

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Sarocladium oryzae* E SEU
POTENCIAL NA SUPRESSÃO DA BRUSONE FOLIAR EM ARROZ**

RAFAELA ARAÚJO GUIMARÃES

Orientadora:

Dra. Valécia Lemes da Silva Lobo

Agosto - 2014

RAFAELA ARAÚJO GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Sarocladium oryzae* E SEU
POTENCIAL NA SUPRESSÃO DA BRUSONE FOLIAR EM ARROZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Fitossanidade

Orientadora:

Dra. Valácia Lemes da Silva Lobo

Co-orientadora:

Ph.D Marta Cristina Corsi de Filippi

Goiânia, GO – Brasil

2014

RAFAELA ARAÚJO GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO DE *Sarocladium oryzae* E SEU POTENCIAL NA
SUPRESSÃO DA BRUSONE FOLIAR**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em _____ de _____ de _____,
pela Banca Examinadora constituída pelos membros:

PhD. Anne Sitarama Prabhu

Membro - Embrapa Arroz e Feijão

Dra. Adriana Teramoto

Membro - UFG

PhD. Marta Cristina Corsi de Filippi

Membro - Embrapa Arroz e Feijão

Dra. Valácia Lemes da Silva Lobo

Orientadora - Embrapa Arroz e Feijão

Goiânia, Goiás
Brasil

A todo ser que habita, com amor, a Terra,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À vida por sua beleza, grandeza e perfeição e a todos os seres superiores que emanaram energias e forças ao meu ser durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia por me acolher e pela oportunidade de crescer junto a esta universidade.

À Embrapa Arroz e Feijão e ao Laboratório de Fitopatologia pela oportunidade de realização deste trabalho.

À minha orientadora, Valácia Lemes da Silva Lobo por me aceitar, ensinar e por sua incondicional dedicação neste trabalho.

À minha coorientadora, Marta Cristina Corsi de Filippi por sua educação, incentivo e prontidão em todos os momentos.

Ao Márcio Vinícius Carvalho Barros Côrtes por compartilhar sua inteligência, instigar o conhecimento e propor alternativas.

Ao Dr. Anne Sitarama Prabhu pela oportunidade do convívio e por todos os ensinamentos.

A toda equipe da Embrapa Arroz e Feijão: Elder, Maria Mônica, Ronair, Livia, Anaíres, Pedro Maurício, Alécio, Wanderlino, Celso e Luís Lopes.

A todos os colegas, amigos e parceiros do Laboratório de Fitopatologia: Alan, Bárbara, Amanda, Bruna, Lorena, Marcelo, Carmén, Gabriela, Larissa, Fernanda Yoshida, Fernanda Rosa, Jordene, Priscila, Letícia, Lara, Fábio, Eugênio, Carlos Filho, Leilane, Tatiane, Débora, Marcela, Robson, Jaqueline, Maythsulene, Lidiane, Carlos, Stella e Alaércio.

Aos meus amigos que se foram cedo demais: Meire, Thaynara e Maria; e a todos que continuam dividindo seus dias comigo.

À banca examinadora por sua prontificação e contribuição na melhoria deste trabalho: Anne Sitarama Prabhu, Adriana Teramoto, Leila Garcês Araújo e Gesimária Ribeiro Costa Coelho.

À minha família: Mãe e Pai por todo incentivo. Aos meus irmãos Renato, Roberta e Carla. Aos meus avós, tios e primos.

Ao CNPq e a FAPEG pela concessão da bolsa de mestrado e o auxílio financeiro deste projeto.

“Admiro a terra, quero-a, sempre gostei dela. Sempre me senti feliz por estar vivo: apesar da guerra, das más notícias, não sou capaz de matar em mim a simples alegria de viver.”

Julien Green

SUMÁRIO

LISTADE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE SIGLAS.....	14
RESUMO GERAL.....	16
GENERAL ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 CULTURA DO ARROZ.....	21
2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS FÚNGICAS DA CULTURA DO ARROZ.....	22
2.2.1 Escaldadura (<i>Monographella albescens</i>).....	22
2.2.2 Queima-das-bainhas (<i>Thanatephorus cucumeris</i>).....	23
2.2.3 Mancha parda (<i>Cochliobolus miyabeanus</i>).....	23
2.2.4 Brusone (<i>Magnaporthe oryzae</i>).....	24
2.3 MANEJO INTEGRADO DA BRUSONE.....	26
2.4 BIOCONTROLE.....	27
2.5 MECANISMOS DE BIOCONTROLE.....	28
2.6 <i>Sarocladium oryzae</i>	31
2.7 VARIABILIDADE MORFOLÓGICA, GENÉTICA E BIOQUÍMICAS DE FUNGOS...32	
3 VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE <i>Sarocladium oryzae</i> QUANTO À MORFOLOGIA, VARIABILIDADE GENÉTICA, PRODUÇÃO DE CERULENINA E A ATIVIDADE ANTAGÔNICA IN VITRO.....	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
3.1 INTRODUÇÃO.....	35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.2.1 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Sarocladium oryzae</i>	36
3.2.2 Caracterização dos isolados de <i>Sarocladium oryzae</i> quanto à produção de cerulenina.....	37

3.2.2.1	Produção e extração da cerulenina.....	37
3.2.2.2	Quantificação da cerulenina.....	37
3.2.3	Potencial antagônico <i>in vitro</i> de <i>Sarocladium oryzae</i> aos principais patógenos fúngicos de arroz.....	38
3.2.4	Efeito do filtrado de <i>S. oryzae</i> sobre a germinação de conídios e a formação de apressório de <i>Magnaporthe oryzae</i>	38
3.2.5	Variabilidade genética dos isolados de <i>Sarocladium oryzae</i>	39
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.3.1	Caracterização morfológica dos isolados de <i>Sarocladium oryzae</i>	40
3.3.2	Caracterização dos isolados de <i>Sarocladium oryzae</i> quanto à produção de cerulenina.....	45
3.3.3	Potencial antagônico <i>in vitro</i> de <i>Sarocladium oryzae</i> aos principais patógenos fúngicos de arroz.....	48
3.3.5	Germinação de conídios e formação de apressório de <i>Magnaporthe oryzae</i> com filtrado de <i>Sarocladium oryzae</i>	53
3.3.6	Variabilidade genética dos isolados de <i>Sarocladium oryzae</i>	56
3.4	CONCLUSÕES.....	58
4	SUPRESSÃO DA SEVERIDADE DA BRUSONE FOLIAR EM ARROZ POR <i>Sarocladium oryzae</i>	60
	RESUMO.....	60
	ABSTRACT.....	61
4.1	INTRODUÇÃO.....	62
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.2.1	Plantio e manutenção das plantas de arroz.....	63
4.2.2	Preparo do inóculo, inoculação e avaliação.....	64
4.2.3	Avaliação da supressão da brusone foliar e quantificação da atividade enzimática e teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.....	66
4.2.4	Obtenção do extrato enzimático.....	68
4.2.4.1	Dosagem de proteínas totais.....	68

