solubilização de fosfato

Para a verificação de solubilização de fosfato pelo isolado micorrízico utilizou-se o meio Trypticaseína de soja ágar (TSA 1/10 - v:v) acrescido de CaHPO_4 com pH ajustado à 7,0. As três placas foram incubadas a 28-30 °C até o crescimento do controle (placas com o isolado micorrízico sem a adição da fonte de fósforo). O potencial de solubilização foi constatado pela formação de um halo claro em torno da colônia (Cattelan et al., 1999).

3.2.1.5 Produção de ácido cianídrico

Um disco do isolado micorrízico foi transferido para três placas de Petri contendo meio TSA (1/10) enriquecido com 4.4 g de glicina/L e 0.3 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Papel filtro com solução de ácido pícrico foi colocado na placa superior e as placas incubadas a 26 °C. A mudança de coloração do papel de marrom para amarelo-alaranjado indicou a produção de ácido cianídrico (Cattelan, 1999).

3.2.1.6 Produção de ácido indol acético (AIA)

Discos de *W. circinata* foram colocados em frascos contendo 50 mL de BD na ausência (controle) e presença de L-triptofano na concentração de 100 mg/L. Montou-se um delineamento inteiramente ao acaso com três repetições. Após dois, quatro, seis e oito dias de crescimento sob um agitador rotatório a 150 rpm e 26 ± 2 °C, o micélio foi separado por centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Para a análise colorimétrica de AIA foram utilizados 100 µL do reagente de Salkowski [FeCl_3 0,5 mol/L+ HClO_4 (35%)] e 150 µL do sobrenadante. Após a comprovação qualitativa da presença de AIA (coloração rosa após 25 minutos de reação à temperatura de 28 °C no escuro), o hormônio foi quantificado em espectrofotômetro em 540 nm. As concentrações, em µg/mL, foram calculadas a partir de uma curva padrão com

concentrações conhecidas da forma sintética do hormônio (0 a 100 µg/mL), cujas leituras foram a base para calcular a concentração de AIA nas amostras (Oliveira et al., 2012).

3.2.2 Caracterização enzimática de *Waitea circinata*

A caracterização enzimática do isolado micorrízico foi conduzida por duas metodologias diferentes, sendo que em uma utilizou-se a parede celular de *M. oryzae* (Py 10900) e em outra a situação de co-cultivo. Dessa forma, foram preparados dois ensaios: A) 1 g de micélio raspado do isolado micorrízico foi colocado juntamente com 0.125 g da parede celular purificada do patógeno em meio líquido TLE (2 g de KH₂PO₄; 1.4 g de (NH₄)₂SO₄; 0.3 g de MgSO₄; 0.15 g de CaCl₂; 0.005 g de FeSO₄; 0.016 g de MnSO₄; 0.014 g de ZnSO₄; Adaptado de Almeida et al., 2007; Geraldine et al., 2013); B) 1 g de micélio raspado do isolado micorrízico foi colocado juntamente com 1g de micélio do isolado patogênico. Os frascos foram colocados em aparelho rotativo a 140 rpm e 28 °C e as coletas foram feitas de 24 à 144 horas após a incubação.

3.2.2.1 Obtenção da parede celular de *Magnaporthe oryzae*

Discos de 5 mm de micélio de *M. oryzae* foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 250 mL de meio de cultura líquido mínimo TLE. Estes foram incubados em aparelho rotativo a 140 rpm e 28 °C. Em seguida, o meio líquido foi filtrado, a massa micelial recuperada e congelada, liofilizada e macerada com nitrogênio líquido para obtenção de um pó, que foi lavado com água destilada autoclavada por várias vezes até não apresentar proteína na amostra. A concentração de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Depois de lavado, o pó foi autoclavado, congelado e liofilizado para obtenção da parede celular de cada patógeno (Adaptado de Geraldine et al., 2013; Monteiro et al., 2014).

3.2.2.2 Obtenção da massa micelial de *Magnaporthe oryzae*

Discos de micélio de *M. oryzae* foram colocados em frascos contendo meio líquido BD. Estes foram incubados em aparelho rotativo a 140 rpm e 28 °C. Após esse período fez-se a filtração e o micélio foi pesado para a instalação do ensaio. A

concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando albumina sérica bovina como padrão (Almeida et al., 2007).

Montou-se um delineamento inteiramente casualizado com 14 tratamentos e três repetições para cada enzima quando utilizado a parede celular do patógeno. Quando do uso do micélio do isolado patogênico fez-se um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e três repetições por hora de coleta.

3.2.2.3 Quantificação enzimática

β -1,3 glucanase (GLU): A atividade de GLU foi determinada de acordo com um método colorimétrico usando laminarina como substrato (Noronha & Ulhoa, 2000; Geraldine et al., 2013). Uma unidade de β -1,3 glucanase foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μ mol de açúcares redutores por min a 37 °C (Almeida et al., 2007).

Quitinase (CHI): A atividade de CHI foi determinada de acordo com o método colorimétrico usando quitina como substrato (Ulhoa & Peberdy, 1992). Uma unidade de quitinase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de N-acetilglicosamina em 1h a 37 °C (Almeida et al., 2007).

Protease: A atividade de protease foi determinada usando azocaseína como substrato (Cabral et al., 2004). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para elevar uma unidade de absorbância por minuto (Geraldine et al., 2013).

3.2.3 Potencial efeito e termoestabilidade *in vitro* do micélio de *Waitea circinata* na inibição do crescimento micelial de *Magnaporthe oryzae*

Micélio do isolado micorrízico *W. circinata* foi removido com o auxílio de um bisturi sem danificar o meio de cultura e sem deixar fragmentos de micélio no meio, e pesado para a obtenção de três diferentes suspensões 2, 5 e 10 g/L de BDA (Batata - Dextrose - Ágar: 20 g de ágar, 20 g de dextrose, 1 L de água e 200 g de batata). Em seguida, parte destas suspensões foram autoclavadas constituindo, assim os tratamentos (A2g; A5g; A10g). A outra parte não autoclavada constituiu os tratamentos (S2g; S5g; S10g). Ambos os meios de cultura (com e sem esterilização) foram distribuídos em placas de Petri.

Um disco de 5 mm de BDA contendo micélio de *M. oryzae* foi transferido para o centro da placa de Petri. As placas foram mantidas em câmara de germinação tipo BOD à 27 °C e fotoperíodo de 12 horas. Montou-se um delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos e cinco repetições. O controle consistiu do patógeno cultivado, em meio de cultura BDA na ausência do micélio do isolado micorrízico. As medições foram feitas com o auxílio de um paquímetro digital, em câmara de fluxo laminar, à 27 °C, em luz branca constante. Avaliou-se os diâmetros horizontal e vertical de cada tratamento quando o controle alcançou a borda da placa. Ao final, calculou-se a área da colônia. O ensaio foi repetido três vezes e para a análise estatística foi feita a média.

3.2.4 Germinação de conídios e formação de apressórios de *Magnaporthe oryzae* pelo micélio de *Waitea circinata*

O ensaio de germinação de conídios e inibição de apressórios foi conduzido em superfície artificial hidrofóbica. Uma alíquota de 10 µL de cada suspensão do micélio do isolado micorrízico foi colocada juntamente com 10 µL da suspensão de conídios de *M. oryzae* (1×10^5) em cada lateral da superfície hidrofóbica (Carvalho et al., 2015). Montou-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições. O micélio de *W. circinata* foi obtido com o auxílio de um bisturi, pesado e diluído em água destilada autoclavada para a obtenção de três diferentes suspensões 2 g, 5 g e 10 g/L (micélio/água). O controle consistiu de 20 µL da suspensão de conídios de *M. oryzae* sem a presença do micélio da micorriza. As avaliações de germinação de conídios e formação de apressórios foram realizadas após 4, 6 e 24 horas em microscópio óptico (Software BelAnalyzer MicroImage). O ensaio foi repetido duas vezes e para a análise estatística foi feita a média.

3.2.5 Supressão da brusone foliar pelo micélio de *Waitea circinata*

O plantio e a inoculação foram realizados de acordo com a metodologia utilizada por Carvalho et al. (2015). Dois ensaios foram conduzidos em condições de inoculação artificial em casa de vegetação. Pulverizou-se três diferentes diluições 2 g, 5 g e 10 g/L de BDA do micélio do isolado micorrízico simultaneamente com a suspensão de conídios de *M. oryzae* (3×10^5 conídios/mL), em plantas com 21 dias de idade. O

delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições. As avaliações de brusone nas folhas (SBF %) foram realizadas utilizando-se uma escala de notas de dez graus, de acordo com Notteghem (1981), aos oito dias após a inoculação de *M. oryzae*, para o ensaio 1. Ambos os ensaios (1 e 2) foram avaliados com a mesma escala. No entanto, para o ensaio 2, a brusone nas folhas foi avaliada em intervalos de dois dias para determinar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), nas mesmas plantas previamente marcadas. Também foi calculada a redução da severidade de brusone foliar em relação ao controle para os dois ensaios e para a AACPD. Os dados de supressão foram transformados utilizando-se $\sqrt{x+0.5}$.

3.2.6 Potencial efeito de metabólitos não-voláteis de *Waitea circinata*

Discos do isolado micorrízico foram transferidos para frasco contendo meio líquido TLE (Adaptado de Geraldine et al., 2013) e em outro frasco foram colocados discos do isolado micorrízico juntamente com discos de *M. oryzae*. Os frascos foram mantidos em agitador orbital a 150 rpm e 25 °C, por 3 dias. Após esse período, o meio de cultura foi centrifugado, filtrado em membrana de celulose (0.45 µm) e incorporado ao BDA, na proporção de 25% (v/v). Discos de ágar, contendo micélio do patógeno foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA suplementado com o filtrado do isolado micorrízico e placas contendo suplementação com o filtrado do antagonismo (co-cultivo). Os controles consistiram da transferência do patógeno para placas de Petri contendo BDA sem suplementação (Adaptado de Isaias et al., 2014). Montou-se um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições. As medições foram feitas com o auxílio de um paquímetro digital, em câmara de fluxo laminar, à 27 °C, em luz branca constante. Avaliou-se o tamanho dos diâmetros horizontal e vertical de cada tratamento quando o controle alcançou a borda da placa. Ao final, calculou-se a área da colônia de cada tratamento. O ensaio foi repetido três vezes e para a análise estatística foi feita a média.

Após a avaliação do ensaio, com o auxílio de um bastão de vidro estéril, o isolado patogênico foi submetido ao estresse físico para a estimulação da conidiogênese. As placas foram mantidas sob luz branca contínua por um período de dois dias com temperatura variando de 25 a 27 °C e umidade alta. A remoção dos conídios foi realizada com o auxílio de um pincel e água destilada estéril. Foi realizada a contagem

dos conídios de todos os tratamentos em hemacitômetro tipo Newbauer no microscópio óptico (Software BelAnalyzer MicroImage; Filippi & Prabhu, 2001), a fim de verificar se a presença dos metabólitos não-voláteis interferiu na produção dos conídios de *M. oryzae*.

3.2.7 Obtenção dos extratos e análise por Cromatografia em Camada Delgada

Os diferentes extratos de *W. circinata* (Extrato bruto - EB, Extrato micelial - EM, Extrato liofilizado - EL) foram obtidos de acordo com Carvalho et al. (2015; Figura 3.1), e o extrato da massa micelial (EMM) foi obtido do isolado micorrízico a partir do crescimento em meio de cultura BDA, por 11 dias a 27 °C, na presença de luz. Após o seu crescimento foi feita a maceração do micélio com acetato de etila e posteriormente a evaporação do solvente em evaporador rotativo (MA 120, MARCONI®; Figura 3.2).

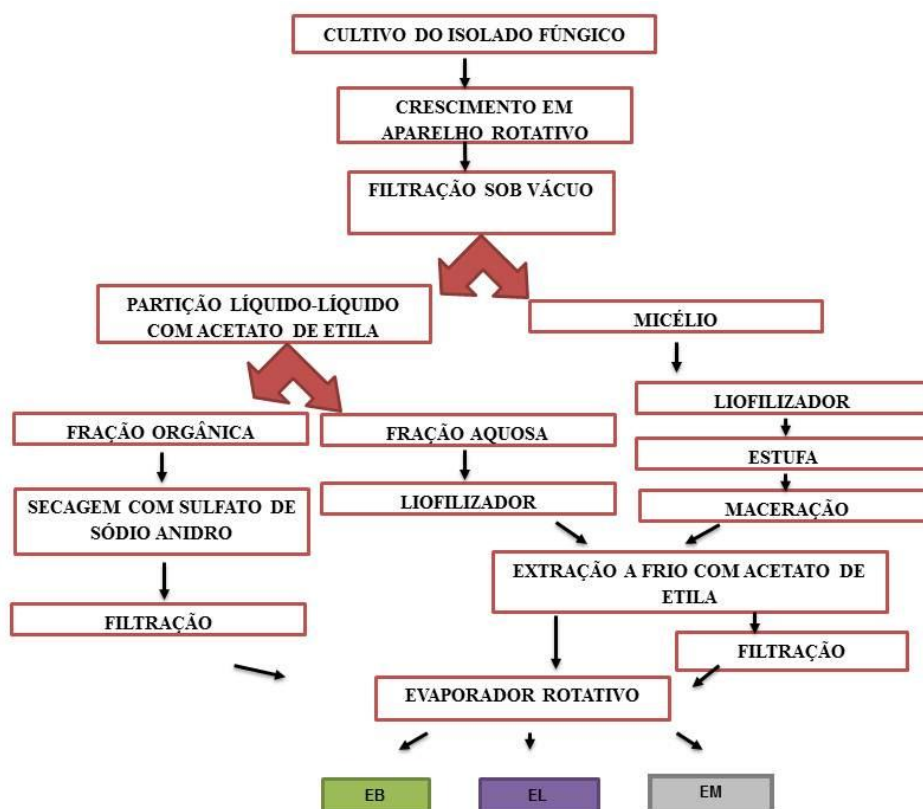


Figura 3.1 Obtenção dos extratos de *Waitea circinata* (EB: Extrato Bruto; EL: Extrato Liofilizado e EM: Extrato Micelial).



Figura 3.2 Obtenção do extrato da massa micelial (EMM) de *Waitea circinata*.

Uma sondagem inicial dos metabólitos secundários produzidos por *W. circinata* foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com o auxílio de placas de alumínio da Merck PF₂₅₄₊₃₆₆. Para tal, as amostras de cada extrato obtidas do isolado micorrízico foram aplicadas, com auxílio de um capilar, nas placas a 2 cm acima da borda inferior e colocadas em uma cuba com sistemas de solventes. Após a eluição e evaporação do solvente, as placas foram reveladas. Os reveladores usados foram luz ultravioleta (254 e 365 nm), reagente de Dragendorff (para alcaloides e compostos nitrogenados), reagente anisaldeído (para esteroides, terpenoides e açúcares) e solução de ácido sulfúrico/metanol (1:1 v/v), seguido de aquecimento (revelador universal).

3.2.8 Análise dos extratos de *W. circinata* em ESIQ-TOF

As amostras foram solubilizadas em água:metanol (1:1) e analisadas no modo positivo. As análises foram realizadas no espectrômetro de massas micrOTOFQIII (Bruker) em alta resolução e com fonte de ionização eletronspray. Os espectros de massas foram adquiridos e processados utilizando o software de análise de dados DataAnalyses. Os dados foram processados e as composições das estruturas

foram determinadas medindo os valores de m/z . As possíveis estruturas de cada extrato foram determinadas utilizando a base de dados Metlin (Scripps Center of Metabolomics: metlin.scripps.edu/index.php).

3.2.9 Obtenção dos compostos do Extrato da massa micelial (EMM)

As colunas cromatográficas (CC) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), sílica gel 60 (0,05-0,200 mm) ou sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) pelo sistema flash, além de SEPHADEX LH-20, em colunas de vidro de diâmetro e altura que variavam de acordo com a massa dos extratos a ser cromatografada.

O extrato da massa micelial foi submetido à filtração em Sephadex LH-20, utilizando-se $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em gradiente (100%-100%), o que gerou 43 subfrações. A subfração 15 foi cromatografada em coluna de sílica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em gradiente, 100%-60%) fornecendo o composto 1. A subfração 18 também recebeu tratamento cromatográfico em coluna de sílica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em gradiente, 100%-40%), fornecendo o composto 2.

3.2.10 Potencial efeito *in vitro* do extrato da massa micelial de *Waitea circinata* na inibição do crescimento micelial de *M. oryzae*

Utilizou-se cinco diluições (1.040, 700, 520, 120 e 12 $\mu\text{g/mL}$) do Extrato da massa micelial (EMM) em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições. O controle consistiu de apenas o disco do patógeno sem a presença do extrato. As medições foram feitas em câmara de fluxo laminar, à 27°C, em luz branca constante, com o auxílio de um paquímetro digital. Avaliou-se o diâmetro horizontal e vertical de cada tratamento quando o controle alcançou a borda da placa. Ao final, calculou-se a área da colônia. O ensaio foi repetido três vezes e para a análise estatística foi feita a média.

3.2.11 Germinação de conídios e formação de apressórios de *Magnaporthe oryzae* pelo extrato da massa micelial e pelos compostos de *Waitea circinata*

Dois ensaios foram conduzidos em superfície artificial hidrofóbica seguindo a mesma metodologia do item 3.2.4. Ensaio 1: Foram utilizadas cinco suspensões (1.040, 700, 520, 120 e 12 $\mu\text{g/mL}$) do Extrato da massa micelial (EMM); Ensaio 2: Foram utilizados dois compostos obtidos do EMM. O controle consistiu de 20 μL da suspensão de conídios de *M. oryzae* sem a presença do extrato e dos compostos de *W. circinata*. Os ensaios foram realizados em triplicata e o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos para o ensaio 1 e três tratamentos para o ensaio 2. As avaliações de germinação de conídios e formação de apressórios foram realizadas após 4, 6 e 24 horas em microscópio óptico (Software BelAnalyzer MicroImage). O ensaio foi repetido duas vezes e para a análise estatística foi feita a média.

3.2.12 Potencial efeito *in vivo* do micélio, extratos e compostos na supressão da brusone foliar

Quatro ensaios foram conduzidos em condições de inoculação artificial em casa de vegetação para a avaliação da brusone foliar. O plantio e a inoculação foram realizados de acordo com a metodologia utilizada por Carvalho et al. (2015).

Ensaio 1 e 2: Realizou-se a pulverização de dois extratos (EB - 1.040 $\mu\text{g/mL}$; EMM - 1.040 $\mu\text{g/mL}$) do isolado micorrízico simultaneamente com a suspensão de conídios de *M. oryzae* (3×10^5 conídios/mL), em plantas com 21 dias de idade. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e três repetições.