4.2.4.2 Atividade da quitinase (EC 3.1.1.14).....	69
4.2.4.3 Atividade da β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.6).....	69
4.2.4.4 Atividade da lipoxigenase (EC 1.13.11.12).....	69
4.2.4.5 Atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7).....	70
4.2.4.6 Atividade da fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5).....	70
4.2.4.7 Conversão de valores de absorvância para atividade específica de cada enzima..	70
4.2.5 Extração de ácido salicílico das folhas de arroz.....	71
4.2.5.1 Quantificação do ácido salicílico das folhas de arroz.....	71
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.3.1 Definição da concentração de inóculo e do momento de aplicação do antagonista <i>Sarocladium oryzae</i>	71
4.3.2 Supressão da brusone foliar e quantificação da atividade enzimática e teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.....	74
4.3.3 Atividade enzimática e teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.....	76
4.3.3.1 Atividade enzimática e o teor de ácido salicílico nas folhas de arroz inoculadas somente com o antagonista <i>S. oryzae</i> , na ausência de <i>M. oryzae</i>	77
4.3.3.2 Atividade enzimática e teor de ácido salicílico nas folhas de arroz após a inoculação com <i>M. oryzae</i>	80
4.4 CONCLUSÕES.....	84
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	86
6 REFERÊNCIAS.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Seqüências dos primers oligonucleotídeos selecionados para a amplificação do DNA de <i>Sarocladium oryzae</i> pela reação de PCR.....	40
Tabela 2.	Caracterização de isolados de <i>S. oryzae</i> cor, textura das colônias, diâmetro das colônias, média da espessura das hifas, variação de espessura das hifas, média do comprimento dos conídios e variação do comprimento dos conídios.....	43
Tabela 3.	Produção de cerulenina por isolados de <i>S. oryzae</i>	47
Tabela 4.	Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos do arroz por isolados de <i>S. oryzae</i>	50
Tabela 5.	Tratamentos para quantificação da atividade enzimática e do teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.....	67
Tabela 6.	Número da coleta, momento de cada coleta e tratamentos coletados para a quantificação da atividade enzimática e do teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.....	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida da fase assexuada de *M. oryzae*. (Adaptado de Skamnioti & Gurr, 2009; Wilson & Talbot, 2009)..... 24
- Figura 2.** Variabilidade morfológica quanto à coloração das colônias de isolados de *S. oryzae*, representada pelas cores: (A) Rosa claro; (B) Alaranjado claro e (C) Alaranjado..... 42
- Figura 3.** Cromatógrafos (1A) Padrão de cerulenina (Sigma) exibindo dois picos, de produto degradação da cerulenina (PDC) em 6,26 minutos e cerulenina (C) em 6,46 minutos; (1B) Amostra que não produz cerulenina (NP), exibindo a ausência de picos entre 6,26 e 6,46 minutos e (1C) Amostra que produz cerulenina, mostrando como na amostra padrão dois picos, de produto de degradação da cerulenina (PDC) em 6,26 minutos e cerulenina (C) em 6,46 minutos..... 48
- Figura 4.** Antagonismo de So 29 e testemunha de cada patógeno. (A) So 29 x *C. miyabeanus*; (B) *C. miyabeanus*; (C) So 29 x *M. oryzae*; (D) *M. oryzae*; (E) So 29 x *M. albescens*; (F) *M. albescens*; (G) So 29 x *T. cucumeris* e (H) *T. cucumeris*..... 52
- Figura 5.** Ação dos filtrados de *S. oryzae* dos isolados So 03 e So 29 sobre o desenvolvimento conídios de *M. oryzae*. (A) Número de conídios de *M. oryzae* com tubo germinativo formado, (B) Número de conídios de *M. oryzae* com apressórios formados e (C) Número de conídios de *M. oryzae* deformados..... 55

- Figura 6.** Efeito do filtrado de *S. oryzae* na germinação e formação de apressórios de conídios de *M. oryzae*. (A) 0 hora/ So 03; (B) 12 horas/ So 03; (C) 20 horas/ So 03; (D) 0 hora/ So 29; (E) 12 horas/ So 29; (F) 20 horas/ So 29; (G) 0 hora/ *M. oryzae*; (H) 12 horas/ *M. oryzae* e (I) 20 horas/ *M. oryzae*..... 56
- Figura 7.** Dendrograma de isolados de *S. oryzae* obtido a partir de coeficiente de dissimilaridade genética com agrupamento de bandas RAPD em combinação com os primers Saro-GF e Saro-MR..... 58
- Figura 8.** Momentos de aplicação e concentrações do filtrado e da suspensão de conídios de *S. oryzae* para a supressão da brusone foliar do arroz..... 65
- Figura 9.** Severidade da brusone foliar em plantas de arroz pulverizadas com *S. oryzae* na forma de filtrado e suspensão de conídios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)..... 73
- Figura 10.** Severidade da brusone foliar em plantas de arroz ao longo do tempo, quando tratadas com (A) Controle: somente suspensão de conídios de *M. oryzae*; (B) Suspensão de conídios de *S. oryzae* aplicado 48 horas antes da inoculação desafiante com *M. oryzae* e (C) Filtrado de *S. oryzae* aplicado 48 horas antes da inoculação desafiante com *M. oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem no teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 75
- Figura 11.** Supressão da severidade da brusone foliar em arroz, em plantas tratadas com filtrado e suspensão de conídio de *S. oryzae*. As barras representam os tratamentos comparados, onde Mo é a planta inoculada somente com *M. oryzae*; 48AS1 são as plantas inoculadas 48 horas antes com a suspensão de conídios de *S. oryzae* e *M. oryzae* e 48 AF1 são as plantas inoculadas 48 horas antes com o filtrado de *S. oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem no teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 76

- Figura 12.** Bainhas e folhas de arroz nos tratamentos: (A) *M. oryzae* + suspensão de conídios de *S. oryzae*, (B) *M. oryzae* + filtrado de *S. oryzae* e (C) Controle (plantas inoculadas somente com água)..... 77
- Figura 13.** Atividade enzimática e quantificação do ácido salicílico em plantas de arroz tratadas com suspensão de conídios e filtrado de *S. oryzae* e coletadas às 3, 5, 24 e 48 após a pulverização de *S. oryzae*. Onde: (A) Quitinase; (B) β -1,3-Glucanase (C) Peroxidase; (D) Lipoxigenase; (E) Fenilalanina amônia-liase e (F) Ácido salicílico..... 79
- Figura 14 A.** Atividade enzimática de plantas de arroz, tratadas com suspensão de conídios e filtrado de *S. oryzae* e inoculadas após 48 horas com *M. oryzae*. Coletas às 3, 5, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com *M. oryzae*. Onde: (A) Quitinase; (B) β -1,3-Glucanase e (C) Peroxidase..... 82
- Figura 14 B.** Atividade enzimática de plantas de arroz, tratadas com suspensão de conídios e filtrado de *S. oryzae* e inoculadas após 48 horas com *M. oryzae*. Coletas às 3, 5, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com *M. oryzae*. Onde: (A) Lipoxigenase; (B) Fenilalanina amônia-liase e (C) Ácido salicílico..... 83

LISTA DE SIGLAS

- AACPD** - Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença
- ABTS** - Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)
- ACB** - Agentes de Controle Biológico
- AJ** - Ácido Jasmônico
- AS** - Ácido Salicílico
- BDA** - Batata-Ágar-Dextrose
- BSA** - Albumina Soro Bovina
- C** - Cerulenina
- C3** - Metabolismo fotossintético tipo C3
- C4** - Metabolismo fotossintético tipo C4
- CBB** - Coomassiebrilliant blue
- CFMNCNPAF** - Coleção de Fungos e Microrganismo Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão
- CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento
- DIC** - Delineamento Inteiramente Casualizado
- DNS** - Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
- DTT** - 2-mercaptoetanol
- E** - Etileno
- EC (1.11.1.7)** - Peroxidase
- EC (1.13.11.12)** - Lipoxigenase
- EC (3.1.1.14)** - Quitinase
- EC (3.2.1.6)** - β -1,3-Glucanase
- EC (4.3.1.5)** - Fenilalanina amônia-liase
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EE** - Extrato Enzimático
- FAO** - Food and Agriculture Organization
- FeSO₄** - Sulfato de Ferro
- FI** - Filtrado
- HPLC** - High-Performance Liquid Chromatography

IBM - International Business Machines

ILO - International Labor Organization

IRRI - International Rice Research Institute

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ND - Não detectável

NP- Não produz

NTSYS-PC - Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs

PCR - Polymerase Chain Reaction

PDC - Produto de Degradação da Cerulenina

PMSF - Fenilmetilsulfonilflúor

PR-protéínas - Proteínas Relacionadas à Patogênese

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

RPM - Rotações Por Minuto

RSA - Resistência Sistêmica Adquirida

RSI - Resistência Sistêmica Induzida

SASM-Agri - Sistema para a Análise e Separação de Médias em experimentos agrícolas

SC - Suspensão de conídios

TBE - Tris, Borato e EDTA

UPGMA - Unweighted Pair-Group Method using Arithmetical Average

ZnSO₄ - Sulfato de Zinco

RESUMO GERAL

GUIMARÃES, R. A. **Caracterização de isolados de *Sarocladium oryzae* e seu potencial na supressão da brusone foliar em arroz**. 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitossanidade) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 2014.¹

Sarocladium oryzae, agente causal da podridão da bainha do arroz, é descrito como antagonista a patógenos de arroz. A brusone, principal doença do arroz é responsável por perdas de até 100% na produtividade. O controle desta doença é feito pelo uso do manejo integrado, onde as principais práticas são o uso de cultivares resistentes e o controle químico. O uso de agentes de biocontrole ou seus metabólitos pode ser mais uma prática a ser inserida ao manejo. Os objetivos deste estudo foram: avaliar isolados de *S. oryzae* quanto à variabilidade morfológica, genética, bioquímica e quanto à atividade antagônica aos patógenos de arroz; avaliar o efeito do filtrado de *S. oryzae* na germinação de conídios e na formação de apressórios de *M. oryzae*; avaliar o potencial da suspensão de conídios e do filtrado de *S. oryzae* na supressão da brusone foliar e quantificar a atividade das enzimas relacionadas à patogênese e do fitohormônio ácido salicílico (AS) envolvidos na interação *M. oryzae* x arroz x *S. oryzae*. Os isolados foram caracterizados quanto à cor, textura, diâmetro da colônia, tamanho dos conídios e espessura das hifas. No estudo genético, utilizou-se marcador RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e a produção de cerulenina foi quantificada em HPLC. O antagonismo *in vitro* foi avaliado pelo método da cultura pareada. A ação de *S. oryzae* sobre a germinação de conídios e a formação de apressórios de *M. oryzae* foi avaliada em superfície hidrofóbica. Plantas de arroz da cultivar BRS Primavera, um isolado virulento de *M. oryzae* (Py 10.900) e o isolado So 03 de *S. oryzae*, foram avaliados no estabelecimento das relações planta-patógeno-antagonista. As plantas foram pulverizadas com *S. oryzae*, na forma de suspensão de conídios (SC) - 3×10^5 conídios.mL⁻¹ e filtrado (FI) 100% concentrado, dois dias antes da inoculação com *M. oryzae*. Os isolados de *S. oryzae* apresentaram variabilidade morfológica e polimorfismo no DNA. A maioria dos isolados de *S. oryzae* (60%) foi capaz de produzir cerulenina e mais de 55% foram antagônicos a *C. miyabeans*, *M. oryzae*, *M. albescens* e *T. cucumeris*. O isolado So 29 apresentou o maior halo de inibição no pareamento. Os filtrados dos isolados So 03 e So 29 retardaram a germinação dos conídios em 89,5% e inibiram a formação dos apressórios de *M. oryzae* em 85%. A SC reduziu a severidade da brusone foliar em 68,8% e o FI em 75,5%. Os maiores valores de atividade enzimática específica em relação ao controle antes da presença de *M. oryzae* foram para β -1,3-glucanase e peroxidase no tratamento com FI, enquanto que, na SC foram lipoxigenase e AS. Depois da presença de *M. oryzae* a lipoxigenase e a fenilalanina-amônia liase apresentaram atividade tanto com FI quanto na SC, diferindo dos controles (plantas inoculadas com água e com *M. oryzae*, somente). *S. oryzae* apresentou variabilidade para as características avaliadas e potencial antagônico aos patógenos do arroz. As alterações na atividade enzimática indicam a indução de resistência em plantas na interação *M. oryzae* x arroz x *S. oryzae*.

Palavras-chave: *Magnaporthe oryzae*, secondary metabolite, biocontrol, induced resistance, enzymatic activity.

¹Orientadora: Dra. Valécia Lemes da Silva Lobo, Embrapa Arroz e Feijão.