Ensaio 3: Pulverizou-se dois extratos (EB - 1.040 $\mu\text{g/mL}$; EMM - 1.040 $\mu\text{g/mL}$) do isolado micorrízico, dois compostos obtidos do EMM e as três diferentes diluições 2 g, 5 g e 10 g/L de BDA do micélio do isolado micorrízico, simultaneamente com a suspensão de conídios de *M. oryzae* (3×10^5 conídios/mL), em plantas com 21 dias de idade.

Ensaio 4: Pulverizou-se os três melhores tratamentos do ensaio 3. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e três repetições para o ensaio 3 e quatro tratamentos e três repetições para o ensaio 4.

As avaliações de brusone nas folhas (SBF %) em todos os ensaios foram realizadas utilizando-se uma escala de notas de dez graus, de acordo com Notteghem (1981), aos oito dias após a inoculação de *M. oryzae*, para os ensaios 1 e 3. No entanto, para os ensaios 2 e 4, a brusone nas folhas foi avaliada em intervalos de dois dias para determinar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), nas mesmas plantas previamente marcadas. Também foi calculada a redução da severidade de brusone foliar em relação ao controle para todos os ensaios e para a AACPD. Os dados de supressão foram transformados utilizando-se $\sqrt{x+0.5}$.

3.2.13 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p=0.05$) usando o software R versão 3.0.1.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterização bioquímica e enzimática de *Waitea circinata*

Houve formação de halo indicando a produção de celulase pelo bioagente *W. circinata*. Houve produção da auxina AIA (2.277 µg/mL) apenas às 96 horas após a instalação do ensaio (Figura 3.3).

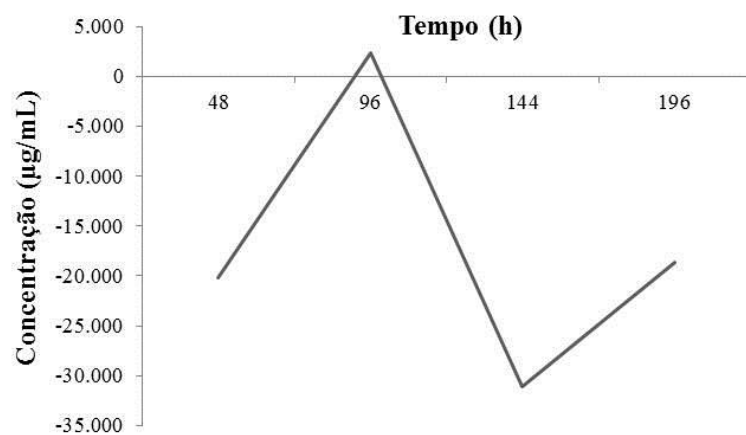


Figura 3.3 Concentração de ácido indol acético (AIA) em *Waitea circinata*.

3.3.1.1 Quantificação da atividade enzimática: parede celular de *Magnaporthe oryzae*

W. circinata produziu um máximo e um mínimo de atividade de GLU em 48 horas e em 72 horas, respectivamente (Tabela 3.1). Observou-se um máximo de atividade de CHI em 24 horas e um mínimo em 168 horas (Tabela 3.1). Quanto à protease, o máximo de atividade de *W. circinata* verificado foi em 168 horas e o mínimo em 144 horas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Atividade específica de glucanase, quitinase e protease (U mg⁻¹) de *Waitea circinata* em presença da parede celular de *Magnaporthe oryzae*

Tratamentos	Horas (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
<i>Glucanase</i>							
En07	8.244a	3.562bc	2.648bc	3.570bc	1.079c	4.519abc	3bc
En07 + M.o.	2.009bc	5.674ab	0c	4.140abc	1.584bc	4.378abc	3.665bc
<i>Quitinase</i>							
En07	2.825a	3.484a	3.387a	3.590a	4.409a	4.143a	2.829a
En07 + M.o.	5.477a	3.641a	3.756a	3.752a	5.186a	4.007a	3.561a
<i>Protease</i>							
En07	0.063ab	0.057ab	0.055ab	0.061ab	0.071a	0.054ab	0.067ab
En07 + M.o.	0.068ab	0.055ab	0.059ab	0.06ab	0.064ab	0.049b	0.074a

En07 - *Waitea circinata*; M.o. - *Magnaporthe oryzae*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5%.

3.3.1.2 Quantificação da atividade enzimática: co-cultivo

W. circinata produziu um máximo de atividade de GLU em 72 horas e um mínimo de atividade em 24 horas (Tabela 3.2). Observou-se que quando avaliado CHI, o máximo e o mínimo de atividade foi em 144 horas e 120 horas, respectivamente (Tabela 3.2). Quanto à protease o máximo de atividade de *W. circinata* foi em 120 horas e o mínimo em 24 horas (Tabela 3.2).

En07	0.079a	0.055b	0.056b	0.053b	0.056b	0.069ab	0.061b
En07 + M.o.	0.067a	0.079a	0.081a	0.087a	0.094a	0.081a	0.093a
M.o.	0.061a	0.051b	0.059b	0.055b	0.056b	0.053b	0.065b

3.3.2 Potencial efeito e termoestabilidade *in vitro* do micélio de *Waitea circinata* na inibição do crescimento micelial de *Magnaporthe oryzae*

Destacou-se os tratamentos A10g, S5g, S10g e A5g com redução da área da colônia de *M. oryzae* de 98%, 50%, 50% e 38%, respectivamente (Figura 3.4A).

En07 - *Waitea circinata*; M.o. - *Magnaporthe oryzae*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5%.

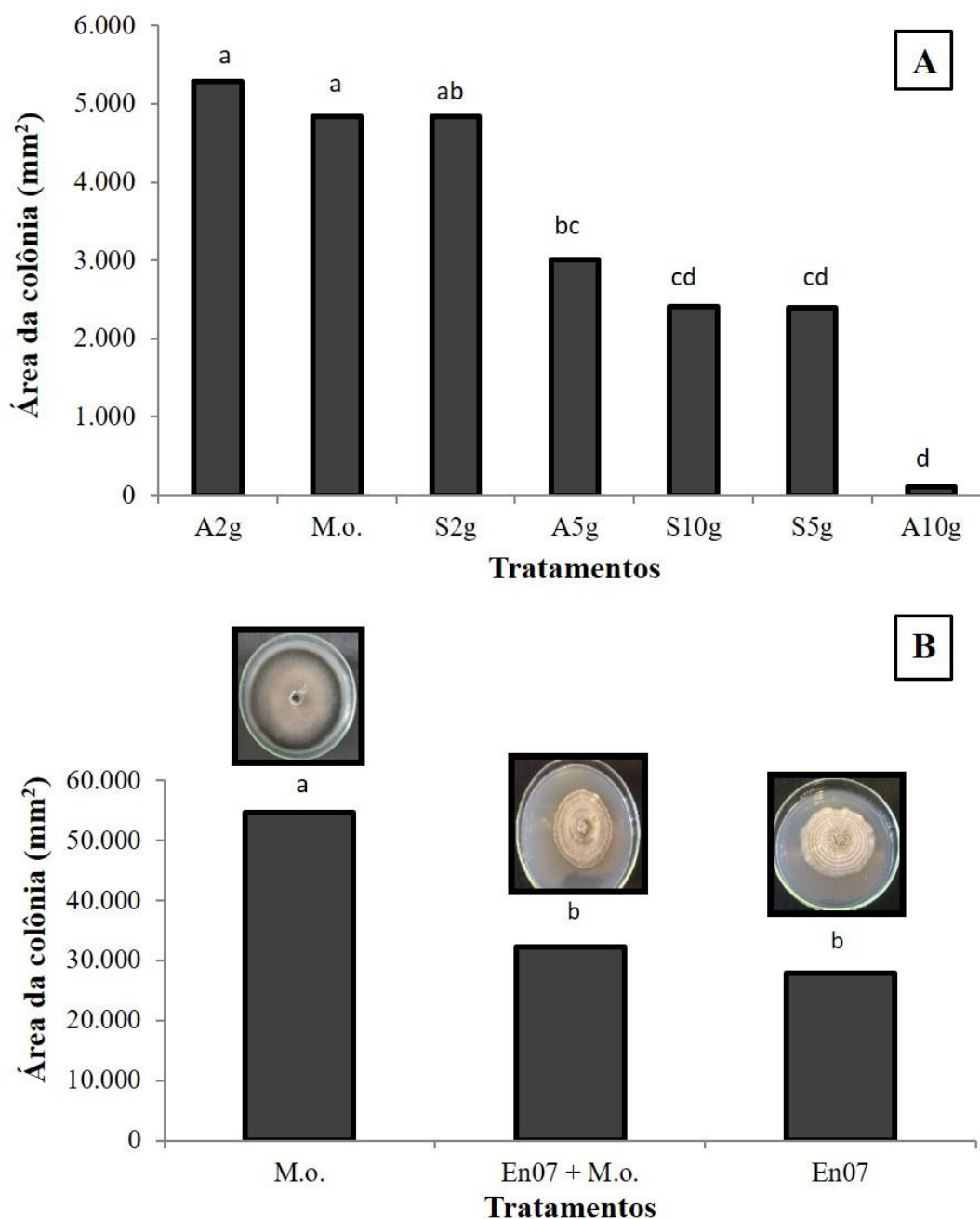


Figura 3.4 Área da colônia (mm²) de *Magnaporthe oryzae*, *in vitro*, pela massa micelial de *Waitea circinata* (A) e não-voláteis (B). En07 - *Waitea circinata*; M.o. - *Magnaporthe oryzae*; A2g, A5g e A10g – autoclavado; S2g, S5g e S10g – não autoclavado. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey (p=0.05).

3.3.3 Germinação de conídios e formação de apressórios de *Magnaporthe oryzae* pelo micélio de *Waitea circinata*

À germinação de conídios e formação de apressórios de *M. oryzae* pelo micélio do isolado micorrízico não foi afetada (Figura 3.5A;B).

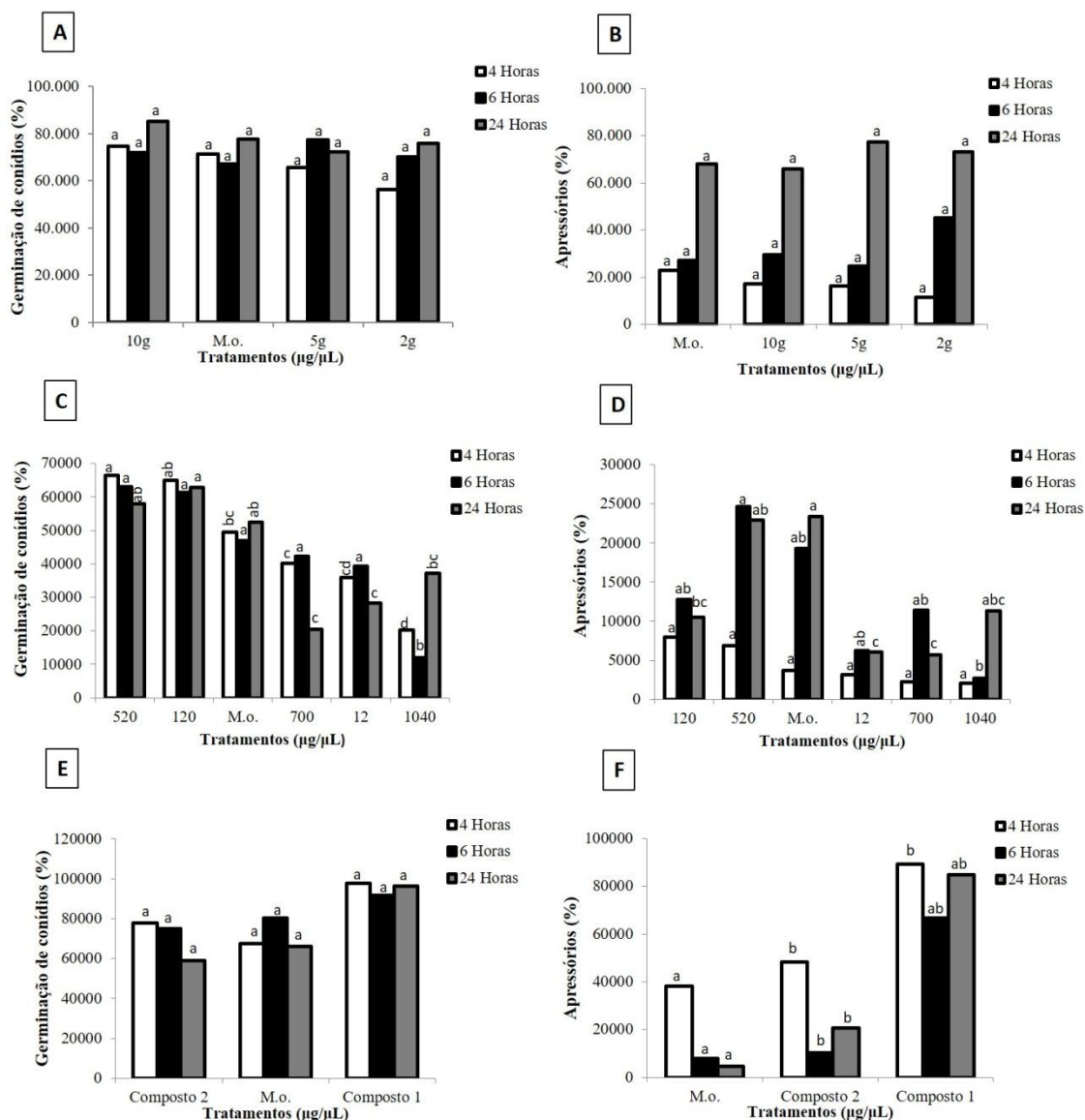


Figura 3.5 Efeito de *Waitea circinata* na germinação de conídios e formação de apressórios de *Magnaporthe oryzae*. A e B) Micélio; C e D) Extrato da massa micelial; E e F) Compostos do extrato da massa micelial. M.o. – *Magnaporthe oryzae*; 2g, 5g e 10g – Suspensões do micélio de *Waitea circinata*; 12, 120, 520, 700 e 1040 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – Suspensões do extrato da massa micelial; Composto 1 e 2 – compostos obtidos do extrato da massa micelial. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey ($p=0.05$).

3.3.4 Supressão da brusone foliar pelo micélio de *Waitea circinata*

Ensaio 1: Todos os tratamentos reduziram a severidade de brusone foliar em relação ao controle com redução média de 79%. E não diferiu entre as suspensões (Figura 3.6A).

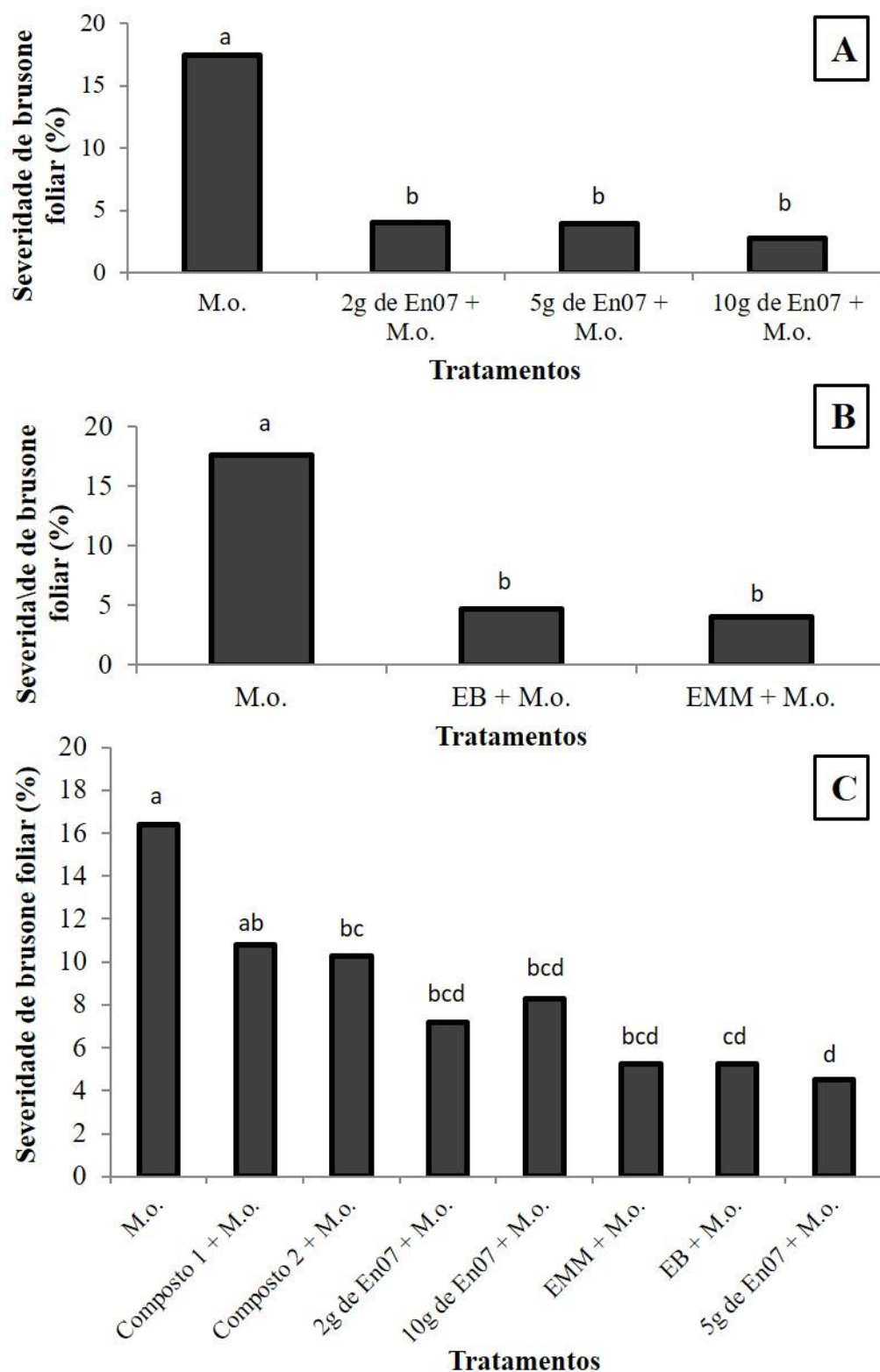


Figura 3.6 Supressão de brusone foliar por *Waitea circinata*. A) Massa micelial; B) Extratos - EB: extrato bruto e EMM: extrato da massa micelial; C) Massa micelial, extratos e compostos. M.o. – *Magnaporthe oryzae*; En07 – *Waitea circinata*; 2g, 5g e 10g – Suspensões do micélio de *Waitea circinata*; EMM – extrato da massa micelial; EB – extrato bruto; Composto 1 e 2 – compostos obtidos do extrato da massa micelial. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey ($p=0.05$).