GENERAL ABSTRACT

GUIMARÃES, R. A. Characterization of *Sarocladium oryzae* isolates and their potential in the suppression of leaf blast in rice. 2014. 105 f. Dissertation (Master in Agronomy: Plant Protection) - School of Agronomy and Food Engineering, Federal University of Goiás, 2014. ¹

Sarocladium oryzae, the causal agent of rice sheath rot disease is described as antagonistic to rice pathogens. Rice blast is a major rice disease and is responsible for losses up to 100% in productivity. The disease control is done by integrated management, where the main practices are use of resistant cultivars and chemical control. The biocontrol agents or their metabolites may be more practical to be including them as components in the management. The objectives of this study consist to evaluate of *S. oryzae* isolates for the morphological variability, genetics, biochemistry and antagonistic activity to rice pathogens; evaluate effect of *S. oryzae* filtrate on conidial germination and appressorium formation of *M. oryzae*; evaluate potential of conidia and filtrate *S. oryzae* in the suppression of leaf blast severity and quantify activity of enzymes involved in interaction *M. oryzae* x rice plant x *S. oryzae*. Isolates were characterized for color, texture, colony diameter, conidia size and hyphae thickness. In genetic studies, we used RAPD marker primers, and cerulenin production was quantified by HPLC. Antagonism *in vitro* was assessed by dual culture method. The effect of *S. oryzae* on conidial germination and appressorium formation of *M. oryzae* was evaluated using hydrophobic surface. Rice cultivar BRS Primavera, *M. oryzae* isolate (Py 10.900) and *S. oryzae*, isolate So 03, were utilized to study plant-pathogen-antagonist relationship. Plants were sprayed, with conidial suspension (CS), 3×10^5 conídios.mL⁻¹ and culture filtrate (CF) 100% of *S. oryzae*, two days before inoculation with *M. oryzae*. *S. oryzae* isolates showed morphological variability, polymorphism in DNA. A majority of *S. oryzae* isolates (60%) were able to produce cerulenin and over 55% were antagonistic to *C. miyabeans*, *M. oryzae*, *M. albescens* and *T. cucumeris*. The isolate So 29 showed largest inhibition zone. Filtrate of isolates So 03 and So 29 delayed conidia germination by 89.5% and inhibited appressoria formation of *M. oryzae* by 85%. CS reduced of leaf blast severity in 68.8% and CF in 75.5%. The enzymes β -1,3-glucanase and peroxidase exhibited maximum activity in plants sprayed with CF, when as the activity was high for SA and lipoxygenase in relation to CS treatment, compared to their respective controles, in the absence of *M. oryzae*. After inoculation with *M. oryzae*, the lipoxygenase and phenylalanine ammonia-lyase activity in both treatments CF and CS, showed differences compared to controls (plants inoculated with *M. oryzae* and water only). *S. oryzae* presented variability to characteristics evaluated and showed potential antagonism against to rice pathogens. Changes in enzyme activity indicate their role in induction resistance in plants in *M. oryzae* x rice x *S. oryzae* interaction.

Key words: *Magnaporthe oryzae*, secondary metabolite, biocontrol, induced resistance, enzymatic activity.

¹Adviser: Dra Valécia Lemes da Silva Lobo, Embrapa Arroz e Feijão.

1 INTRODUÇÃO GERAL

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 (Van Nguyen & Ferrero, 2006). No Brasil, sua importância é refletida em nível estratégico, econômico e social. A produção estimada para a safra brasileira de 2013/2014 é de 12,2 milhões de toneladas, apresentando um aumento de 3,1 % em relação à safra 2012/2013 (CONAB, 2014). O Brasil se destaca entre os maiores produtores mundiais de arroz, ocupando a nona posição e representa o único país não asiático entre estes (FAO, 2013).

Os entraves da cadeia produtiva do arroz, que interferem diretamente na produção e na produtividade são: elevado custo de produção (Hillmann, 2001), ocorrência de pragas, doenças (Santos et al., 2009), plantas daninhas (Balbinot et al., 2011) e toxidez por ferro (Vahl, 1991). As principais doenças da cultura do arroz que causam prejuízos significativos na produção e na qualidade dos grãos, em ordem decrescente de importância, são: brusone (*Magnaporthe oryzae*), mancha-parda (*Cochliobolus miyabeanus*), queima-das-bainhas (*Thanatephorus cucumeris*) e escaldadura (*Monographella albescens*) (Kimati et al., 2005, Dallagnol, 2006). A brusone é a mais importante, podendo causar perdas de até 100 % (Prabhu et al., 2009).

Os métodos de controle da brusone devem buscar soluções para evitar ou minimizar os danos causados pela doença. O manejo integrado é o mais indicado e tem como base a combinação da resistência genética das cultivares, as práticas culturais e o controle químico (Prabhu & Filippi 2006). O uso da resistência genética é a principal prática adotada (Araújo & Prabhu, 2001), e também mais almejada. Porém, o uso de fungicidas faz-se necessário, principalmente, quando a cultivar apresenta baixo grau de resistência (Prabhu & Filippi 2006).

Novas medidas de controle como o uso de agentes de biocontrole, podem ser inseridas no manejo integrado, visando um maior sucesso no manejo da doença, podendo até contribuir para a redução do número de aplicações de agrotóxicos (Bettiol & Ghini, 2003). A indústria farmacêutica tem apresentando enorme interesse pelos fungos que produzem toxinas, pois

muitos deles são responsáveis pela produção de antibióticos, metabólitos secundários e enzimas de interesse na saúde humana (Zhang et al., 2006). Tal interesse também é observado na agricultura, pois alguns fungos apresentam interação com as plantas, atuando como agentes de controle biológico quando produzem ou secretam tais substâncias sobre um agente patogênico, evitando ou reduzindo as doenças de plantas (Azevedo et al., 2000; Liu et al. 2001).

Os fungos filamentosos formam o maior grupo microbiano, apresentando um grande número de espécies e uma enorme variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Tal diversidade tem propiciado a exploração de algumas linhagens fúngicas filamentosas que em condições adequadas e controladas, são capazes de produzir substâncias ou de provocar alterações desejáveis para produzir outras substâncias, resultando em produtos ou processos bioativos (Colen, 2006). Estes microrganismos já são utilizados pela humanidade na produção de alimentos, bebidas, fármacos e outros bioprodutos. Os avanços quanto à fisiologia, bioquímica e genética demonstram o potencial destes microrganismos como produtores de enzimas extracelulares, como catalases, amilases, celulasas, xilanases, peroxidases, invertases, pectinases, queratinases, lipases e proteases, dentre outras enzimas e compostos de interesse múltiplo. Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola* e *Penicillium* já foram relatados como produtores de metabólitos enzimáticos (Torres et al., 2008).