Ensaio 2: Aos 4 e 6 dias após a inoculação com *M. oryzae*, todos os tratamentos reduziram a severidade de brusone foliar quando comparado ao controle. Aos 8 dias, apenas os tratamentos 3 (5 g En07 + M.o.) e 4 (10 g En07 + M.o.) diferiram estatisticamente do controle. Quando avaliada a AACPD observou-se que todos os tratamentos diferiram significativamente do controle, com média de 38% a menos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 Progresso da brusone aos 4, 6 e 8 dias após a inoculação com *M. oryzae* e três diferentes concentrações da massa micelial de *Waitea circinata*.

Tratamentos	4 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	6 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	8 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	AACPD*
T1 (M.o 3×10^5)	0.62 a	9.46 a	45 a	65.18 a
T2 (2g e M.o 3×10^5)	0.31 b	5.29 b	33.27 ab	44.48 b
T3 (5g e M.o 3×10^5)	0.25 b	3.53 bc	31.43 b	39.01 b
T4 (10g e M.o 3×10^5)	0.13 c	3.61 c	30.08 b	37.59 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem de acordo com o teste Tukey ($p=0.05$). *Área abaixo da curva de progresso da doença.

3.3.5 Potencial efeito de metabólitos não-voláteis de *Waitea circinata*

O filtrado de *W. circinata* destacou-se com redução da área da colônia de 49% de *M. oryzae*. Observou-se que não houve produção de conídios nos dois tratamentos (T1: En07; T2: En07 + M.o.) enquanto que no controle já foi verificada a produção de 2×10^5 esporos/mL (Figura 3.4B).

3.3.6 Obtenção dos extratos

Obteve-se aproximadamente 1 g de cada extrato do isolado micorrízico que foi usado nos ensaios químicos e biológicos. Devido a quantidade obtida de cada extrato ser muito pequena, teve-se muita dificuldade em isolar e caracterizar as moléculas presentes nos extratos de *W. circinata*.

3.3.7 Análise por Cromatografia em Camada Delgada dos extratos de *Waitea circinata*

Na busca por um sistema eluente adequado para a eluição dos compostos em CCD, observou-se que o sistema de solventes acetato de etila: metanol (95:5 v/v) foi inadequado, pois não foi capaz de promover uma separação efetiva dos compostos (Figura 3.7).

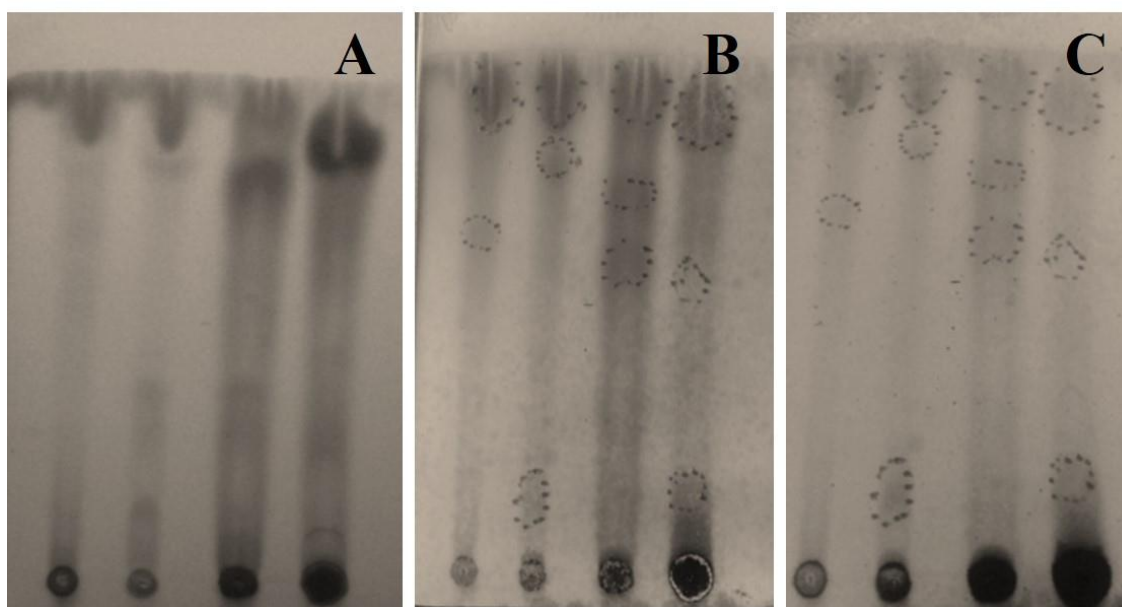


Figura 3.7 Cromatografia em camada delgada analítica com sistema eluente acetato de etila: metanol (95:5 v/v) dos extratos de *Waitea circinata*: extrato da massa micelial (EMM), extrato micelial (EM), extrato bruto (EB), extrato liofilizado (EL). A: Visualização em luz ultravioleta (UV) à 254 nm. B: Visualização com solução de anisaldeído. C: Visualização com solução de ácido sulfúrico/metanol.

A partir da utilização do sistema eluente diclorometano: metanol: ácido acético glacial (95: 4,5: 0,5 v/v), os resultados confirmaram que este sistema de solventes foi mais adequado. A análise da placa em luz ultravioleta nos comprimentos de onda equivalentes à 254 nm e 366 nm revelou uma série de manchas para cada

amostra aplicada. Estas manchas correspondem à compostos não aromáticos, pois não foi observada grande absorção na região indicada. Ao serem borrifadas com reagente Dragendorff não verificou-se a formação de manchas alaranjadas (teste positivo) que corresponderia à manchas características de alcaloides. Logo após, foram borrifadas com reagente anisaldeído e colocadas em chapa aquecedora. Observou-se várias manchas com tons roxo e cinza sugerindo a presença de esteroides, terpenos ou açúcares (Figura 3.8).

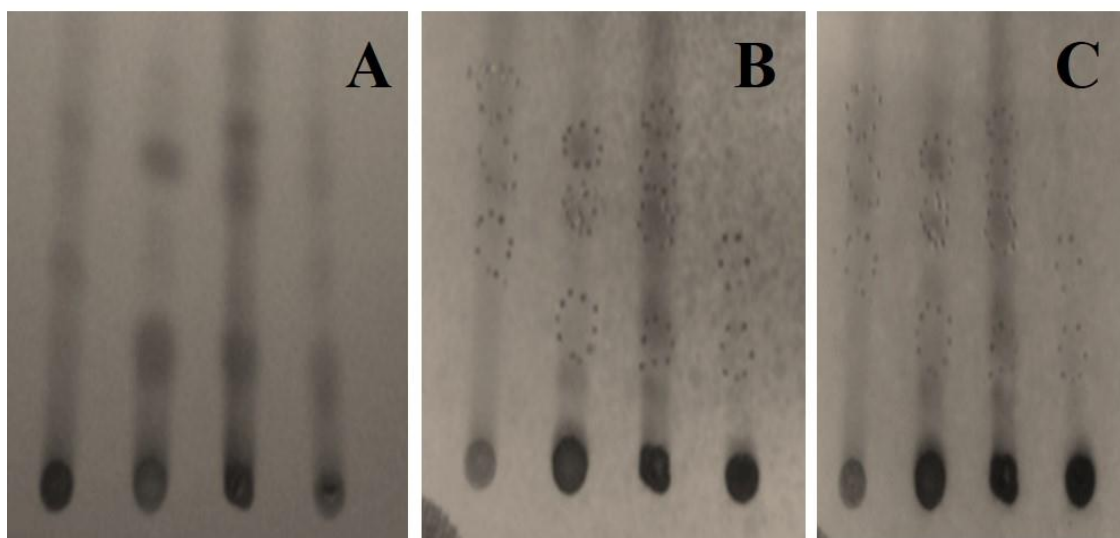


Figura 3.8 Cromatografia em camada delgada analítica com sistema eluente composto por diclorometano: metanol: ácido acético glacial (95: 4,5: 0,5 v/v) dos extratos de *Waitea circinata*: extrato da massa micelial (EMM), extrato micelial (EM), extrato bruto (EB), extrato liofilizado (EL). A: Visualização em luz ultravioleta (UV) à 254 nm. B: Visualização com solução de anisaldeído. C: Visualização com solução de ácido sulfúrico/metanol.

A análise de cromatografia em camada delgada analítica revela que o perfil de constituintes químicos dos extratos da massa micelial e liofilizado é semelhante. Foi possível verificar que existem compostos com o mesmo fator de retenção (R_f). Para o extrato micelial e o extrato bruto, observou-se uma mancha majoritária com R_f pequeno, que, inclusive está presente no extrato liofilizado em pequena quantidade. Todavia, no caso do extrato bruto, observou-se dois compostos com R_f semelhantes, próximo ao da mesma substância presente no extrato micelial (Figura 3.8).

3.3.8 Análise dos extratos de *W. circinata* em ESIQ-TOF

Extrato da massa micelial (EMM): O EMAR apresentou um pico referente ao íon protonado em m/z : 274.2759, correspondendo à fórmula molecular $C_{16}H_{35}NO_2$ (massa calculada: 274.2741; erro relativo de 6.56 ppm; Figura 3.9). Desse extrato foram obtidos dois compostos que foram testados *in vitro* e *in vivo*.

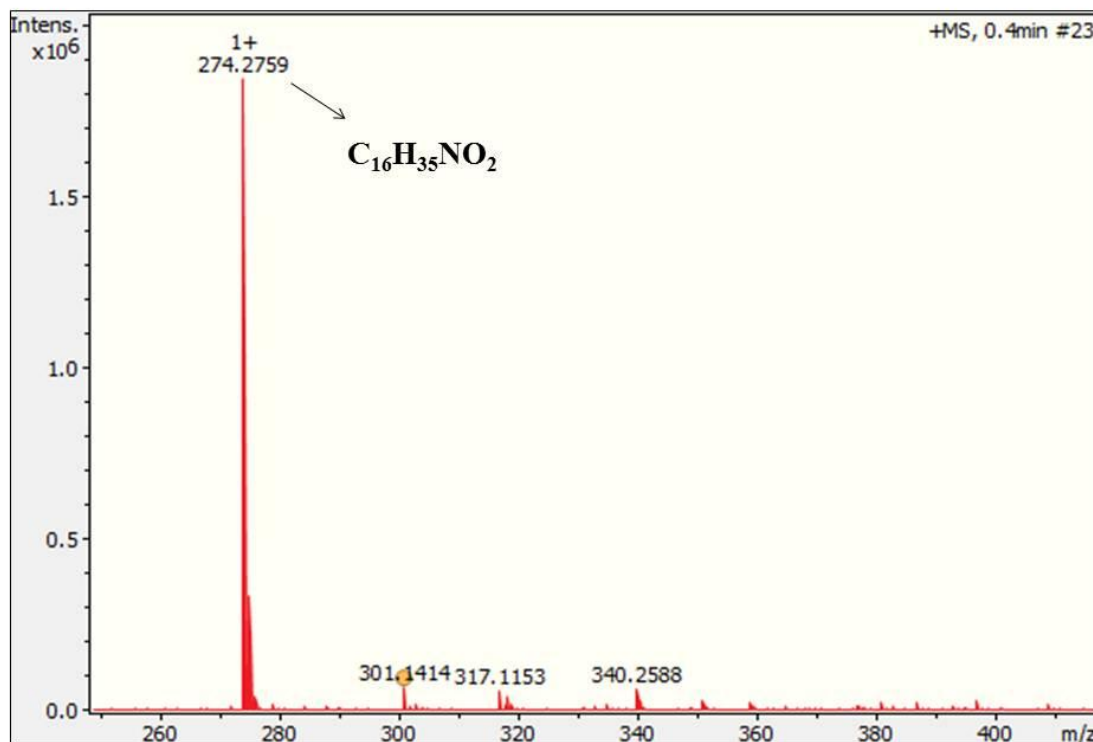


Figura 3.9 Espectro de massas ESI (+) Q-TOF do extrato da massa micelial de *Waitea circinata*.

Extrato liofilizado (EL): O EMAR apresentou um pico referente ao íon protonado em m/z : 274.2767 correspondendo à fórmula molecular $C_{16}H_{35}NO_2$ (massa calculada: 274.2741; erro relativo de 9.47 ppm; Figura 3.10).

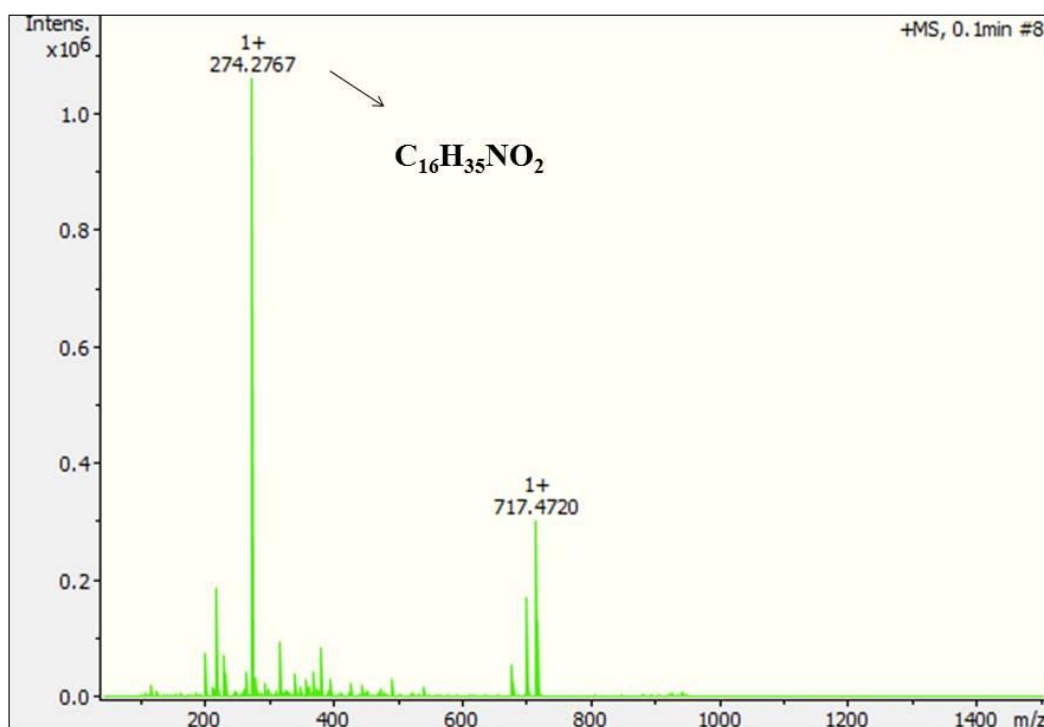


Figura 3.10 Espectro de massas ESI (+) Q-TOF do extrato liofilizado de *Waitea circinata*.

Extrato micelial (EM): O EMAR apresentou um pico referente ao íon protonado em m/z : 441.3020 correspondendo a fórmula molecular $C_{22}H_{40}N_4O_5$ (massa calculada: 441.3071; erro relativo de -11.55 ppm; Figura 3.11).

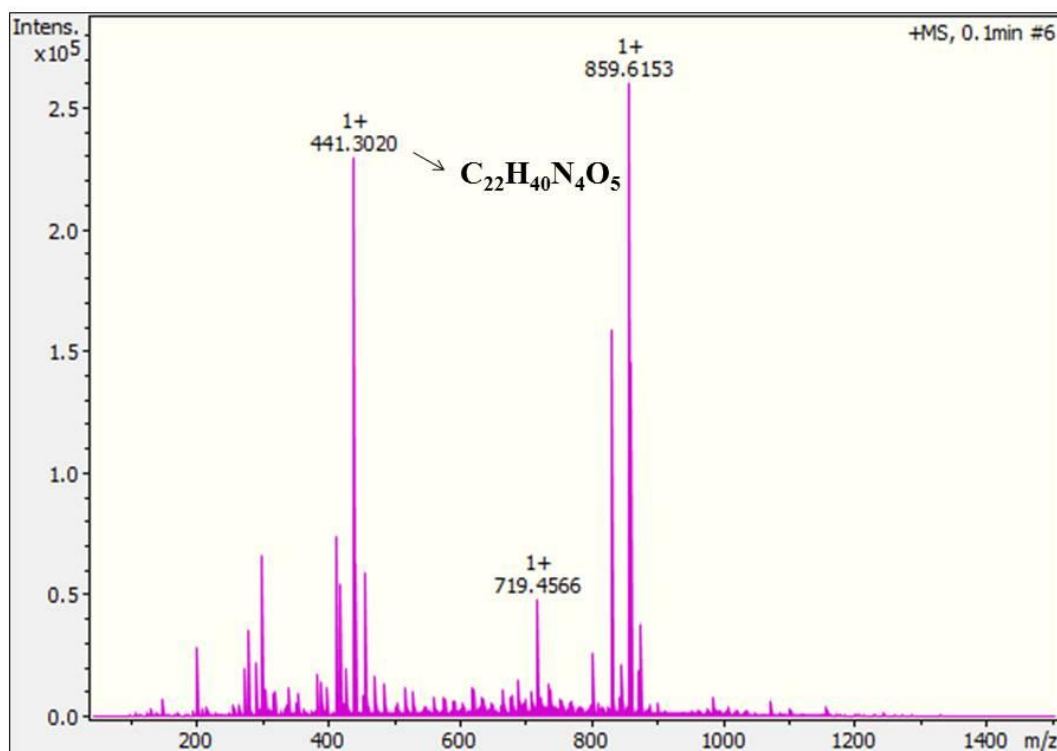


Figura 3.11 Espectro de massas ESI (+) Q-TOF do extrato micelial de *Waitea circinata*.

Extrato bruto (EB): O EMAR apresentou um pico referente ao íon protonado em m/z : 274.2772 correspondendo a fórmula molecular $C_{16}H_{35}NO_2$ (massa calculada: 274.2741; erro relativo de 11.30 ppm; Figura 3.12).

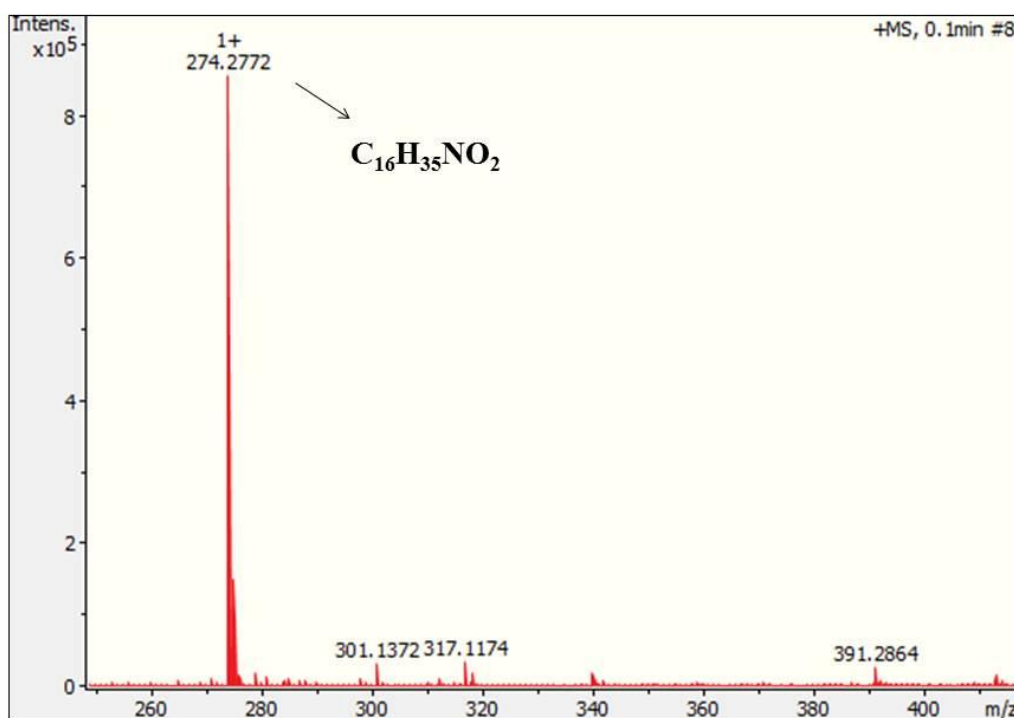


Figura 3.12 Espectro de massas ESI (+) Q-TOF do extrato bruto de *Waitea circinata*.

3.3.9 Potencial efeito *in vitro* do extrato da massa micelial de *Waitea circinata*

A eficiência das diluições do extrato da massa micelial no crescimento micelial de *M. oryzae* não foi verificada diferença significativa quando comparado ao controle (Figura 3.13).

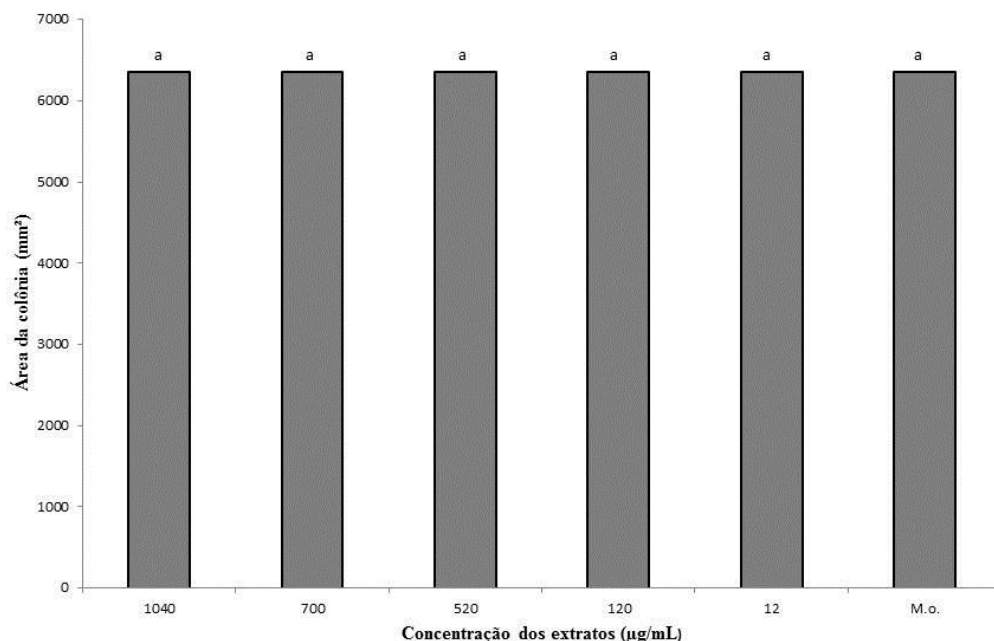


Figura 3.13 Área da colônia de *Magnaporthe oryzae* na presença do extrato da massa micelial.

Ensaio 1: Quanto à germinação de conídios após 4 e 6 horas da instalação do ensaio, o tratamento (1.040 µg/mL + M.o.) foi o único que diferiu estatisticamente do controle, enquanto que com 24 horas, (700 µg/mL + M.o.) e (12 µg/mL + M.o.) diferiram estatisticamente do controle (Figura 3.5C). Quanto à formação de apressórios destacou-se o tratamento (700 µg/mL + M.o.) com redução de 75.71% às 24 horas após a instalação do ensaio (Figura 3.5D).

Ensaio 2: Não foi observada diferença significativa quando comparado ao controle na germinação de conídios de *M. oryzae* (Figura 3.5E). Quanto à formação de apressórios, os dois compostos diferiram significativamente do controle, enquanto que as 6 e 24 somente o composto 2 apresentou diferença estatística quando comparado ao controle (Figura 3.5F).

3.3.10 Potencial efeito *in vivo* do micélio, extrato e compostos na supressão da brusone foliar

Ensaio 1: Os tratamentos (EB - 1.040 µg/mL; EMM - 1.040 µg/mL) diferiram significativamente do controle, no entanto, não verificou-se diferença estatística entre os dois tratamentos (Figura 3.6B). Ensaio 2: Aos 4, 6 dias e na avaliação da AACPD, os tratamentos diferiram significativamente do tratamento controle (Tabela 3.4). Ensaio 3: Destacou-se o tratamento (5 g En07 + M.o.) com eficiência de supressão de 72.52% (Figura 3.6C). Ensaio 4: Aos 4, 6 e 8 dias, e na avaliação da AACPD todos os tratamentos diferiram do controle. Na AACPD destacou-se o tratamento (EMM + M.o.) com eficiência de supressão de 90.79% (Tabela 3.5).

Tabela 3.4. Progresso da brusone aos 4, 6 e 8 dias após a inoculação com *M. oryzae* (M.o.) e extratos (EB – extrato bruto e EMM – extrato da massa micelial) de *Waitea circinata*.

Tratamentos	4 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	6 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	8 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	AACPD*
T1 (M.o. 3x10 ⁵)	0.55 a	3.93 a	18.86 a	27.83 a
T2 (EB e M.o. 3x10 ⁵)	0.18 b	1.1 b	0.59 b	3.18 b
T3 (EMM e M.o. 3x10 ⁵)	0.13 b	0.85 b	0.13 b	2.12 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem de acordo com o teste Tukey (p=0.05).

*Área abaixo da curva de progresso da doença.

Tabela 3.5 Progresso da brusone aos 4, 6 e 8 dias após a inoculação com *M. oryzae* (M.o.), extratos (EB – extrato bruto e EMM – extrato da massa micelial) e massa micelial (T2) de *Waitea circinata*.

Tratamentos	4 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	6 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	8 dias após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	AACPD*
T1 (M.o. 3×10^5)	1.92 a	9.92 a	16.71 a	40.4 a
T2 (M5g e M.o. 3×10^5)	1.34 b	3.95 b	5.58 b	16.16 b
T3 (EB e M.o. 3×10^5)	0.71 bc	1.5 bc	1.87 b	6.31 c
T4 (EMM e M.o. 3×10^5)	0.4 c	0.99 c	0.91 b	3.72 c

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem de acordo com o teste Tukey ($p=0.05$). *Área sob a curva de progresso da doença.

3.4 DISCUSSÃO

Em trabalho anterior de Carvalho et al. (2015), o extrato bruto de *W. circinata* foi eficiente na redução do crescimento micelial e no controle da brusone do arroz sem causar patogenicidade. Como os resultados obtidos foram promissores investigou-se a eficiência do micélio micorrízico, e do extrato da massa micelial e dos seus compostos no controle da brusone do arroz. No presente trabalho, observou-se que *W. circinata* [10 g/L] reduziu o crescimento de *M. oryzae* e suprimiu a brusone foliar. O EMM (700 µg/mL) reduziu a formação de apresssórios de *M. oryzae*, suprimiu a severidade de brusone foliar e reduziu a AACPD. É produtor de metabólitos não-voláteis e das enzimas glucanase, quitinase e protease.

O isolado micorrízico produziu AIA (Figura 3.3). Filippi et al. (2011) ao observar que quatro de 18 isolados de Rhizobactérias produziam AIA pode concluir que estes podem estimular o aumento da biomassa, tamanho das raízes e parte aérea do arroz. De acordo com Rêgo et al. (2014) a sinalização por hormônios como o AIA em resposta a associação com PGPMs (microrganismos promotores do crescimento vegetal) pode acarretar em modificações no sistema radicular de plantas. Logo, pode-se inferir que a quantificação desse hormônio em plantas de arroz associadas com *W. circinata* será fundamental para o esclarecimento dessa interação.

W. circinata cultivado em meio enriquecido com a parede celular de *M. oryzae* proporcionou um máximo de atividade de GLU em 48 horas (5.674 U mg⁻¹; Tabela 3.1) enquanto que no co-cultivo foi em 72 horas (16.123 U mg⁻¹; Tabela 3.2). Quanto a CHI, durante o cultivo com a parede do patógeno o máximo de atividade observada foi em 24 horas (5.477 U mg⁻¹; Tabela 3.1) e durante o co-cultivo observou-se esse máximo em 144 horas (2.557 U mg⁻¹; Tabela 3.2). Já na quantificação de protease pelo isolado micorrízico, observou-se um máximo de atividade durante o cultivo com a parede em 168 horas (0.074 U mg⁻¹; Tabela 3.1) e durante o co-cultivo em 120 horas (0.094 U mg⁻¹; Tabela 3.2). Segundo Brzezinska et al. (2014), os fungos produtores de quitina podem inibir o crescimento de muitas doenças fúngicas e dessa

forma, podem contribuir para a formulação de biofungicidas e assim contribuir para uma agricultura mais sustentável. Lopes et al. (2012) ao avaliar a produção enzimática por isolados de *Trichoderma* na presença da parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* concluiu que todos os isolados testados secretaram as enzimas glucanase, quitinase e protease.

As proporções de *W. circinata* A10g, A5g, S10g e S5g reduziram significativamente a área da colônia de *M. oryzae* em 98%, 38%, 50% e 50%, respectivamente. Pode-se verificar que o micélio do isolado micorrízico não perde sua estabilidade quando autoclavado, pois nas proporções A5g e A10g foi capaz de reduzir a área da colônia do patógeno. Logo, pode-se inferir que o micélio de *W. circinata* é eficiente na inibição do crescimento micelial de *M. oryzae* (Figura 3.4).

Na supressão da brusone foliar pelo micélio do isolado micorrízico destacou-se o tratamento 4 (10g En07 + M.o.) com eficiência de supressão de 84%, aos oito dias após a inoculação com *M. oryzae*, além de apresentar a menor AACPD (37.59) quando comparado ao controle (65.18) representando 42% de eficiência de supressão (Tabela 3.3). Souza et al. (2015) ao avaliar o tratamento contendo silício em conjunto com os bioagentes *Burkholderia pyrrocinia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma asperellum* observaram uma redução da severidade da brusone foliar em 96%. Chaibub et al. (2016 - no prelo) verificaram que ao utilizar o isolado do filoplano do arroz *Cladosporium* sp. houve redução da severidade da brusone foliar em 84% quando aplicado antes do patógeno e 78.6% quando aplicado simultaneamente com o patógeno. A massa micelial é o fungo vivo, logo produz GLU, CHI e PROT que podem contribuir para a redução do crescimento micelial de *M. oryzae*.

No presente estudo, quando avaliada a produção de metabólitos não-voláteis pela metodologia do filtrado pode-se verificar que houve inibição da área da colônia em 49% de *M. oryzae* (Figura 3.4). Observou-se que os metabólitos não-voláteis liberados pelo isolado micorrízico além de inibir o crescimento do patógeno também diminuem a conidiogênese de *M. oryzae*, o que torna seu uso promissor no controle da brusone do arroz. Semelhantemente a este trabalho, Wang et al. (2013) verificaram que o filtrado da estirpe MF-91 (*Chaetomium aureum*) inibiu o crescimento micelial de *M. grisea*, além da germinação de conídios e formação de apressórios. Os autores também inferiram que com o aumento da concentração do filtrado houve uma maior inibição da germinação de conídios e formação de apressórios de *M. grisea*.

Devido à quantidade obtida de cada extrato ser muito pequena (1 g), teve-se dificuldade em isolar e caracterizar as moléculas presentes nos extratos de *W. circinata*. Assim, fez-se uma primeira análise por CCD em que o sistema de eluentes encontrado mostrou uma separação das manchas observadas, correspondentes à compostos de baixa polaridade. Entretanto, para todos os extratos, exceto o extrato da massa micelial (EMM), observou-se uma que a maioria dos compostos possui baixo tempo de retenção, sugerindo a presença de substâncias de maior polaridade nos extratos. Serão necessárias a utilização de outras fases estacionárias (fase reversa, ou permeação em gel) para análise dessas amostras. A análise química dos extratos produzidos por *Waitea circinata* mostrou-se bastante complexa.

Para as condições utilizadas, a análise por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) mostrou que o extrato da massa micelial (EMM), extrato bruto (EB) e extrato liofilizado (EL) possuem o mesmo perfil químico. O pico majoritário presente nesses extratos m/z 274.2767 sugere um composto de massa molecular 274.2741, que pode ser atribuída à esfinganina (Figura 3.9; 3.10; 3.12). Segundo Carl et al. (2001) metabólitos esfingolipídios podem ser produzidos por fungos e podem estar envolvidos em diversos processos, como a patogênese, a estabilidade da membrana e ao estresse hídrico.

Para as condições utilizadas, a análise por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) demonstrou que no extrato micelial houve um pico majoritário m/z 441.3020 que sugere um composto de massa molecular 441.3071 e que pode ser atribuída a várias possibilidades de sequências de aminoácidos (Figura 3.11). Pedras et al. (2005) ao isolar, identificar e sintetizar os metabólitos presentes em *Rhizoctonia solani* (AG 2-1) também observou a presença de sequências de aminoácidos. Aliferes & Jabaji (2010b) ao analisarem a composição metabólica de *Rhizoctonia solani* observaram uma mistura complexa de compostos fenólicos, ácidos carboxílicos, carboidratos, ácidos gordos e aminoácidos. Aliferes & Jabaji (2010a) ao analisarem os compostos por CG-EM de *Rhizoctonia solani* observaram a presença de α - α -trehalose, D-glicose, xilitol, glucitol e outros. Ainda concluíram que os metabólitos dependiam do estágio de desenvolvimento dos escleródios e, dessa forma, contribuíam para a classificação e discriminação dentro dos grupos de anastomose. Sabe-se que as condições ambientais (temperatura e luminosidade) e nutricionais (meio de cultura) podem influenciar na produção de metabólitos secundários.

Em trabalho publicado anteriormente por Carvalho et al. (2015), o extrato bruto do isolado micorrízico inibiu a formação de apressórios de *M. oryzae* em 100%. A análise desse extrato por espectrometria de massas revelou a presença de benzofenonas. No presente trabalho, acrescentamos o EMM que é de mais fácil obtenção e de custo menor, pois para sua produção gasta-se menos solvente e a quantidade do extrato obtida é maior, em relação aos outros métodos de extração utilizados por Carvalho et al. (2015; Figura 3.2) e também descritos na literatura. O EMM (700 µg/mL) às 24 horas após a instalação do ensaio reduziu a germinação de conídios e a formação de apressórios (76%) de *M. oryzae* (Figura 3.5D). Sabe-se que a germinação de conídios e a formação de apressórios de *M. oryzae* é crucial para os estudos de patogenicidade. Como os resultados do presente trabalho mostraram uma eficiência do EMM (700 µg/mL) na inibição da formação de apressórios, acredita-se no sucesso do seu uso no biocontrole da brusone do arroz. Em estudo análogo, Khalil et al. (2014) ao estudar os compostos obtidos do extrato bruto de *Streptomyces flavotricini* observaram que após sete dias de crescimento houve redução do crescimento de *Pyricularia grisea* através da formação de zonas de inibição. Liang et al. (2015) isolaram oito compostos do extrato acetato de etila de *Rhizoctonia solani* e os testaram na germinação de conídios de *M. oryzae*. Observaram que o ácido *m*-hydroxyphenylacetic, o ácido (Z)-3-metilpent-2-en1,5-dioico e o ácido 3-metoxifurano-2-carboxílico apresentaram baixa inibição na germinação de conídios do patógeno. O atraso na germinação de conídios e formação de apressórios de *M. oryzae* pelo micélio e extrato de *W. circinata* corrobora a eficiência na supressão da severidade de brusone foliar. Pode ser atribuída a ligação do sistema de defesa da planta e na alta velocidade da expressão dos mecanismos de defesa que atuaram.

Quando da avaliação dos EB e EMM pôde-se observar a eficiência de ambos no controle da brusone, com destaque para o tratamento 3 (EMM + M.o.) com eficiência de supressão de 77%, além de 92% de redução na AACPD (Figura 3.6B; Tabela 3.4). No ensaio comparativo (micélio, extratos e compostos) pode-se verificar que o tratamento (5g de En07 + M.o.) se destacou em relação aos demais, com supressão de 72% (Figura 3.6C). Na AACPD do ensaio comparativo destacou-se o tratamento (EMM + M.o.) com eficiência de supressão de 90%. (Tabela 3.5). Em trabalho anterior de Carvalho et al. (2015), o extrato bruto reduziu a AACPD em 25% aos oito dias após a inoculação com *M. oryzae*. Em estudos similares, o extrato bruto de *Epicoccum* sp. e a cerulenina de *Sarocladium oryzae* reduziram a severidade da brusone

foliar em 27% e 63%, respectivamente (Sena et al., 2013; Côrtes et al., 2014). Assim, pode-se afirmar que o EMM do presente trabalho foi mais eficiente na supressão da brusone foliar que os demais BCFs. A severidade de brusone foliar foi reduzida desde o quarto dia após a inoculação e culminou em uma menor AACPD. A atividade de quitinaase iniciou às 24 h e foi acompanhada da glucanase. Essas enzimas degradam a parede celular de *M. oryzae*, reduzindo a severidade de brusone foliar e causando a lise celular.