O fungo filamentoso *Sarocladium oryzae*, agente causal da podridão da bainha do arroz, é conhecido pelo potencial antagônico a alguns fungos (Gnanamanickam & Mew 1991), agentes causais de doenças do colmo do arroz, inclusive de *M. oryzae* (Sakthivel et al., 2002; Silva et al., 2007). Este fungo produz um metabólito secundário, a cerulenina (Omura, 1976; Sakthivel & Gnanamanickam 1986), a qual funciona como um potente inibidor do metabolismo de ácido graxo (Omura, 1976) que catalisa a formação da narigerina. A narigerina é um importante flavonóide, que apresenta toxicidade a alguns patógenos fúngicos e bacterianos do arroz (Padmavathi et al., 1997), podendo ser importante para a resistência das plantas de arroz à brusone. A cerulenina vem sendo descrita como metabólito secundário de ação antagônica *in vivo* e *in vitro* contra patógenos de arroz (Sakthivel & Gnanamanickam, 1986; Gnanamanickam & Mew, 1991; Prabhu et al., 2007; Côrtes et al., 2014).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *S. oryzae* quanto à morfologia, a variabilidade genética, a produção de cerulenina e ao potencial antagônico *in vitro* contra patógenos de arroz. E também, avaliar *in vivo* a supressão da brusone foliar em arroz por *S. oryzae* e pelo filtrado produzido pelo mesmo, além da quantificação da ação destes na resposta de defesa da planta por ativação de processos bioquímicos expressos pela atividade enzimática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO ARROZ

O arroz é uma gramínea monocotiledônea da Família *Poaceae*, subfamília *Pooideae*, tribo *Oryzae* e gênero *Oryza* (Chandraratma, 1964). O gênero *Oryza* é constituído por aproximadamente de 23 espécies (Chang, 1996; Kellogg, 2001) e este complexo compreende duas espécies cultivadas *Oryza glaberrima* e *Oryza sativa* (Buso et al., 1998), sendo *Oryza sativa* L. a mais cultivada mundialmente e principal fonte de nutrição para cerca de 70% da humanidade (Kellogg, 2001).

É uma planta C3 hidrófila com anatomia foliar bem parecida com gramíneas C4, mas com diferenças que a impedem de realizar o metabolismo C4 (Edwards & Walker, 1983; Cutter, 1987; Pinheiro et al., 2000). Tais características levaram-na a adaptar-se aos mais variados ambientes com diferentes condições de solo e de clima (Maclean et al., 2002). É uma planta de cultivo anual e em algumas regiões tropicais, com condições climáticas favoráveis, pode crescer como planta perene (Portero, 2010).

O cultivo de arroz no Brasil é realizado em dois sistemas, irrigado e de terras altas. O cultivo irrigado (várzeas ou terra baixas) é responsável por 70% da produção nacional e 65% desta produção ocorre no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, além dos estados de Tocantins e Maranhão (Gomes et al., 2004; CONAB, 2014). O cultivo de terras altas (sequeiro), conta apenas com água das chuvas para seu desenvolvimento, sendo o sistema mais utilizado na maior parte dos estados do país. Áreas de sequeiro vêm caindo safra a safra devido à concorrência com a soja e o milho, o impedimento de abertura de novas áreas e problemas climáticos adversos na Região Nordeste (CONAB, 2014). A área atual cultivada no Brasil é de 2,40 milhões de hectares, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional com 1.120,1 mil hectares, o que representa 46,7% da área nacional e 66,5% da produção

brasileira. O estado de Santa Catarina é o segundo maior produtor seguido pelo Maranhão (CONAB, 2014).

A área atual cultivada no Brasil é de 2,40 milhões de hectares, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional com 1.120,1 mil hectares, o que representa 46,7% da área nacional e 66,5% da produção brasileira. O estado de Santa Catarina é o segundo maior produtor seguido pelo Maranhão (CONAB, 2014).

Vários fatores podem comprometer as lavouras de arroz tanto no sistema irrigado quanto no de terras altas, entre estes fatores as doenças são preocupantes para os produtores, pois diminuem a produtividade e afetam a qualidade dos grãos (Santos et al., 2003).

2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS FÚNGICAS DA CULTURA DO ARROZ

2.2.1 Escaldadura (*Monographella albescens*)

Monographella albescens (Thumen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth é o agente causal da escaldadura das folhas do arroz. O NCBI (National Center for Biotechnology Information) classifica este fungo como pertencente à divisão Ascomycota, família *Xylariomycetidae*, gênero *Monographella* e seu anamorfo é *Rhynchosporium oryzae* Hashioka & Yokog, sinônimo *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & IC. A escaldadura é considerada uma doença de importância crescente (Mazzanti de Castanon & Gutiérrez, 2001), responsável por limitar significativamente a produção por causar podridão das raízes e do coleótilo e pela redução da área fotossintetizante, além de causar esterilidade das flores (Webster & Grunnel, 1992). 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°C e 28°C, períodos prolongados de orvalho, alta densidade de plantas e adubação nitrogenada em excesso (Ou, 1985; Groth, 1992).

2.2.2 Queima-das-bainhas (*Thanatephorus cucumeris*)

A queima-das-bainhas é provocada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk que pertence à divisão Basidiomycota, família *Ceratobasidiaceae*, gênero *Rhizoctonia* (NCBI) e cujo anamorfo é *Rhizoctonia solani* Kuhn. É um patógeno importante tanto sistema irrigado quanto no de terras altas e ocorre geralmente nas bainhas e nos colmos. A ocorrência desta doença resulta em seca parcial ou total das folhas e provoca acamamento das plantas. É uma doença de difícil controle, pois apresenta um grande número de plantas hospedeiras, além de apresentar estruturas de resistência denominadas escleródios, que podem sobreviver no solo por vários anos. 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).

2.2.3 Mancha parda (*Cochliobolus miyabeanus*)

A mancha parda é provocada pelo fungo *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur, pertencente à divisão Ascomycota, família *Pleosporaceae*, gênero *Cochliobolus* (NCBI) e cujo o anamorfo é *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subram-f Jain e os sinônimos *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan e *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker. É uma doença que nas últimas safras sua ocorrência vem aumentando, tendo assumido posição economicamente importante devido à suscetibilidade da maioria das cultivares (Malavolta et al., 2002). É responsável pela morte de plântulas e pela redução na produtividade quando incide nas folhas e panículas (Prabhu & Vieira, 1989). O patógeno pode causar perdas de 30% no peso e 22% no número de grãos cheios por panícula, dependendo da cultivar (Prabhu et al., 1980). A doença é favorecida por temperaturas entre 20°C e 30°C e por alta umidade relativa do ar (maior que 89%). O estresse por excesso ou falta de água, a baixa fertilidade do solo, principalmente em relação à adubação com potássio e o uso de nitrogênio em níveis muito altos ou muito baixos aumentam a suscetibilidade da planta à mancha parda (Embrapa, 2007).