O antagonismo entre *W. circinata* e *M. oryzae* neste trabalho foi explicado pela produção de enzimas líticas (Tabelas 3.1; 3.2) e compostos não-voláteis do isolado micorrízico (Figura 3.4). A eficiência do EMM na redução do crescimento micelial e inibição da germinação e formação de apressórios pode ser explicada pela sua composição que possivelmente são estruturas chamadas de esfinganinas (Figura 3.9). Faz-se necessário estudos *in vivo* por indução de resistência e promoção de crescimento além de um estudo mais detalhado dos constituintes químicos presentes nos extratos de *W. circinata*. Outra forma de desvendar essa interação é através do sequenciamento de nova geração (RNA-seq), ou seja, a avaliação de genes diferencialmente expressos na interação *W. circinata* X *M. oryzae* permitirá o esclarecimento dos mecanismos de biocontrole.

3.5 CONCLUSÕES

W. circinata produziu AIA *in vitro* e apresentou atividade das enzimas GLU, CHI e PROT em duas metodologias de cultivo;

Metabólitos não-voláteis de *W. circinata* inibiram em 49% o crescimento de *M. oryzae*;

O micélio da micorriza 10 g/L reduziu o crescimento de *M. oryzae* em 98% e suprimiu a brusone foliar em 84%;

O EMM (700 µg/mL) reduziu em 76% a formação de apressórios de *M. oryzae*;

Em casa de vegetação, EMM suprimiu a severidade da brusone foliar em 77% e reduziu em 92% a AACPD;

O extrato da massa micelial (EMM), extrato bruto (EB) e extrato liofilizado (EL) apresentaram o mesmo perfil químico que pode ser atribuído à esfinganina.

3.6 REFERÊNCIAS

ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. ^1H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia. **Metabolomics**, v. 6, p. 96-108, 2010a.

ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Metabolite composition and bioactivity of *Rhizoctonia solani* sclerotial exudates. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7604-7615, 2010b.

ALIFERIS, K. A.; CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 7, n. 1, p. 35-53, 2011.

ALMEIDA, F. B. D. R.; CERQUEIRA, F. M.; DO NASCIMENTO SILVA, R.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 8, p. 1189-1193, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 680-685, 1976.

BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current microbiology**, v. 68, n. 1, p. 71-81, 2014.

CABRAL, C.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMOES, N. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic

bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3831-3838, 2004.

CARL, K. Y. NG.; HETHERINGTON, A. M. Sphingolipid-mediated signalling in plants. **Annals of Botany**, v. 88, n. 6, p. 957-965, 2001.

CARVALHO, J. C. B.; SOUSA, K. C. I.; BRITO, D. C.; CHAIBUB, A. A.; LUZINI, A. P.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; FILIPPI, M. C. C. F.; KATO, L.; VAZ, B. G.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; ARAÚJO, L. G. Biocontrol potential of *Waitea circinata*, an orchid mycorrhizal fungus, against the rice blast fungus. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 151-159, 2015.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja. Documentos**, 1999.

CHAIBUB, A.A.; CARVALHO, J.C.B.; SILVA, C.S.; COLLEVATTI, R.G.; GONÇALVES, F.J.; CÔRTEZ, M.V.C.B.; FILIPPI, M.C.C.; FARIA, F.P.; LOPES, D.C.B.; ARAÚJO, L.G. Defence responses in rice plants in prior and simultaneous applications of *Cladosporium* sp. during leaf blast suppression. *Environmental Science and pollution research*. No prelo.

CHAMOUN, R.; ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Identification of signatory secondary metabolites during mycoparasitism of *Rhizoctonia solani* by *Stachybotrys elegans*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: sétimo levantamento**, abril 2016. Brasília. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_07_08_59_54_boletim_graos_a_gosto_2014.pdf>.pdf. Acesso em: 18/Maio/2016.

CÔRTEZ, M. V.; SILVA-LOBO, V. L.; FILIPPI, M. C.; LIMA, D.; PRABHU, A. S. Potential for using crude extract of *Sarocladium oryzae* for suppression of rice blast. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 28-34, 2014.

FERNANDEZ, J.; WILSON, R. Why No Feeding Frenzy? Mechanisms of Nutrient Acquisition and Utilization During Infection by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, n. 10, p. 1286-1293, 2012.

FILIPPI, M. C. C.; DA SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; MORAES, A. J. G.; PRABHU, A. S. Leaf Blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v. 58, p. 160-166, 2011.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186-194, 2012.

GERALDINE, A. M.; LOPES, F. A. C.; CARVALHO, D. D. C.; BARBOSA, E. T.; RODRIGUES, A. R.; BRANDÃO, R. S.; ULHOA, C. J.; JUNIOR, M. L. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 308-316, 2013.

HARRIS, T. M.; HARRIS, C. M.; HILL, J. E.; UNGEMACH, F. S.; BROQUIST, H. P.; WICKWIRE, B. M. (1S,2R,8aS)-1,2-Dihydroxyindolizidine formation by *Rhizoctonia leguminicola*, the fungus that produces slaframine and swainsonine. **J. Org. Chem.**, v. 52, p. 3094-3098, 1987.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

KHALIL, M. S.; Moubasher, H.; Hasan, F. F. Biological Control of Rice Blast Disease by *Streptomyces flavotricini*. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 5, p. 1453-1461, 2014.

LAHLALI, R.; HIJRI, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS microbiology letters**, v. 311, n. 2, p. 152-159, 2010.

LIANG, X.; WANG, X.-H.; LUO, R.-Y.; LU, S.-Q.; GUO, Z.-J.; WANG, M.-A.; YANG, L.; ZHOU, L.-G. Secondary metabolites of rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn and their biological activities. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 1, p. 80-87, 2015.

LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; GERALDINE, A. M.; BRANDÃO, R. S.; MONTEIRO, V. N.; JÚNIOR, M. L.; COELHO, A. S. G.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal biology**, v. 116, n. 7, p. 815-824, 2012.

MA, Y.; LI, Y.; LIU, J.; SONG, Y.; TAN, R. Anti *Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 451-456, 2004.

MALAVOLTA, V. M. A.; AZZINI, L. E.; BASTOS, C. R.; SALOMON, M. V.; CASTRO, J. L. Progresso da brusone nas folhas e panículas de genótipos de arroz de terras altas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 186-188, 2008.

METLIN (Scripps Center of Metabolomics) Disponível em: <<http://www.metlin.scripps.edu/index.php>>. Acesso em: 18/Jun./2016.

MONTEIRO, V. N.; STEINDORFF, A. S.; DOS REIS ALMEIDA, F. B.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J.; FÉLIX, C. R.; SILVA, R. N. *Trichoderma reesei* Mycoparasitism against *Pythium ultimum* is coordinated by G-alpha Protein GNA1 Signaling. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, 2014.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2009, 190 p.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. Characterization of a 29-kDa β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS microbiology letters**, v. 183, n. 1, p. 119-123, 2000.

NOTTEGHEM, J. L. Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. **BLAST and upland rice: report and recommendations from the meeting for international collaboration in upland rice improvement**. International Rice Research Institute: Los Baños, 1981. p. 43-51.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; DOS SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fósforo e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

PEDRAS, M. S. C.; YU, Y.; LIU, J.; TANDRON-MOYA, Y. A. Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*: isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 9-10, p. 717-722, 2005.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; MORAIS, O. P. An Unprecedented Outbreak of Rice Blast on a Newly Released Cultivar BRS Colosso in Brazil. In: WANG, G. L. V., B. (Ed.). **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast**. Netherlands: Springer Science, 2009. p. 257-267.

RÊGO, M. C. F.; ILKIU-BORGES, F.; FILIPPI, M. C. C. D.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, G. B. D. Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. **Journal of Botany**, 2014.

SILVA, C. S.; ARAÚJO, L. G.; SOUSA, K. C. I.; CARVALHO, J. C. B.; GONÇALVES, L. A.; CARNEIRO, L. L. Germinação assimbiótica e micorrização *in vitro* de *Epidendrum nocturnum* Jacq. ocorrente no Cerrado. Rodriguésia. No prelo.

SENA, A.; CHAIBUB, A. A.; CÔRTEZ, M. V.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; ARAÚJO, L. G. Increased enzymatic activity in rice

leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 387-397, 2013.

SCHEUERMANN, K. K. Manejo de doenças. In: BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. (Eds.). **Arroz do plantio à colheita**. UFV, 2015. p. 199-219.

SCHNEIDER, M. J.; UNGEMACH, F. S.; BROQUIST, H. P.; HARRIS, T. M. Biosynthesis of swainsonine in *Rhizoctonia leguminicola*. Epimerization at the ring fusion. **J. AM. Chem. Soc.**, v. 104, p. 6863-6864, 1982.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SOUZA, A. C. A.; SOUSA, T. P.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; RODRIGUES, F. A.; SILVA, G. B.; FILIPPI, M. C. C. Enzyme-Induced Defense Response in the Suppression of Rice Leaf Blast (*Magnaporthe Oryzae*) By Silicon Fertilization and Bioagents.

STRAUSS, M.; JOLLY, N.; LAMBRECHTS, M.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 1, p. 182-190, 2001.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 3, p. 236-240, 1992.

WANG, Y.; LIU, S.; MAO, X.; ZHANG, Z.; JIANG, H.; CHAI, R.; QIU, H.; WANG, J.; DU, X.; LI, B. Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1480-1490, 2013.

4 INTERAÇÃO ENTRE *Waitea circinata* E PATÓGENOS DO ARROZ: AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO, EXTRATOS BIOATIVOS E PRODUÇÃO DE ENZIMAS LÍTICAS

RESUMO

O arroz é um dos cereais mais importantes do mundo, porém sua produtividade é afetada por doenças fúngicas como a brusone, mancha parda, escaldadura, podridão da bainha, queima da bainha e mancha da bainha. Fungos micorrízicos como *Waitea circinata*, micorriza de *Epidendrum nocturnum*, são capazes de produzir metabólitos secundários que podem ser utilizados no controle de patógenos. Objetivou-se avaliar o potencial do isolado micorrízico e de seus extratos no antagonismo com os patógenos do arroz. O pareamento, a eficiência de compostos voláteis e não-voláteis, e a eficiência do micélio de *W. circinata* com os patógenos do arroz foram realizados em dois ensaios. A caracterização enzimática foi conduzida por duas metodologias: parede celular dos patógenos e co-cultivo. Quatro extratos de *W. circinata* (bruto, micelial, liofilizado e massa micelial) foram obtidos e utilizados nos ensaios *in vitro*. Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado. *W. circinata* inibiu o crescimento micelial de todos os patógenos do arroz, *in vitro*. O isolado micorrízico foi eficiente na produção *in vitro* de compostos voláteis e não-voláteis reduzindo o crescimento micelial de *Sarocladium oryzae* em 94% e 53%, respectivamente. O micélio do isolado micorrízico foi eficiente e ativo mesmo após autoclavado, pois reduziu em 93%, 77%, 7% e 4% a área da colônia de *Cochliobolus miyabeanus*, *Monographella albescens* e *Rhizoctonia oryzae* - Ro93 e Ro88, respectivamente. O isolado micorrízico cultivado em meio enriquecido com a parede celular e em co-cultivo com os patógenos apresentou atividade das enzimas (GLU, CHI e PROT) durante 24 a 168 horas após a coleta. Observou-se que para cada patógeno um determinado extrato e diluição se sobressaíram. A micorriza e seus extratos devem ser investigados em casa de vegetação na supressão das doenças do arroz.

Palavras-chave: Arroz; Biocontrole; Doenças do arroz; Extratos; Micorriza

ABSTRACT

Rice is one of the most important cereal in the world, but its productivity is affected by fungal diseases such as blast, brown spot, scald, sheath rot, sheath blight and sheath stain. Mycorrhizal fungi are capable of producing secondary metabolites that can be used to control. This study aimed to evaluate the potential of isolated mycorrhizal and their extracts in antagonism with the rice pathogens. *In vitro* pairing, volatile and non-volatile efficiency and effectiveness mycelium *Waitea circinata* with rice pathogens was conducted in two trials. The enzyme characterization was carried out by two methods: cell wall of pathogens and co-cultivation. Four extracts of *W. circinata* (crude, mycelial, lyophilized and of the mycelial mass) were obtained and used in vitro assays. All assays were conducted in a completely randomized design. *W. circinata*, mycorrhiza of *Epidendrum nocturnum* inhibited mycelial growth of all rice pathogens *in vitro*. The isolated mycorrhizal was efficient in vitro production of volatile and non- volatile reducing mycelial growth *Sarocladium oryzae* 94.41 % and 53 % , respectively. The mycelium isolated mycorrhizal was efficient and active even after autoclaving, as reduced by 93.53%, 77.30%, 31.07% and 4.42% area of the colony of *Cochliobolus miyabeanus*, *Monographella albescens* and *Rhizoctonia oryzae* - Ro93 and Ro88, respectively. The isolated mycorrhizal grown in rich medium with the cell wall and co-cultivation with the pathogens showed activity of enzymes (GLU, CHI and PROT) for 24 to 168 hours after collection. It was observed that for each pathogen extract and diluting a specific excelled. The results suggest that *W. circinata*, as well as their extracts have potential in the control of rice diseases.

Key-words: Rice; Biocontrol; Rice diseases; Extract; Mycorrhizal.

4.1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo e é a base alimentar para mais da metade da população mundial. Estima-se que a produção mundial em 2014/2015 foi de 494.9 milhões de toneladas, o consumo humano de 397 milhões de toneladas, e o prognóstico é que o consumo de arroz em 2015/2016 aumente para 402.3 milhões de toneladas (FAO, 2015).

A produtividade é afetada pela ocorrência de doenças, destacando-se as causadas por fungos, como a mancha parda: *Cochliobolus miyabeanus* (Ou, 1985); escaladura: *Monographella albescens* (Ou, 1985); podridão da bainha: *Sarocladium oryzae* (Ou, 1985; Lobo et al., 2011); queima da bainha: *Thanatephorus cucumeris*; mancha da bainha: *Rhizoctonia oryzae* Ryker & Gooch (*Waitea circinata* Warcup & Talbot; Prabhu et al., 2002; Zhao et al., 2008) e principalmente a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* (Prabhu et al., 2009; Fisher et al., 2012).

O controle das doenças do arroz é realizado pelo manejo que integra a resistência genética da cultivar, as práticas culturais e o controle químico (Lahlali & Hijri, 2010). Sabe-se que a intensificação dos cultivos proporciona um rápido desenvolvimento das doenças o que leva os agricultores a maximizar o controle químico como componente do controle integrado, e se compõe em um desafio para a adoção correta do manejo. Para fortalecer o manejo é necessária a inserção de outros métodos, considerando o aspecto sócio econômico e a conservação do ambiente. Desse modo, os agentes biológicos atuando como antagonistas e indutores de resistência, como estratégia para aumentar a durabilidade da resistência à doença e reduzir o uso de agrotóxicos torna-se essencial para o cultivo do arroz (Filippi et al., 2006).

Os fungos de controle biológico (BCFs) como *Epicoccum* sp. (Sena et al., 2013) e *Cladosporium cladosporioides* (Chaibub et al., 2016), obtidos do filoplano em sistema orgânico de produção do arroz demonstraram ser antagonista e indutor de resistência à *M. oryzae*. Carvalho et al. (2015) observaram que o isolado micorrízico,

Waitea circinata, proveniente de uma orquídea do Cerrado, foi eficiente em inibir, *in vitro*, o desenvolvimento do patógeno *M. oryzae* causador da brusone no arroz e o seu extrato bruto demonstrou antagonismo *in vitro* e *in vivo* para *M. oryzae*.

O presente trabalho teve como objetivos: 1) avaliar o potencial do isolado micorrízico e dos seus extratos no antagonismo *in vitro* contra os patógenos do arroz; 2) avaliar o efeito inibitório de metabólitos voláteis e não-voláteis pelo isolado micorrízico aos patógenos do arroz; 3) avaliar a produção enzimática do isolado micorrízico na presença dos isolados patogênicos ao arroz.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Pareamento entre *Waitea circinata* e os patógenos do arroz

Foram realizados dois ensaios. Ensaio 1 foi constituído de três isolados fitopatogênicos: 1 - *Cochliobolus miyabeanus* - (Ho); 2 - *Monographella albescens* - (Mono); 3 - *Sarocladium oryzae* - (Saro) e mais um isolado micorrízico *Waitea circinata* (En07 - BRM 32644), e ensaio 2 de três isolados rhizoctonioides: 1 - *Rhizoctonia solani* - (Rh24F1); 2 e 3 *Rhizoctonia oryzae* - (Ro88; Ro93), mais o isolado micorrízico. Todos os isolados encontram-se depositados na Coleção de microrganismos funcionais do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão. Os sete isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata - dextrose - ágar: 20 g de ágar, 20 g de dextrose, 1 L de água e 200 g de batata), incubadas em câmara de germinação a 27 °C por 11 dias, em presença de luz contínua, até que a colônia ocupasse toda a superfície da placa. Montou-se um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e oito repetições para cada ensaio. Os ensaios foram realizados separando-se os isolados de *Rhizoctonia* dos demais patógenos do arroz devido à diferença na velocidade de crescimento desses isolados.

No ensaio utilizou-se o método da cultura pareada (Romeiro, 2007), em que discos de 5 mm de BDA, contendo micélio de cada um dos patógenos e do isolado micorrízico foram transferidos para uma outra placa de Petri contendo BDA, e posicionados lado a lado, distanciados aproximadamente em 3 cm. Foram utilizadas oito placas de cada patógeno para crescimento na ausência do provável antagonista, como controle. As medições, realizadas com o auxílio de um paquímetro digital foram feitas em câmara de fluxo laminar, à 27 °C, em luz branca constante. Foram avaliados os diâmetros horizontal e vertical de cada tratamento, e também o halo de inibição, quando os controles atingiram a borda da placa. Ao final, calculou-se a área da colônia e a

porcentagem de redução da colônia. Todos esses ensaios foram repetidos três vezes e para a análise estatística foi feita a média.

4.2.2 Potencial efeito de metabólitos voláteis e não-voláteis de *Waitea circinata*

Foram realizados dois ensaios de produção de metabólitos voláteis e não-voláteis. O ensaio 1 foi constituído de três isolados fitopatogênicos: 1 - *Cochliobolus miyabeanus* - (Ho); 2 - *Monographella albescens* - (Mono); 3 - *Sarocladium oryzae* - (Saro) e mais um isolado micorrízico *Waitea circinata* (En07 - BRM 32644), e o ensaio 2 de três isolados rhizoctonioides: 1 - *Rhizoctonia solani*- (Rh24F1); 2 e 3 *Rhizoctonia oryzae* - (Ro88; Ro93), mais o isolado micorrízico.

Voláteis: Discos de 5 mm de BDA, contendo micélio dos isolados patogênicos e de *W. circinata* foram transferidos, individualmente, para as bases de placas de Petri contendo BDA. Em seguida, as bases, contendo os discos com micélio dos patógenos foram sobrepostas com as bases contendo os discos de *W. circinata*, evitando assim o contato entre os dois organismos. As duas bases, sobrepostas foram vedadas com uma camada dupla de parafilme e mantidas em câmara de germinação tipo BOD à 27 °C, fotoperíodo de 12 horas. O controle consistiu de apenas o disco dos patógenos em uma base, enquanto que na outra foi colocado apenas BDA (Qualhato et al., 2013).

Não-voláteis (Filtrado): Utilizou-se a metodologia de Isaias et al. (2014), em que segmentos do isolado micorrízico foram transferidos para frascos contendo meio de cultura líquido mínimo TLE (2 g de KH_2PO_4 ; 1.4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.3 g de MgSO_4 ; 0.15 g de CaCl_2 ; 0.005 g de FeSO_4 ; 0.016 de MnSO_4 ; 0.014 de ZnSO_4 ; Adaptado de Geraldine et al., 2013) e mantido em agitador orbital a 150 rpm e 25 °C, por 3 dias. Após esse período, o meio de cultura, contendo fragmentos do isolado de *W. circinata*, foi centrifugado, filtrado em membrana de celulose (0.45 μm) e incorporado ao BDA, na proporção de 25% (v/v). Discos de ágar, contendo micélio dos patógenos foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA suplementado com o filtrado do isolado micorrízico. Os controles consistiram da transferência de cada patógeno para placas de Petri contendo BDA sem suplementação.

Não-voláteis (celofane): Utilizou-se a metodologia modificada de Ethur et al. (2005). Dessa forma, um segmento de papel celofane (no formato da placa de Petri) foi autoclavado e sobreposto ao meio de cultura (BDA), em placas de Petri. Logo após, discos de 5 mm de BDA contendo micélio do isolado micorrízico foram colocados no centro da placa e sobre o papel celofane. As placas foram incubadas em câmara de germinação tipo BOD à 27 °C e fotoperíodo de 12 horas até a colônia ocupar toda a superfície da placa. Após 10 dias, o papel celofane, contendo o micélio da colônia do isolado micorrízico foi retirado e para a mesma placa foram transferidos discos de BDA contendo micélio de cada patógeno. O controle consistiu em placas de Petri contendo apenas discos dos patógenos sem a presença anterior do isolado micorrízico. As placas foram incubadas até que a colônia do tratamento controle ocupasse toda a superfície da placa.

Em ambos os ensaios (voláteis e não-voláteis) o delineamento foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições para cada ensaio. Os ensaios foram realizados separando-se os isolados de *Rhizoctonia* dos demais patógenos do arroz devido à diferença na velocidade de crescimento desses isolados. As medições foram feitas com o auxílio de um paquímetro digital, em câmara de fluxo laminar, à 27 °C, em luz branca constante. Avaliou-se o tamanho dos diâmetros horizontal e vertical de cada tratamento quando o controle alcançou a borda da placa. Ao final, calculou-se a área da colônia de cada tratamento. Todos esses ensaios foram repetidos três vezes e para a análise estatística foi feita a média.

4.2.3 Potencial efeito e termoestabilidade *in vitro* do micélio de *Waitea circinata* na inibição do crescimento micelial dos patógenos do arroz

O potencial efeito dos produtos de *W. circinata* foi realizada em seis ensaios para que pudesse ser testada para cada patógeno. Micélio do isolado micorrízico *W. circinata* foi removido com o auxílio de um bisturi sem danificar o meio de cultura e sem deixar fragmentos de micélio no meio, e pesado para a obtenção de três diferentes suspensões 2, 5 e 10 g/L de BDA. Em seguida, parte destas suspensões foram autoclavadas constituindo, assim os tratamentos (A2g; A5g; A10g). A outra parte não autoclavada constituiu os tratamentos (S2g; S5g; S10g). Ambos os meios de cultura (com e sem esterilização) foram distribuídos em placas de Petri.

Um disco de 5 mm de BDA contendo micélio dos isolados patogênicos foi transferido para o centro da placa de Petri. As placas foram mantidas em câmara de germinação tipo BOD à 27 °C e fotoperíodo de 12 horas. Montou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições para cada isolado patogênico. O controle consistiu dos patógenos cultivados, em meio de cultura BDA na ausência do micélio do isolado micorrízico, totalizando sete tratamentos para cada patógeno. As medições foram feitas com o auxílio de um paquímetro digital, em câmara de fluxo laminar, à 27 °C, em luz branca constante. Avaliou-se os diâmetros horizontal e vertical de cada tratamento quando o controle alcançou a borda da placa. Ao final, calculou-se a área da colônia. Todos esses ensaios foram repetidos três vezes e para a análise estatística foi feita a média.

4.2.4 Caracterização enzimática de *Waitea circinata*

A caracterização enzimática do isolado micorrízico foi conduzida por duas metodologias diferentes, sendo que em uma utilizou-se a parede celular dos patógenos e em outra a situação de co-cultivo. Dessa forma, foram preparados dois ensaios: A) 1 g de micélio raspado do isolado micorrízico foi colocado juntamente com 0.125 g da parede celular purificada dos patógenos em meio líquido TLE (adaptado de Almeida et al., 2007; Geraldine et al., 2013); B) 1 g de micélio raspado do isolado micorrízico foi colocado juntamente com 1 g de micélio dos isolados patogênicos. Os frascos foram colocados em aparelho rotativo a 140 rpm e 28 °C e as coletas foram feitas a cada 24 horas até 144 horas após a incubação. Montou-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições para cada enzima (todos os patógenos foram analisados juntos) e por hora de coleta quando utilizado a parede celular dos patógenos. Quando do uso do micélio dos isolados patogênicos fez-se um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e três repetições para cada patógeno e por hora.

4.2.4.1 Obtenção da parede celular dos patógenos

Discos de 5 mm de micélio dos patógenos (*Cochliobolus miyabeanus* - Ho, *Monographella albescens* - Mono, *Sarocladium oryzae* - Saro), foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 250 mL de meio de cultura líquido mínimo TLE. Estes foram incubados em aparelho rotativo a 140 rpm e 28 °C. Em seguida, o meio líquido

foi filtrado, a massa micelial recuperada e congelada, liofilizada e macerada com nitrogênio líquido para obtenção de um pó, que foi lavado com água destilada autoclavada por várias vezes até não apresentar proteína na amostra. A concentração de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Depois de lavado, o pó foi autoclavado, congelado e liofilizado para obtenção da parede celular de cada patógeno (Adaptado de Geraldine et al., 2013; Monteiro et al., 2014).

4.2.4.2 Obtenção da massa micelial dos patógenos

Discos de micélio dos patógenos (*Cochliobolus miyabeanus* - Ho, *Monographella albescens* - Mono, *Sarocladium oryzae* - Saro, *Rhizoctonia solani* - Rh24F1) foram colocados em frascos contendo meio líquido BD (batata - dextrose: 20 g de dextrose, 1 L de água e 200 g de batata). Estes foram incubados em aparelho rotativo a 140 rpm e 28 °C. Após esse período fez-se a filtração e o micélio foi pesado para a instalação do ensaio.

4.2.4.3 Quantificação enzimática

A atividade de β -1,3 glucanase (GLU) foi determinada de acordo com um método colorimétrico usando laminarina como substrato (Noronha & Ulhoa, 2000; Geraldine et al., 2013). Uma unidade de β -1,3 glucanase foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μ mol de açúcares redutores por min a 37 °C (Almeida et al., 2007).

A atividade de Quitinase (CHI) foi determinada de acordo com um método colorimétrico usando quitina como substrato (Ulhoa & Peberdy, 1992). Uma unidade de quitinase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de N-acetil glicosamina em 1 hora a 37 °C (Almeida et al., 2007).

A atividade de protease foi determinada usando azocaseína como substrato (Cabral et al., 2004). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para elevar uma unidade de absorbância por minuto (Geraldine et al., 2013).

4.2.5 Potencial efeito *in vitro* dos extratos de *Waitea circinata* na inibição do crescimento micelial dos patógenos do arroz

Avaliou-se a eficiência de quatro diferentes extratos, sendo três (extrato bruto - EB, extrato micelial - EM, extrato liofilizado - EL) obtidos de acordo com Carvalho et al. (2015), e o Extrato da massa micelial (EMM) obtido do isolado micorrízico a partir do crescimento em meio de cultura BDA, por 11 dias a 27 °C, na presença de luz. Após o seu crescimento foi feita a maceração com acetato de etila e posteriormente a evaporação do solvente em evaporador rotativo.

Para cada extrato foram utilizadas cinco suspensões (1.040, 700, 520, 120 e 12 µg/mL). Montou-se um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições para cada patógeno e extrato. O controle consistiu de apenas o disco dos patógenos sem a presença dos extratos. As medições foram feitas em câmara de fluxo laminar, à 27°C, em luz branca constante, com o auxílio de um paquímetro digital. Avaliou-se o diâmetro horizontal e vertical de cada tratamento quando o controle alcançou a borda da placa. Ao final, calculou-se a área da colônia. Todos esses ensaios foram repetidos três vezes e para a análise estatística foi feita a média.

4.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey à 5 % de probabilidade usando o software R versão 3.0.1.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Pareamento entre *Waitea circinata* e os patógenos do arroz

W. circinata reduziu a área da colônia dos patógenos *C. miyabeanus*, *M. albescens*, *S. oryzae*, *R. oryzae* (Ro93 e Ro88) e *R. solani* quando em cultivo pareado em 81%, 85%, 85%, 34%, 41% e 38%, respectivamente (Figura X). Houve a formação de halo de inibição nos tratamentos *M. albescens* e *R. oryzae* (Ro93 e Ro88) de 1.7 mm, 0.43 mm e 0.22 mm, respectivamente.

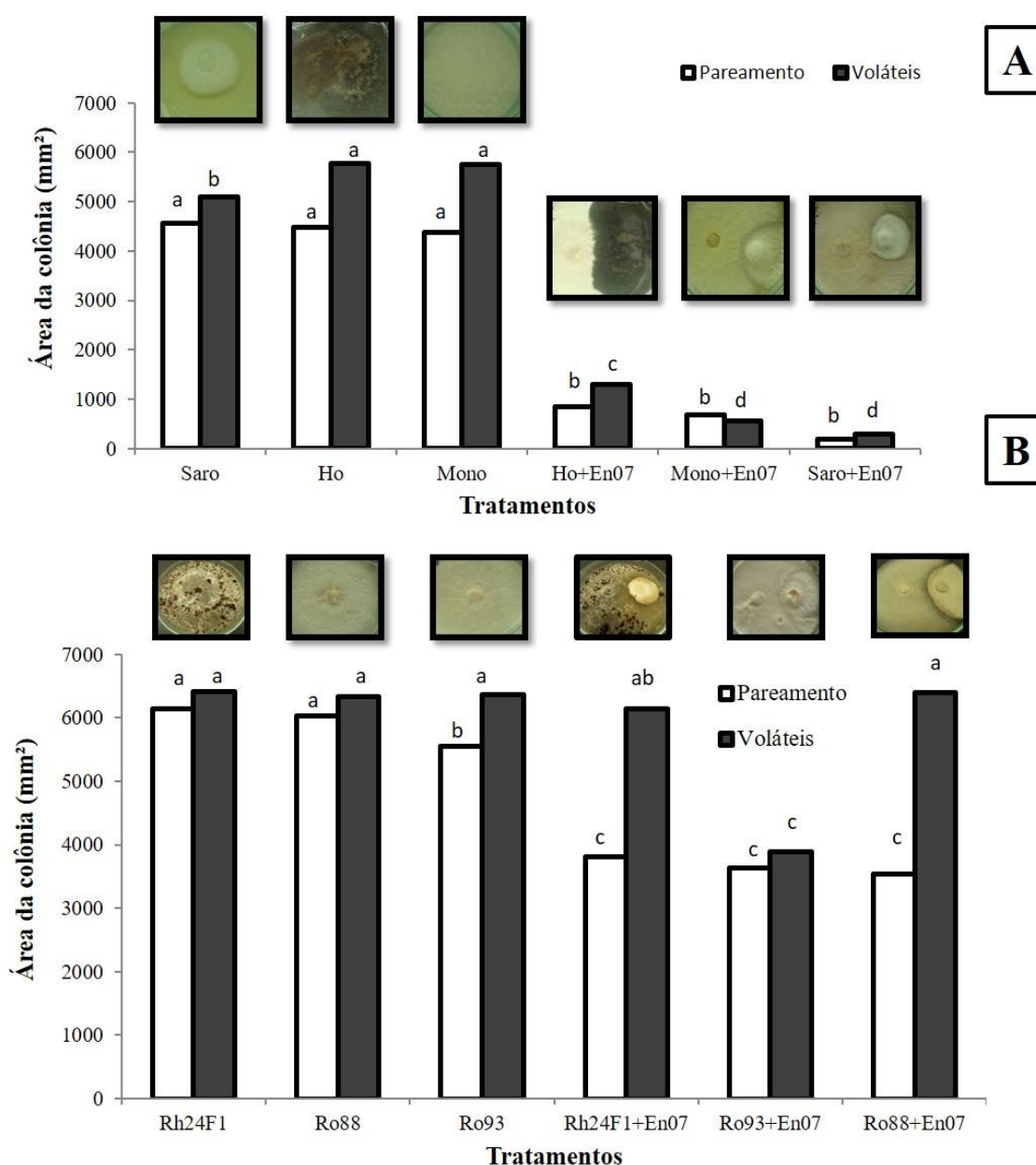


Figura 4.1 A) Área da colônia dos patógenos do arroz. B) Área da colônia dos patógenos rhizoctonioides do arroz. Barra Branca: Pareamento de *W. circinata* frente aos patógenos do arroz. Barra Preta: Efeito inibitório de metabólitos voláteis de *Waitea circinata*. En07: *Waitea circinata*; Mono: *Monographella albescens*; Saro: *Sarocladium oryzae*; Ho: *Cochliobolus miyabeanus*; Ro88/Ro93: *Rhizoctonia oryzae*; Rh24F1: *Rhizoctonia solani*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey ($p=0.05$).

4.3.2 Potencial efeito de metabólitos voláteis e não-voláteis de *Waitea circinata*

Voláteis: No ensaio 1 o tratamento *S. oryzae* apresentou a maior inibição quando comparado ao controle. Já no ensaio 2 o tratamento *R. oryzae* - Ro93 foi o único que teve a área da colônia reduzida pelos voláteis do isolado micorrízico quando comparado com o controle (Figura 4.1).

Quando avaliada a eficiência dos metabólitos não-voláteis observou-se que o método do filtrado foi eficiente quando comparado ao método do celofane, pois apresentou uma diminuição significativa da área da colônia para *S. oryzae* e *R. oryzae* - Ro88, enquanto que no método do celofane observou-se diminuição significativa da área da colônia apenas para *C. miyabeanus* (Figura 4.2).

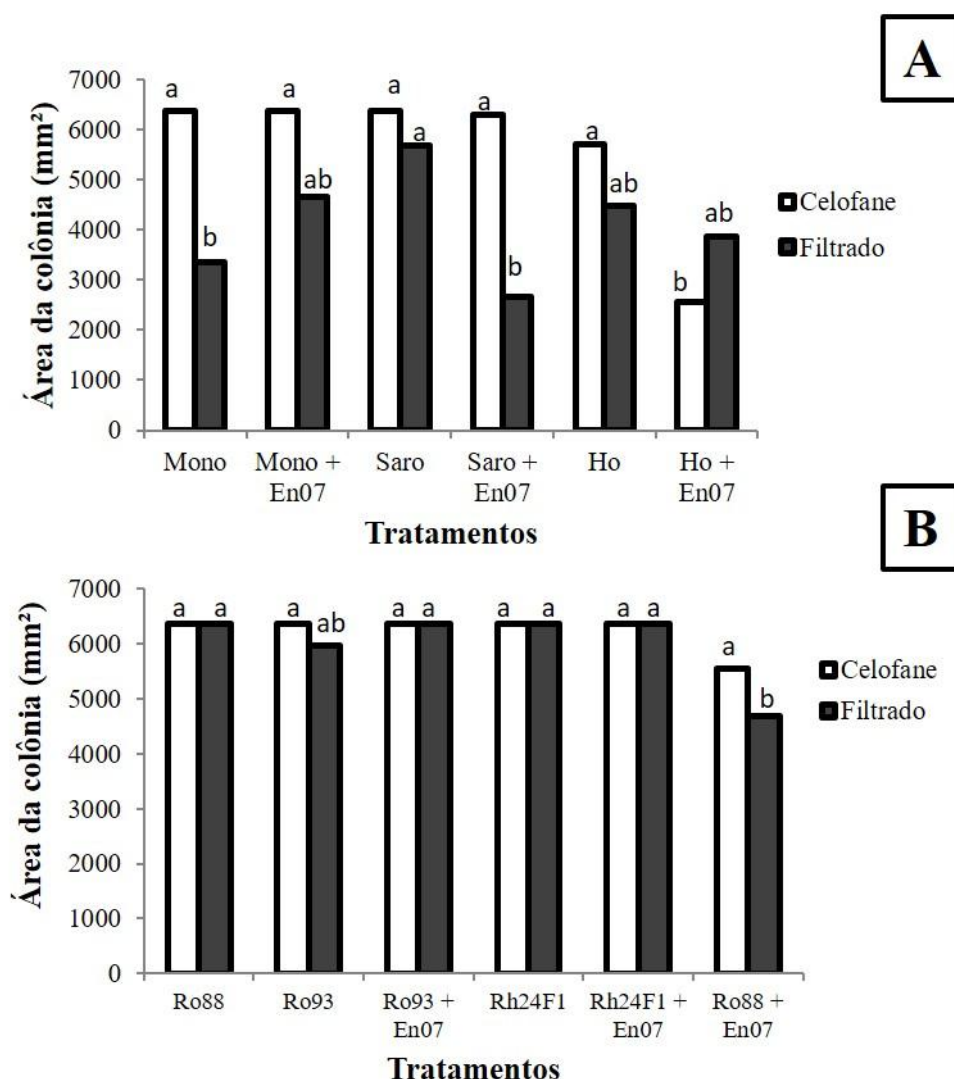


Figura 4.2 Efeito inibitório de metabólitos não-voláteis de *Waitea circinata*. A) Área da colônia dos patógenos do arroz. B) Área da colônia dos patógenos rhizoctonioides do arroz. Barra Branca: Método de Celofane. Barra Preta: Método do Filtrado. En07: *Waitea circinata*; Mono: *Monographella albescens*; Saro: *Sarocladium oryzae*; Ho: *Cochliobolus miyabeanus*; Ro88/Ro93: *Rhizoctonia oryzae*; 4F1: *Rhizoctonia solani*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey ($p=0.05$).