2.2.4 Brusone (*Magnaporthe oryzae*)

Magnaporthe oryzae Couch & Kohn, anamorfo *Pyricularia oryzae* Cavara é o agente causal da brusone do arroz. Segundo Couch & Kohn (2002) a classificação da forma perfeita ou mitospórica de *Pyricularia oryzae* é pertencente ao Domínio *Eukarya*, Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Subclasse *Sordariomycetidae*, Ordem *Magnaporthales*, Família *Magnaphortaceae* e Gênero *Magnaporthe*. A nomenclatura *Magnaporthe oryzae* é adotada atualmente para isolados patogênicos de arroz, milho e outras gramíneas e *Magnaporthe grisea* apenas de *Digitaria spp.* (Couch & Kohn, 2002; Wilson & Talbot, 2009).

As primeiras etapas do ciclo de vida de *M. oryzae* (Figura 1) iniciam quando os conídios produzidos nas lesões são disseminados pelo vento e pela água e caem sobre plantas ainda não contaminadas, iniciando assim o processo de infecção da doença (Fillipi et al., 2006). A infecção começa a partir da ligação de um conidióforo composto por três conídios unicelulares com a cutícula da folha de arroz (Wilson & Talbot, 2009). Estes conídios têm forma piriforme, obclavada, com base circular e ápice fino. São levemente escuros ou hialinos e na maioria das vezes possuem um único septo ou até dois septos (Prabhu & Fillipi, 2006). Os conídios aderem firmemente à superfície foliar por meio de um adesivo, formado de carboidratos e glicoproteínas (Howard & Valent, 1996; Leite et al., 1997), que permitem sua junção na superfície hidrofóbica da planta.

A etapa seguinte do processo infeccioso é o alongamento do tubo germinativo (Xu, 1996; Fillipi et al., 2006) que dará origem à formação do apressório, e este irá penetrar a superfície foliar (Lengeler et al., 2000; Fillipi et al., 2006), através de um grampo ou peg de penetração (Clergeot et al., 2001; Fillipi et al., 2006), dando origem ao processo de colonização do tecido do hospedeiro. Ao final, o desenvolvimento do patógeno na planta é dado com a formação de lesões necróticas, que inicialmente possuem coloração verde-acinzentada e aspecto encharcado com bordas verdes escuras e que se expandem rapidamente (Bonman, 1992).

É um patógeno policíclico (Ou, 1985) e hemibiotrófico (Jia et al., 2000) que pode atacar as plantas de arroz em todas as fases de desenvolvimento, podendo infectar folhas, caules, colmos, bainhas e panículas (Wilson & Talbot, 2009).

A brusone ocorre endemicamente em todas as regiões produtoras de arroz do mundo e pode adquirir caráter epidêmico quando as condições ambientais são favoráveis à infecção e a disseminação, tanto em condições de cultivo irrigado como de terras altas (Malavolta et al., 2008; Zhu et al., 2008; Ying et al., 2012). Prabhu & Fillipi (2006), relatam maiores ocorrências da doença em temperaturas variando de 25°C a 29°C e umidade acima de 80%, sendo estas as condições ideais para o seu desenvolvimento.

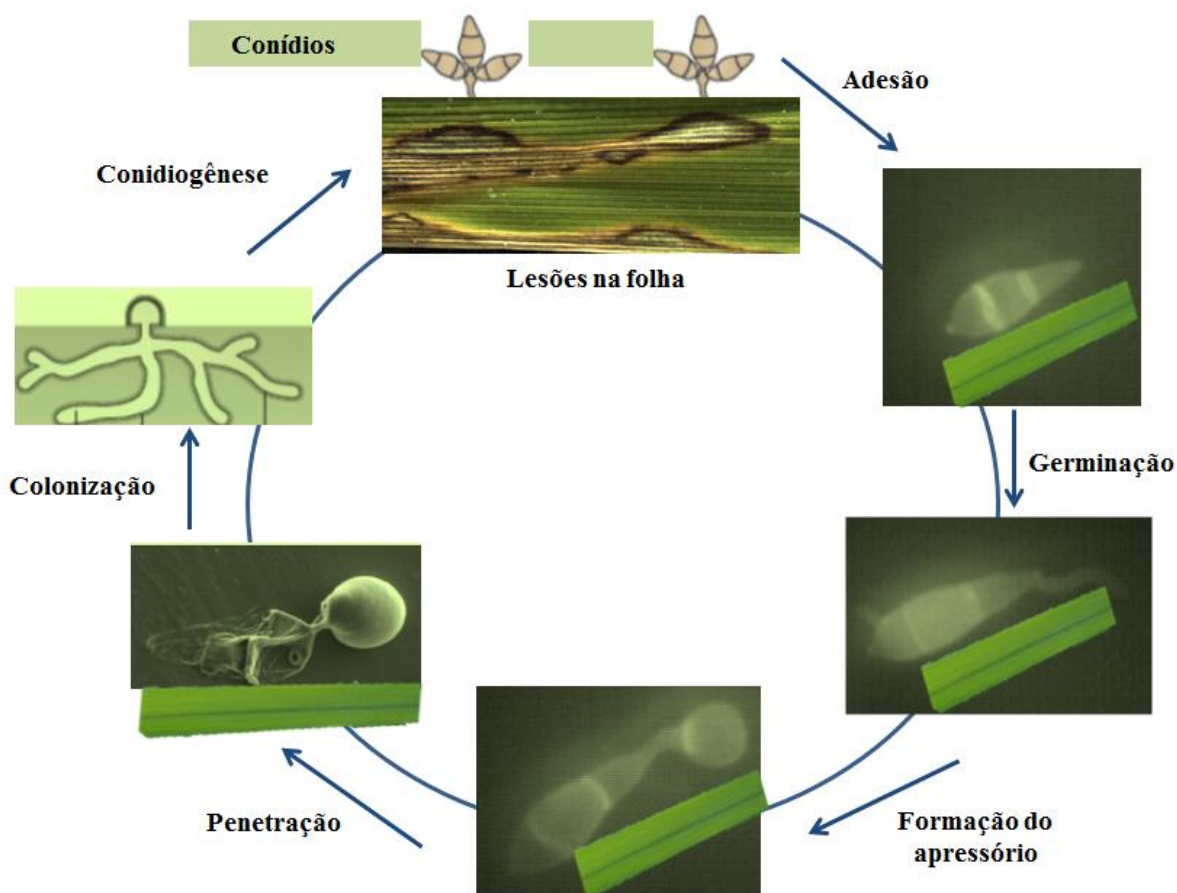


Figura 1. Ciclo de vida da fase assexuada de *M. oryzae*. (Adaptado de Skamnioti & Gurr, 2009; Wilson & Talbot, 2009).

A brusone é uma doença amplamente distribuída e tem alta capacidade destrutiva (IRRI, 2002), podendo causar perdas de até 100% (Prabhu et al., 2009). Todos os anos, de 10% a 30% da produção mundial de arroz é perdida devido a esta doença, o suficiente para

alimentar 60 milhões de pessoas, tornando esta enfermidade uma ameaça à segurança alimentar (Ziegler et al., 1994; Wilson & Talbot, 2009; Pennisi, 2010).

2.3 MANEJO INTEGRADO DA BRUSONE

O manejo integrado é essencial para o controle da brusone no campo, sendo um aliado na redução da severidade da doença. No manejo integrado são inseridas práticas como: utilização de cultivares resistentes, uso do controle químico, manutenção dos índices ideais de nutrição mineral, manejo da irrigação, preparo do solo, uso de sementes sadias ou tratadas, além de alternar o uso de cultivares, escalonamento do cultivo e adequada densidade de plantio objetivando reduzir a severidade da brusone nas plantas (Prabhu & Filippi, 2006).

O uso de sementes contaminadas, os restos culturais e a disseminação de conídios oriundos de lavouras vizinhas pelo vento e a água são as principais fontes de inóculo inicial (Prabhu & Moraes 1986; Prabhu, 1988; Fillipi & Prabhu, 1997; Silva-Lobo, 2008). O uso de sementes livres do patógeno é o método de controle inicial da brusone, além evitar a entrada de novos patótipos em novas áreas (Prabhu et al., 1999, Silva-Lobo, 2008).

O desenvolvimento de cultivares resistentes têm sido o meio mais econômico, além de mais ecológico, para reduzir as perdas causadas pela brusone (Ying et al., 2012). No entanto, as cultivares apresentam baixa durabilidade da resistência, a qual é suplantada em média após dois anos de uso comercial das cultivares, podendo chegar até três anos (Santos et. al, 2005, Santos et al., 2012). A alta variabilidade patogênica e a complexidade do fungo resultam na suplantação da resistência em curtos períodos de tempo (Correa-Victoria & Zeigler, 1993; Ying et al., 2012). Neste contexto, é conveniente o desenvolvimento de cultivares com resistência durável, sendo por clonagem de genes ou seleção assistida por marcadores moleculares nos programa de melhoramento (Ying et al., 2012).

O controle químico é bastante utilizado no manejo da brusone, uma vez que até o momento não existem cultivares com resistência durável e específica para cada tipo de raça do patógeno (Levy et al., 1993; Prabhu & Filippi 2006). Os fungicidas são usados como aliados na proteção da resistência das plantas de arroz contra *M. oryzae* (Prabhu & Filippi 2006, Gonçalves et al., 2012). Porém, relatos abordam o uso indiscriminado de fungicidas (ILO, 2005; Gunnel et al., 2007), que além de selecionar linhagens resistentes do patógeno (Heydari

& Misaghi, 2008), levando a ineficiência de seu princípio ativo, causam danos ao homem e meio ambiente (Moreira et al., 2002).

Alguns microrganismos que atuam no biocontrole de doenças de plantas representam um caminho alternativo no manejo da brusone, sendo tão efetivos quanto a alguns fungicidas existentes no mercado. Além de serem mais seguros à saúde humana e ao meio ambiente, podem ser mais uma medida de controle inserida no manejo integrado, contribuindo para restringir e/ou reduzir o uso de fungicidas (Zucchi & Melo, 2009).

2.4 BIOCONTROLE

As doenças de plantas vão além da interação planta-patógeno-hospedeiro sob a influência do ambiente, para Cook & Baker (1983) dentro da abordagem de controle biológico, a doença é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e uma variedade de não patógenos que repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno ou a resistência do hospedeiro. Nesta abordagem, também deve ser considerada a ação do ambiente sobre todos estes fatores (Bettiol & Morandi, 2009).

O conceito clássico de controle biológico definido por Cook & Baker (1983) é: “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem”. Diretamente é o controle de um ou mais microrganismos por meio de outro(s) microrganismo(s) (Morandi & Bettiol, 2009).

O uso do controle biológico é uma estratégia interessante e disponível, sendo a utilização de agentes de controle biológico (ACB) um componente promissor no manejo integrado de doença (Andrews & Hirano, 1991). As principais vantagens do controle biológico de doenças de plantas relacionam-se: a não toxicidade, tanto para quem os manipula, como para o meio ambiente; baixos custos em relação aos fungicidas; viabilidade no ambiente, sendo que uma vez aplicados, podem permanecer no ambiente mesmo na ausência do patógeno e a reduzida necessidade de novas aplicações (Bettiol, 1991; Silva et. al, 2013).

A adoção desta prática encontra-se bastante disseminada em diversos países e vem sendo uma estratégia crescente na América Latina (Alves et al., 2008) devido a uma série de vantagens em relação ao controle químico (Soares, 2006), que é economicamente inviável a longo prazo, polue a atmosfera prejudicando o meio ambiente, deixa resíduo, além de levar o desenvolvimento de estirpes resistentes do patógeno e ter ação sobre organismos não-alvos (Naseby et. al, 2000; Vinale et. al, 2008).

A redução de aplicação de agrotóxicos na agricultura moderna representa uma necessidade urgente e altamente desejável. Um meio promissor para alcançar este objetivo é a utilização de ACB, propondo não apenas o controle da doença por si só como também veicular a redução de aplicação de agrotóxicos no controle de doenças, resultando em um menor impacto negativo ao meio ambiente (Chet & Inbar, 1994; Harman & Kubicek, 1998; Vinale et al., 2008).

Vários estudos vêm sendo feitos sobre a seleção e o uso de ACB para o controle de doenças em culturas agrícolas (Bettiol & Kimati, 1989), destacando-se as espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* e de fungos do gênero *Trichoderma* (Lazzaretti & Bettiol, 1997; Melo, 1991) *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Candida* e *Coniothyrium* (Harman et al. , 2004).

Dentre as espécies fungícas utilizadas como ACB, o gênero *Trichoderma* é o mais estudado. Sendo utilizado para o controle de patógenos tanto oriundos do solo quanto de parte aérea. Em condições de campo e cultivo protegido além de poder ser aplicado tanto em pré quanto em pós-colheita (Ubalua & Otti, 2007; Harman, 2006).

Lisboa et al. (2007) utilizaram um isolados *Trichoderma harzianum* e outro de *Gliocladium viride* e obtiveram efetividade no controle de *Botrytis cinerea* em cultivo de tomateiro em ambiente protegido. Robbs (1991) & Mello (1998) descreveram o uso de *Ampelomyces quisqualis* no controle de doenças florestais, controlando principalmente oídio em estufas produtoras de mudas. Valdebenito-Sanhueza (2000) relataram a eficiência de *Candida aleophila* no controle de doenças de pós-colheita, como *Botrytis* e *Penicillium*. Moretini & Melo (2007) constataram que *Coniothyrium minitans* é capaz parasita os escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e reduz a incidência da doença.