4.3.3 Potencial efeito e termoestabilidade *in vitro* do micélio de *Waitea circinata* na inibição do crescimento micelial dos patógenos do arroz

Para *C. miyabeanus* destacou-se os tratamentos A10g, S10g, A5g com redução de 93%, 42% e 27%, respectivamente. Para *M. albescens*, os tratamentos que se destacaram foram A10g, A5g, S5g, S10g com redução de 77%, 53%, 51% e 44%, respectivamente. Os tratamentos que se destacaram para *R. oryzae* - Ro93 foram S10g,

S5g e A10g com 89%, 84% e 7% de redução, respectivamente, enquanto que para *R. oryzae* - Ro88 entre os tratamentos destacou-se A10g com 4% de redução (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Área da colônia (mm²) dos patógenos do arroz, *in vitro*, pela massa mielial de *Waitea circinata* (En07)

Tratamentos	Patógenos					
	Ho	Mono	Saro	Ro93	Ro88	4F1
Controle	6358.5 a*	6358.5 a	4065.8 ab	6358.5 a	6358.5 a	6358.5 a
A2g	6358.5 a	6358.5 a	5491.2 a	6358.5 a	6358.5 a	6358.5 a
S2g	5321.3 ab	4904 ab	6358.5 a	6358.5 a	6358.5 a	6358.5 a
S5g	4820.4 abc	3099.3 cd	2375.3 b	1040 c	6323.3 a	6358.5 a
A5g	4607 bc	2952.7 cd	5111.4 ab	6358.5 a	6236.9 ab	6358.5 a
S10g	3684.4 cd	3531.7 bc	4592.9 ab	694.7 c	6271.2 ab	6358.5 a
A10g	411.2 d	1443.3 d	4692.2 ab	5893.3 b	6077.2 b	6358.5 a

En07: *Waitea circinata*; Mono: *Monographella albescens*; Saro: *Sarocladium oryzae*; Ho: *Cochliobolus miyabeanus*; Ro88/Ro93: *Rhizoctonia oryzae*; 4F1: *Rhizoctonia solani*. A2g, A5g, A10g – autoclavado; S2g, S5g, S10g – não autoclavado. *Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey (p=0.05).

4.3.4 Caracterização enzimática de *Waitea circinata*

4.3.4.1 Quantificação da atividade enzimática: parede celular dos patógenos

Observou-se ao utilizar a parede celular dos isolados patogênicos na presença de *W. circinata* que houve produção das enzimas avaliadas em todos os tratamentos, e em todas as coletas (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Atividade específica de glucanase, quitinase e protease (U mg⁻¹) de *Waitea circinata* em presença da parede celular dos patógenos do arroz

Tratamentos	Horas (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
<i>Glucanase</i>							
En07	8.244a	3.562a	2.648a	3.570b	1.079a	4.519b	3.134b
En07 + Saro	3.167ab	3.745a	4.355a	10.103a	4.543a	10.095a	12.590a

En07 + Ho	1.573ab	1.573a	3.343a	3.829b	1.443a	4.608b	3.709b
En07 + Mono	1.188b	1.188a	1.893a	4.516ab	3.294a	4.000b	5.403b
<i>Quitinase</i>							
En07 + Saro	4.554a	3.019a	3.383a	3.518a	4.109ab	4.777a	3.437a
En07 + Ho	4.119a	4.119a	2.880a	3.982a	6.033a	4.562ab	3.414a
En07 + Mono	3.987a	3.987a	3.262a	3.183 ^a	2.620b	3.704b	3.243a
En07	2.825a	2.825a	3.387a	3.590 ^a	4.409ab	4.143ab	2.829a
<i>Protease</i>							
En07	0.063a	0.057a	0.055a	0.061b	0.071a	0.054bc	0.067b
En07 + Saro	0.062a	0.06a	0.062a	0.085 ^a	0.08a	0.063ab	0.09a
En07 + Mono	0.061a	0.056a	0.053a	0.063b	0.072a	0.068a	0.071ab
En07 + Ho	0.059a	0.059a	0.06a	0.067ab	0.063a	0.05c	0.066b

En07: *Waitea circinata*; Mono: *Monographella albescens*; Saro: *Sarocladium oryzae*; Ho: *Cochliobolus miyabeanus*.

GLU: *W. circinata* cultivado em meio enriquecido com a parede celular do patógeno *S. oryzae* proporcionou a maior atividade de GLU, seguido do tratamento *C. miyabeanus*. Entre os tempos de coleta, o máximo da atividade foi observado em 168 horas e o mínimo em 24 e 48 horas (Tabela 4.2).

CHI: *W. circinata* cultivado em meio enriquecido com a parede celular do patógeno *C. miyabeanus* proporcionou a maior atividade de CHI, seguido do tratamento *S. oryzae*. Entre os tempos de coleta, o máximo da atividade foi observado em 120 horas e o mínimo em 120 horas (Tabela 4.2).

Protease: *W. circinata* cultivado em meio enriquecido com a parede celular do patógeno *S. oryzae* proporcionou a maior atividade de protease, seguido do tratamento *M. albescens*. Entre os tempos de coleta, o máximo da atividade foi observado em 168 horas e o mínimo em 144 horas (Tabela 4.2).

4.3.4.2 Quantificação da atividade enzimática: co-cultivo

Observou-se ao utilizar a massa micelial dos isolados patogênicos na presença de *W. circinata* que houve produção das enzimas avaliadas em todos os tratamentos e em todas as coletas (Tabelas 4.3; 4.4; 4.5).

GLU: *W. circinata* em co-cultivo com os patógenos *C. miyabeanus*, *M. albescens* e *R. solani* apresentou o máximo de atividade em 144 horas. Quando do co-cultivo com *S. oryzae* o máximo de atividade observada foi em 72 horas. O mínimo de atividade observada na presença dos patógenos *C. miyabeanus* e *R. solani* foi às 24 horas, enquanto que na presença de *M. albescens* e *S. oryzae* foi em 48 horas e 144 horas, respectivamente (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Atividade específica de glucanase (U mg⁻¹) de *Waitea circinata* em co-cultivo com os patógenos do arroz

Tratamentos	Horas (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
<i>Rhizoctonia solani</i>							
Rh ₂ 4F1	6.868a	12.904a	4.197a	8.408a	7.900a	8.051a	10.646a
En07 + Rh ₂ 4F1	4.604b	4.995a	4.871a	5.489a	10.163a	13.420a	10.375a
En07	4.236b	6.594a	5.362a	3.746a	9.386a	14.701a	15.379a
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>							
Ho	4.872a	12.700a	3.967b	6.057b	10.579a	15.298a	14.345a
Ho + En07	4.335a	6.456a	16.591a	13.647a	14.879a	18.325a	14.218a
En07	4.236a	6.594a	5.362b	3.746c	9.386a	14.701a	15.379a
<i>Monographella albescens</i>							
Mono	4.961a	5.284a	4.452a	3.760b	4.398b	4.013b	4.054b
Mono + En07	4.588a	4.422a	13.474a	14.814a	14.388a	16.875a	14.370a
En07	4.236a	6.594a	5.362a	3.746b	9.386ab	14.701a	15.379a
<i>Sarocladium oryzae</i>							
En07	4.236a	6.594a	5.362a	3.746a	9.386a	14.701a	15.379a
Saro	3.797a	7.217a	4.192b	3.450a	4.462a	3.372b	3.808b
Saro + En07	3.480a	4.143b	4.227b	3.236a	4.140a	3.059b	3.199b

En07 - *Waitea circinata*; Rh₂4F1 - *Rhizoctonia solani*; Ho - *Cochliobolus miyabeanus*; Mono - *Monographella albescens*; Saro - *Sarocladium oryzae*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5%.

CHI: *W. circinata* em co-cultivo com *C. miyabeanus* apresentou o máximo de atividade em 168 horas e o mínimo em 144 horas. Quando do co-cultivo com *M. albescens* a atividade máxima foi observada em 120 horas e o mínimo em 96 horas. Quando do co-cultivo com *S. oryzae* o máximo de atividade observada foi em 120 e 144

horas, enquanto que o mínimo foi em 24 horas. Já com *R. solani* o máximo foi em 24 horas e o mínimo de atividade em 144 horas (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Atividade específica de quitinase (U mg^{-1}) de *Waitea circinata* em co-cultivo com os patógenos do arroz

Tratamentos	Horas (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
<i>Rhizoctonia solani</i>							
Rh ₂ 4F1	5.840a	4.590a	3.659a	2.076a	3.102a	3.807a	2.370ab
En07	3.118a	2.702a	2.855a	3.540a	2.753a	2.343b	2.630a
En07 + Rh ₂ 4F1	2.933a	2.586a	2.882a	2.619a	2.639a	1.823b	2.085b
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>							
En07	3.118a	2.702a	2.855a	3.540a	2.753a	2.343a	2.630a
En07 + Ho	2.997a	3.970a	2.870a	2.591a	3.283a	2.189a	4.485a
Ho	2.558a	4.498a	3.339a	3.817a	3.801a	3.259a	2.456a
<i>Monographella albescens</i>							
En07	3.118a	2.702a	2.855a	3.540a	2.753a	2.343a	2.630a
Mono	2.860a	2.289a	3.366a	2.018a	2.844a	3.217a	2.972a
En07 + Mono	2.676a	2.254a	2.900a	1.942a	3.541a	2.953a	2.358a
<i>Sarocladium oryzae</i>							
Saro	3.770a	2.782a	3.830a	2.353a	2.635a	2.635a	3.213a
En07	3.118ab	2.702a	2.855a	2.353a	2.753a	2.753a	2.630a
En07 + Saro	1.840b	2.519a	2.488a	2.320a	2.755a	2.755a	2.475a

En07 - *Waitea circinata*; Rh₂4F1 - *Rhizoctonia solani*; Ho - *Cochliobolus miyabeanus*; Mono - *Monographella albescens*; Saro - *Sarocladium oryzae*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5%.

Protease: *W. circinata* em co-cultivo com *C. miyabeanus*, *M. albescens* e *S. oryzae* apresentou o máximo de atividade em 168, 120 e 144 horas, respectivamente e o mínimo em 24 horas. Quando do co-cultivo com *R. solani* o máximo foi em 144 horas e o mínimo de atividade em 96 horas (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 Atividade específica de protease (U mg⁻¹) de *Waitea circinata* em co-cultivo com os patógenos do arroz

Tratamentos	Horas (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
<i>Rhizoctonia solani</i>							
En07	0.079a	0.055a	0.056a	0.053b	0.056a	0.069a	0.061a
Rh ₂ 4F1 + En07	0.061a	0.069a	0.068a	0.055b	0.076a	0.086a	0.084a
Rh ₂ 4F1	0.054a	0.055a	0.061a	0.068a	0.067a	0.08a	0.007a
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>							
En07	0.079a	0.055ab	0.056ab	0.053b	0.063ab	0.069a	0.061a
Ho + En07	0.053a	0.059a	0.069a	0.073a	0.073a	0.077a	0.085a
Ho	0.05a	0.05b	0.053b	0.054b	0.056b	0.066a	0.082a
<i>Monographella albescens</i>							
En07	0.079a	0.055a	0.056a	0.053c	0.056b	0.069a	0.061b
Mono + En07	0.059a	0.071a	0.089a	0.078a	0.094a	0.081a	0.084a
Mono	0.05a	0.07a	0.059a	0.065b	0.067b	0.066a	0.066b
<i>Sarocladium oryzae</i>							
En07	0.079a	0.055a	0.056b	0.053b	0.056a	0.069a	0.061a
Saro + En07	0.063a	0.067a	0.07a	0.065a	0.065a	0.075a	0.073a
Saro	0.056a	0.058a	0.059ab	0.062ab	0.059a	0.062a	0.061a

En07 - *Waitea circinata*; Rh₂4F1 - *Rhizoctonia solani*; Ho - *Cochliobolus miyabeanus*; Mono - *Monographella albescens*; Saro - *Sarocladium oryzae*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5%.

4.3.5 Potencial efeito *in vitro* dos extratos de *Waitea circinata* na inibição do crescimento micelial dos patógenos do arroz

Observou-se inibição do crescimento micelial de *C. miyabeanus* na presença do EB quando da utilização da diluição 120 µg/mL, enquanto que na presença do EMM só observou-se inibição significativa da área da colônia na diluição 1040 µg/mL. Dessa forma, o EB na diluição 120 µg/mL foi o extrato mais expressivo na inibição desse patógeno (Figura 4.3A).

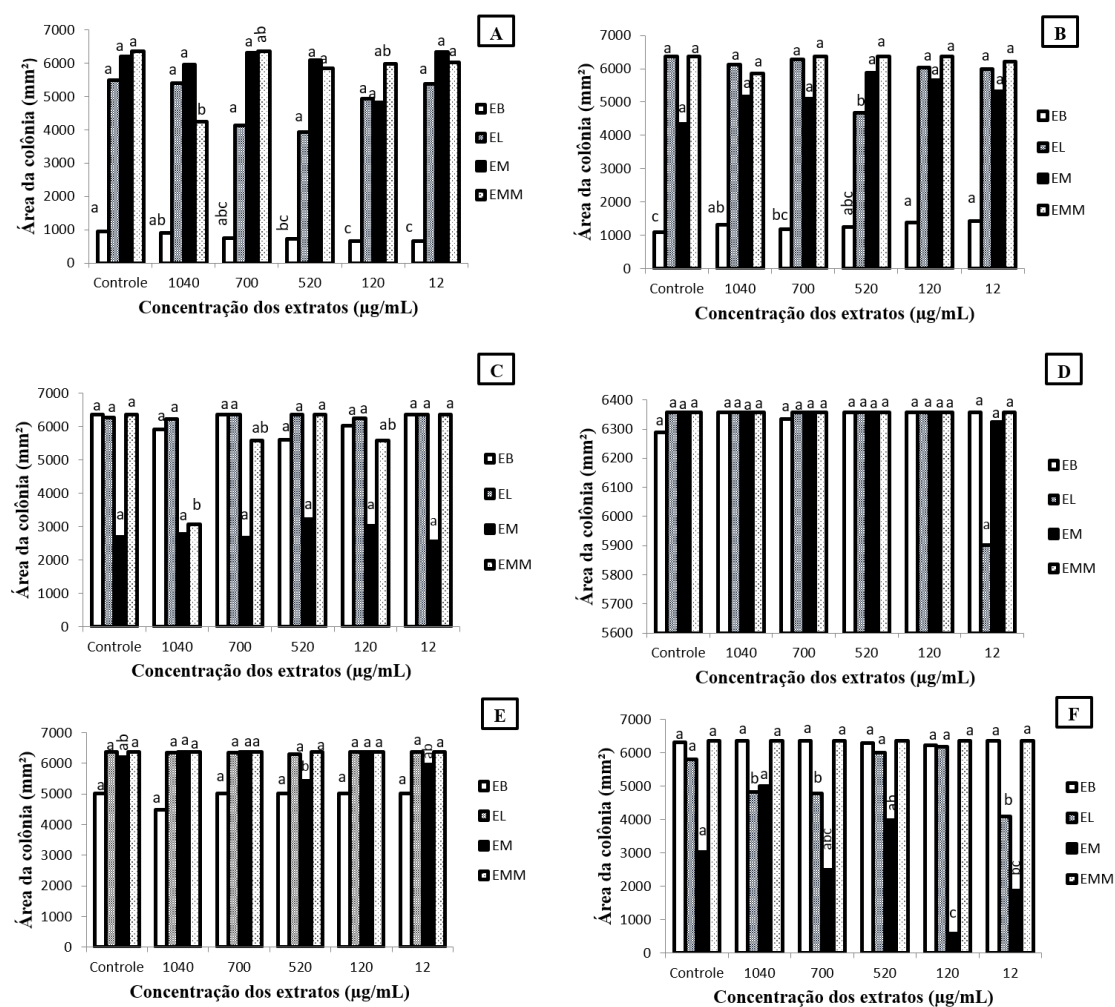


Figura 4.3 Área da colônia dos patógenos do arroz na presença dos extratos da micorriza. A) Área da colônia de *Cochliobolus miyabeanus*; B) Área da colônia de *Monographella albescens*; C) Área da colônia de *Sarocladium oryzae*; D) Área da colônia de *Rhizoctonia solani - Rh24F1*; E) Área da colônia de *Rhizoctonia oryzae - Ro88*; F) Área da colônia de *Rhizoctonia oryzae - Ro93*. EB - Extrato bruto; EL - Extrato liofilizado; EM - Extrato micelial; EMM - Extrato da massa micelial. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey ($p=0.05$).

Observou-se inibição do crescimento micelial de *M. albescens* apenas quando cultivado na presença do EL na suspensão 520 µg/mL, quando comparado ao seu controle (Figura 4.3B). Para *S. oryzae* foi o EMM na suspensão 1040 µg/mL que inibiu estatisticamente a área da colônia quando comparado ao seu controle (Figura 4.3C).

A inibição de *R. oryzae - Ro93* foi observada quando cultivado na presença do EL na diluição 12 µg/mL, enquanto que na utilização do EM observou-se inibição significativa da área da colônia na diluição 120 µg/mL quando comparado com o controle (Figura 4.3F)

4.4 DISCUSSÃO

No trabalho realizado por Carvalho et al. (2015), a micorriza *W. circinata* não se mostrou patogênica ao arroz presumindo-se que o seu uso no controle das doenças do arroz é seguro. Além disso, como o extrato bruto produzido por esse isolado micorrízico se revelou eficiente no controle da brusone do arroz suscitou-se a ideia de avaliar a micorriza, assim como, os seus extratos para os demais patógenos do arroz.

Em trabalho publicado anteriormente por Carvalho et al. (2015), a micorriza *W. circinata* não se mostrou patogênica ao arroz presumindo-se que o seu uso no controle das doenças do arroz é seguro. Além disso, como o extrato bruto produzido por esse isolado micorrízico se revelou eficiente no controle da brusone do arroz suscitou-se a ideia de avaliar a micorriza, assim como, os seus extratos para os demais patógenos do arroz.

O presente trabalho tem como novidade testar a eficiência de um único produto bioativo, *in vitro*, no crescimento dos patógenos do arroz e assim, suscitar a ideia deste bioativo ser utilizado no controle das doenças do arroz, *in vivo*. Isso torna-se importante, pois até o dado momento não existe no mercado um único produto que possa ser utilizado no controle de todas as doenças fúngicas do arroz podendo ser uma alternativa para o controle da brusone, mancha parda, escaldadura, podridão da bainha, queima da bainha e mancha da bainha. O isolado micorrízico se mostrou antagônico aos patógenos do arroz (Figura 4.1) e produtor de metabólitos voláteis (Figura 4.1) e não-voláteis (Figura 4.2). Além disso, os extratos do isolado micorrízico se mostraram promissores na inibição da área da colônia de alguns patógenos do arroz (Figura 4.3).

O isolado micorrízico inibiu o crescimento micelial de todos os patógenos testados, no entanto, observou-se que *R. solani* se sobrepôs ao isolado micorrízico durante esse ensaio, mostrando que o crescimento desse patógeno é mais rápido que o

crescimento do agente de controle (Figura 4.1). Para *C. miyabeanus*, *M. albescens* e *S. oryzae*, o isolado micorrízico reduziu a área da colônia em 81%, 85% e 85%, respectivamente. Enquanto que para os isolados rhizoctonioides: *R. oryzae* - Ro93, *R. oryzae* - Ro88 e *R. solani*, a redução da área da colônia foi de 34%, 41% e 38%, respectivamente, e menor quando comparado aos outros patógenos (Figura 4.1).

M. albescens (1.7 mm), *R. oryzae* - Ro93 (0.43 mm) e *R. oryzae* - Ro88 (0.22 mm) formaram halo de inibição e provavelmente a área da colônia desses isolados patogênicos foi inibida pelos compostos voláteis produzidos pelo isolado micorrízico. Os voláteis produzidos pela micorriza reduziram a área da colônia de *C. miyabeanus* (77%), *M. albescens* (90%), *S. oryzae* (94%) e *R. oryzae* - Ro93 (38%, Figura 4.1), assim como foi observado por Qualhato et al. (2013) ao avaliarem os metabólitos voláteis de *Trichoderma asperellum* na inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* (66%). Logo, faz-se necessário o estudo químico dos compostos voláteis produzidos pelos agentes de biocontrole com o intuito de se identificar esses compostos, além da sua possível utilização no controle das doenças.

Observou-se no ensaio de não-voláteis, pela metodologia de celofane, que o isolado micorrízico foi capaz de produzir esses metabólitos o que pode ser confirmado pela coloração escura e amarelada existente no meio de cultura. Para *C. miyabeanus* os metabólitos não-voláteis de *W. circinata* reduziram em 55% a área da colônia (Figura 4.2). A presença dessa coloração escura no meio de cultura também foi constatada por Ethur et al. (2001) ao avaliarem a produção de metabólitos não-voláteis por 12 isolados de *Trichoderma* spp. Ao utilizarem a técnica do papel celofane, Ethur et al. (2005) selecionaram oito isolados de *Trichoderma virens* que promoveram inibição do crescimento micelial de 94 a 100% do patógeno de *Sclerotinia sclerotiorum*. Seguindo a mesma metodologia, Martini et al. (2014) observaram que os metabólitos não-voláteis de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial de *Fusarium* spp. (94%) e *Bipolaris oryzae* (78%) significativamente.

No presente estudo, quando avaliado a produção de metabólitos não-voláteis pela metodologia de filtrado pode-se verificar que para *S. oryzae* e *R. oryzae* - Ro88 houve inibição da área da colônia em 53% e 26%, respectivamente (Figura 4.2). Semelhantemente a este trabalho, Wang et al. (2013) verificaram que o filtrado de MF-91 (*Chaetomium aureum*) inibiu o crescimento micelial de *R. solani* sob diferentes

condições *in vitro*. Além disso, os autores também verificaram que a eficiência inibitória foi influenciada pela temperatura, luminosidade, tempo, pH inicial e tempo de incubação. Em estudo semelhante, Isaías et al. (2014) perceberam que o patógeno *Verticillium dahliae* foi suscetível a ação dos metabólitos não-voláteis (filtrado) produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. com inibição maior que 70%.

O micélio do isolado micorrízico mostrou-se eficiente na inibição do crescimento micelial de alguns patógenos. *C. miyabeanus* na presença das diluições do micélio, nas proporções A5, S10 e A10 g/L teve seu crescimento reduzido em 27.54%, 42% e 93.53%, respectivamente. Para *M. albescens*, o micélio do isolado micorrízico nas proporções S5, A5, S10 e A10 g/L reduziu a área da colônia em 51.25%, 53.56%, 44.45% e 77.30%, respectivamente. Para *R. oryzae* - Ro93 observou-se que 3 proporções do micélio do isolado micorrízico, S5, S10 e A10 g/L, reduziram a área da colônia em 83.64%, 89% e 7.31%, respectivamente. Enquanto que para *R. oryzae* - Ro88 apenas a proporção A10 g/L do micélio do isolado micorrízico reduziu a área da colônia em 4.42%. O micélio se manteve ativo mesmo após autoclavado, pois reduziu a área da colônia de *C. miyabeanus*, *M. albescens*, *R. oryzae* - Ro93 e *R. oryzae* - Ro88 indicando o potencial desse isolado micorrízico. Notou-se que as maiores diferenças estatísticas quanto à diminuição da área da colônia em relação ao controle ocorreram quando o micélio do fungo micorrízico foi utilizado na proporção de 10 g/L nas duas condições avaliadas (Tabela 4.1). Observou-se que tanto o isolado micorrízico durante o ensaio de pareamento, assim como o micélio do isolado micorrízico no ensaio de eficiência e termoestabilidade foi eficiente em reduzir a área da colônia de *C. miyabeanus*, *M. albescens*, *R. oryzae* - Ro93 e *R. oryzae* - Ro88 (Figura 4.1; Tabela 4.1).

Sabe-se que o micoparasitismo envolve a produção de enzimas como quitinases, glucanases e proteases que durante sua síntese podem agir em sinergia e estão presentes na parede celular dos patógenos (Almeida et al., 2007; Viterbo et al., 2002). Quando da interação entre *W. circinata* e *R. solani* não houve formação do halo de inibição e observou-se que o isolado patogênico com o tempo cresceu sobre o isolado micorrízico (Figura 4.1). Observou-se ainda que durante o co-cultivo entre *W. circinata* e *R. solani* houve um máximo de atividade de CHI em 24 horas, e de glucanase e protease em 144 horas (Tabela 4.2). Assim, acredita-se que a interação entre *W. circinata* e *R. solani* seja micoparasítica, evidenciado pelo aumento rápido da

atividade destas enzimas. O entendimento dessa interação poderá ser esclarecido por sequenciamento de nova geração (RNA-seq) durante o pareamento entre os isolados.

W. circinata cultivado em meio enriquecido com a parede celular do patógeno *S. oryzae* proporcionou a maior atividade de GLU (12.590 U mg^{-1}), seguido do tratamento *C. miyabeanus* (4.608 U mg^{-1} ; Tabela 4.2) às 168 e 144 horas, respectivamente. No entanto, no co-cultivo com os patógenos *C. miyabeanus*, *M. albescens* e *R. solani* o máximo de atividade constatada foi em 144 horas com 18.325 U mg^{-1} , 16.875 U mg^{-1} , 13.420 U mg^{-1} de atividade, respectivamente. Quando do co-cultivo com *S. oryzae* o máximo de atividade observada foi em 72 horas (4.227 U mg^{-1} ; Tabela 4.3). Em estudo semelhante, Geraldine et al. (2013) observaram que vários isolados de *Trichoderma* são eficientes na produção enzimática de glucanase quando em cultivo com a parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* sugerindo que a enzima é componente essencial do antagonista.

Quando avaliada a produção de CHI observou-se que a maior atividade do cultivo de *W. circinata* em meio enriquecido com a parede celular foi com o patógeno *C. miyabeanus* (6.033 U mg^{-1}) às 120 horas seguido do tratamento *S. oryzae* (4.777 U mg^{-1}) às 144 horas (Tabela 4.2). Quando do co-cultivo com os patógenos *M. albescens* e *S. oryzae* observou-se um máximo de atividade em 120 horas com 3.541 U mg^{-1} e 2.755 U mg^{-1} , respectivamente. Quando em co-cultivo com *C. miyabeanus* o máximo de atividade observada foi em 168 horas (4.485 U mg^{-1} ; Tabela 4.3).

W. circinata cultivado em meio enriquecido com a parede celular do patógeno *S. oryzae* proporcionou a maior atividade de protease de 0.09 U mg^{-1} , seguido do tratamento *M. albescens* (0.072 U mg^{-1} ; Tabela 4.2). Quando do co-cultivo com *C. miyabeanus*, *M. albescens* e *S. oryzae* observou-se um máximo de atividade em 168, 120 e 168 horas, respectivamente (Tabela 4.3). Segundo Lopes et al. (2012), na presença da parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* todos os isolados de *Trichoderma* avaliados secretaram as enzimas glucanase, quitinase e protease. A alta produção das enzimas degradadoras da parede celular por fungos de controle biológico não garante o biocontrole, ou seja, muitos fatores devem ser considerados, como antibiose, produção de metabólitos secundários, promoção de crescimento e mecanismos de defesa da planta (Benítez et al., 2004).

Para cada patógeno observou-se que um extrato se sobressaiu. Para *C. miyabeanus* foi o EB na diluição 120 µg/mL com 29% de redução. Para *M. albescens*, o EL na diluição 520 µg/mL reduziu 26% a colônia, enquanto que para *S. oryzae* foi o EMM na diluição 1040 µg/mL que proporcionou redução de 51%. O EL na diluição 12 µg/mL foi o que mais se sobressaiu para *R. oryzae* - Ro93 com redução de 29% (Figura 4.3). Verificou-se ainda que a massa micelial do isolado micorrízico e os seus extratos reduziram a área da colônia de *C. miyabeanus*, *M. albescens* e *R. oryzae* - Ro93 (Figura 4.3 e Tabela 4.1) evidenciando que o extrato obtido tem a mesma eficiência que o agente na forma micelial e que ambos poderão ser utilizados no controle desses patógenos.

Observou-se que não houve uma ordem sequencial das diluições dos extratos na inibição dos patógenos, portanto, acredita-se que a inibição ocorra devido ao sinergismo entre os compostos presentes em cada extrato ou devido à reação dos patógenos na presença desses extratos. São muitas as variáveis como, composição do meio de cultura, temperatura e luminosidade que podem interferir na composição dos extratos e sua eficiência. Também pode explicar o fato de que cada extrato se sobressaiu para um determinado patógeno, ou seja, reafirma a hipótese de que cada patógeno elícita o agente micorrízico de forma específica.

Entre os extratos o EMM é de fácil obtenção e de custo menor, pois para sua produção gasta-se menos solvente e a quantidade do extrato obtido é maior, em relação a outros métodos já descritos na literatura. Assim, os resultados obtidos no presente estudo podem facilitar a futura formulação de bioprodutos, com custo mais acessível para a aplicação em campo pelo produtor rural. Também faz-se necessário análises qualitativas e quantitativas dos compostos produzidos pelo isolado micorrízico, pois contribuirão para o entendimento das vias de defesa envolvidas na interação *W. circinata* - patógenos.

Assim como os antagonistas utilizam-se de vários mecanismos para tornar as interações com os agentes patogênicos mais complexa, eficiente e específica, estes também utilizam diversas respostas para neutralizar seu antagonista. Assim, cada patógeno possui uma composição de parede diferente, no entanto, *W. circinata* responde a todas elas. Além disso, vários estudos mostraram variação na sensibilidade/suscetibilidade dos fungos fitopatogênicos a metabólitos produzidos por

antagonistas (Duffy et al., 2003). Como exemplo, Isaias et al. (2014) avaliaram a suscetibilidade de *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae* aos metabólitos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis produzidos por *Trichoderma* spp., e verificaram que a inibição micelial desses patógenos dependia do metabólito avaliado. Os mecanismos de defesa utilizados pelos agentes de biocontrole são complexos e depende do agente e patógeno (Howell, 2003), e possivelmente dos compostos produzidos por esses agentes e das metodologias empregadas para a detecção da influência desses compostos no controle dos fitopatógenos.

O controle biológico de *C. miyabeanus*, *M. albescens*, *S. oryzae* e *R. oryzae* (Ro93 e Ro88) por *W. circinata* foi evidenciado pelo mecanismo de antibiose (Figura 4.1), produção de voláteis (Figura 4.1) e não-voláteis (Figura 4.2) e produção de enzimas líticas (Tabelas 4.2; 4.3). Assim, faz-se necessários estudos *in vivo* para saber se a interação entre eles é realmente antagônica e/ou por indução de resistência. Além disso, o estudo das moléculas presentes nos extratos obtidos de *W. circinata* também é de suma importância para o entendimento dessa interação. Uma das formas de desvendar essa interação é através do sequenciamento de nova geração (RNA-seq), ou seja, a avaliação de genes diferencialmente expressos na interação *W. circinata* X patógenos permitirá o esclarecimento dos mecanismos de biocontrole.

4.5 CONCLUSÕES

O isolado micorrízico inibiu o crescimento de todos os patógenos avaliados;

O isolado micorrízico foi capaz de produzir metabólitos voláteis e não-voláteis reduzindo o crescimento micelial de *Sarocladium oryzae* em 94% e 53%, respectivamente;

O micélio do isolado micorrízico reduziu em 93%, 77%, 7% e 4% a área da colônia de *Cochliobolus miyabeanus*, *Monographella albescens*, e *Rhizoctonia oryzae* - Ro93 e Ro88, respectivamente;

O isolado micorrízico produziu glucanase, quitinase e protease na presença da parede celular e do co-cultivo com os patógenos do arroz em todas as horas coletadas;

Para cada patógeno um extrato se sobressaiu.

4.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. B. D. R.; CERQUEIRA, F. M.; DO NASCIMENTO SILVA, R.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 8, p. 1189-1193, 2007.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 680-685, 1976.

CABRAL, C.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMOES, N. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3831-3838, 2004.

CARVALHO, J. C. B.; SOUSA, K. C. I.; BRITO, D. C.; CHAIBUB, A. A.; LUZINI, A. P.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; FILIPPI, M. C. C. F.; KATO, L.; VAZ, B. G.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; ARAÚJO, L. G. Biocontrol potential of *Waitea circinata*, an orchid mycorrhizal fungus, against the rice blast fungus. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 151-159, 2015.

CHAIBUB, A.A.; CARVALHO, J.C.B.; SILVA, C.S.; COLLEVATTI, R.G.; GONÇALVES, F.J.; CÔRTEZ, M.V.C.B.; FILIPPI, M.C.C.; FARIA, F.P.; LOPES,

D.C.B.; ARAÚJO, L.G. Defence responses in rice plants in prior and simultaneous applications of *Cladosporium* sp. during leaf blast suppression. Environmental Science and pollution research. No prelo.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual review of phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 501-538, 2003.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. D.; STEFANELO, D. R.; ROCHA, E. D. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. Selection of *Trichoderma* spp. seeking the control of *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

FAO. **Situación alimentaria mundial**. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 18/Maio/2016.

FILIPPI, M.; PRABHU, A.; DA SILVA, G. **Escaldadura do arroz e seu controle**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. Circular Técnica 72.

FILIPPI, M. C.; CORTES, C.; BECKERMAN, J.; SWEIGARD, J.; VALENT, B.; GONZALEZ, C.; EBBOLE, D. **Novos aspectos da patogenicidade de *Magnaporthe grisea***. 1 ed. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, 36 p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186-194, 2012.

GERALDINE, A. M.; LOPES, F. A. C.; CARVALHO, D. D. C.; BARBOSA, E. T.; RODRIGUES, A. R.; BRANDÃO, R. S.; ULHOA, C. J.; JUNIOR, M. L. Cell wall-

degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 308-316, 2013.

HOWELL, C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

LAHLALI, R.; HIJRI, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS microbiology letters**, v. 311, n. 2, p. 152-159, 2010.

LOBO, V. D. S.; LINS, L.; FILIPPI, M.; CORTÊS, M. D. C.; PRABHU, A. **Infecção de grãos de arroz irrigado por *Sarocladium oryzae* no Estado do Tocantins e grau de resistência de genótipos à podridão da bainha em casa de vegetação**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. Comunicado Técnico.

LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; GERALDINE, A. M.; BRANDÃO, R. S.; MONTEIRO, V. N.; JÚNIOR, M. L.; COELHO, A. S. G.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal biology**, v. 116, n. 7, p. 815-824, 2012.

MARTINI, L. B.; ETHUR, L. Z.; DA ROSA DORNELES, K. Influence of secondary metabolites of *Trichoderma* spp. development of fungi transmitted by seeds and germination of rice. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 86-91, 2014.

MONTEIRO, V. N.; STEINDORFF, A. S.; DOS REIS ALMEIDA, F. B.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J.; FÉLIX, C. R.; SILVA, R. N. *Trichoderma reesei* Mycoparasitism

against *Pythium ultimum* is coordinated by G-alpha Protein GNA1 Signaling. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, 2014.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. Characterization of a 29-kDa β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS microbiology letters**, v. 183, n. 1, p. 119-123, 2000.

NUNES, C. D.; RIBEIRO, A. S.; TERRES, A. L. **Principais doenças do arroz irrigado e seu controle**. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. de (Ed.). Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004, p.579-633.

OU, S. H. **Rice diseases**. 2º ed. England: Commonwealth Mycological Institute, 1985, 380 p.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; SILVA, G. B. D.; SANTOS, G. R. D. Resistance of rice cultivars to *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia oryzae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 589-595, 2002.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; MORAIS, O. P. An Unprecedented Outbreak of Rice Blast on a Newly Released Cultivar BRS Colosso in Brazil. In: WANG, G. L. V., B. (Ed.). **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast**. Netherlands: Springer Science, 2009. p. 257-267.

QUALHATO, T. F.; LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; BRANDÃO, R. S.; JESUINO, R. S. A.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 9, p. 1461-1468, 2013.

ROMEIRO, R. S. Prospecção da potencialidade antagonística de possíveis agentes de biocontrole. In: ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa: UFV, 2007. p. 95-122. 10 cap.

SENA, A.; CHAIBUB, A. A.; CÔRTEZ, M. V.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; ARAÚJO, L. G. Increased enzymatic activity in rice

leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 387-397, 2013.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 21-43, 2010.

SILVA, J. C.; TORRES, D. B.; LUSTOSA, D. C.; DE FILIPPI, M. C. C.; DA SILVA, G. B. Rice sheath blight biocontrol and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 55, n. 4, p. 243-250, 2012.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 3, p. 236-240, 1992.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 549-556, 2002.

WANG, Y.; LIU, S.; MAO, X.; ZHANG, Z.; JIANG, H.; CHAI, R.; QIU, H.; WANG, J.; DU, X.; LI, B. Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1480-1490, 2013.

ZHANG, H.; LI, M. Transcriptional profiling of ESTs from the biocontrol fungus *Chaetomium cupreum*. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

ZHAO, C.-J.; WANG, A.-R.; SHI, Y.-J.; WANG, L.-Q.; LIU, W.-D.; WANG, Z.-H.; LU, G.-D. Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, n. 4, p. 501-516, 2008.