2.5 MECANISMOS DE BIOCONTROLE

Os mecanismos de controle biológico baseiam-se na relação antagônica entre microrganismos e fitopatógenos e se caracterizam por diferentes modos de atuação do antagonista (Bettiol, 1991; Lo, 1998). Segundo Junaid et al. (2013) os mecanismos de biocontrole se classificam em antagonistas diretos e antagonistas indiretos. O antagonismo direto é resultante de um contato físico, apresentando um alto grau de seletividade dos agentes de biocontrole sobre o patógeno, sendo representado pelas relações de: hiperparasitismo, micoparasitismo, antibiose, secreção de enzimas líticas e promoção de crescimento. No antagonismo indireto a indução de resistência é o principal exemplo, seguido pela competição.

O hiperparasitismo ou predação é considerado a forma mais direta de antagonismo (Pal & Gardener, 2006) e pode ocasionar uma sucessão de eventos do antagonista sobre o patógeno. O antagonista ataca as hifas, estruturas de reprodução e sobrevivência do patógeno e consegue gerar a dissolução do patógeno ou da parede celular pela atividade de enzimas (Tiwari, 1996).

O micoparasitismo é o resultado do uso do fitopatógeno como alimento pelo antagonista, além de ter atuação na síntese de enzimas líticas, compostos tóxicos e antibióticos (Lucon, 2008; Benítez et al., 2004). A produção e/ou secreção de enzimas líticas por ACB tais como, quitinase, β -1,3 glucanase e proteases estão correlacionadas ao antagonismo. Estas enzimas têm sido mencionadas por inibir o crescimento de alguns patógenos de plantas, pois degradam a parede celular destes.

A antibiose refere-se à produção de substâncias de baixo peso molecular (compostos voláteis e não voláteis) ou antibióticos por microrganismos antagônicos que têm um efeito direto no crescimento do patógeno (Weller, 1988; Bettiol & Ghini, 1995; Benítez et al., 2004). Para Hagle & Shaw (1991) o antagonista age por antibiose prevenindo o desenvolvimento do micélio de outro organismo, limitando a ocupação do substrato por pré-ocupação ou pela eliminação do patógeno do substrato.

Os ACB tem aptidão em reduzir a intensidade de doenças de plantas e podem agir como promotores de crescimento. A promoção de crescimento por um antagonista pode ocorrer pelo menos durante as fases iniciais do ciclo de uma cultura, sendo essencial para o escape de muitas doenças (Junaid et al., 2013).

A competição é um tipo de antagonismo indireto, onde dois ou mais organismos disputam recursos ao mesmo tempo e/ou no mesmo substrato, como espaço, nutrientes, água e luz (Bettiol & Ghini, 1995). Tanto o ACB quanto o agente patogênico competem entre si para estabelecer no ambiente e obter a ocupação física do sítio (Lorito et al., 1994).

A indução de resistência não é a criação de uma resistência, e sim a ativação de mecanismos latentes que podem expressar resistência após o contato ou exposição à elicitores bióticos e abióticos (Van Loon et al, 1998). O uso de elicitores é uma prática de baixo impacto em relação ao uso de fungicidas, pois estes têm ação especial na expressão de genes da planta e não ação tóxica sobre o patógeno (Görlach et al., 1996). O contato da planta com microrganismos patogênicos e não patogênicos origina uma gama de mecanismos de defesa da planta. Os principais mecanismos de defesa reconhecidos são: a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (Shoresh et al., 2010).

A RSA é normalmente estimulada por uma infecção local e oferece resistência sistêmica de longo prazo. É associada à ativação de genes relacionados à patogênese que codificam proteínas com atividade antimicrobiana e necessitam do envolvimento do ácido salicílico (AS) como molécula sinal (Durrant & Dong, 2004; Pieterse et al., 2009). O reconhecimento do patógeno está concatenado com aumentos dos níveis de AS, tanto no local da infecção quanto distribuídos sistemicamente em tecidos distantes do ponto de infecção (Mishina & Zeier, 2007; Tsuda et al., 2008).

A RSI é uma resposta obtida através da colonização de raízes por agentes não patogênicos, na maioria das vezes rizobactérias ou fungos micorrízicos, tais microrganismos podem induzir fenotipicamente a planta a assimilar este tipo de resistência (Van Loon et al., 1998, Pieterse et al., 2009). RSI não é AS-dependente, mas requer componentes de sinalização pela via metabólica do ácido jasmônico (AJ) e do etileno (E) (Shoresh et al, 2010).

A manifestação destes mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas. E estão relacionados a mudanças na atividade de enzimas-chaves nos metabolismos primário e secundário (Araújo & Menezes, 2009). Neste contexto, as enzimas quitinase (EC 3.1.1.14) e β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.6) estão associadas à defesa da planta contra os patógenos, por isso, são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) (Van Loon et al., 2006) e são responsáveis principalmente por promoverem a

desorganização da parede celular dos patógenos (Zhu et al., 1996; Jach et al. , 1995; Van Loon & Van Strien, 1999).

A lipoxigenase (EC 1.13.11.12) contribui para as reações de defesa da planta inibindo o crescimento do patógeno, induzindo a produção de fitoalexinas e participando na transdução de sinais (Namai et al, 1990; Wang, 2004). A fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5) está relacionada com a resistência de plantas aos patógenos, pelo seu envolvimento na síntese dos fenilpropanóides e é responsável por converter fenilalanina em ácido-transcinâmico (Hyodo et al., 1978), que resulta em compostos como fitoalexinas e, principalmente, lignina, e irão conferir maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (Nakazawa et al., 2001). A peroxidase (EC 1.11.1.7) atua em plantas infectadas por patógenos, ou em plantas induzidas por agentes bióticos ou abióticos na oxidação de compostos fenólicos, que são tóxicos aos patógenos (Sutic & Sinclair, 1991).

A presença de mais de um mecanismo de ação em um mesmo ACB é vista como uma característica favorável para a eficiência, estabilidade e inespecificidade do biocontrole (Morandi & Bettioli, 2008), sendo que a compreensão do(s) mecanismo(s) de ação de um ACB pode melhorar a consistência do controle dos fitopatógenos, reforçar o(s) mecanismo(s) e alocar o antagonista nas condições ideais de sobrevivência (Junaid et al.,2013).

2.6 *Sarocladium oryzae*

Sarocladium oryzae (Sawada) W. Gams & D. Hawksw (1976) (basônimo *Acrocyndrium oryzae* Sawada (1922) e sinônimo *Cephalosporium caerulens* Matsumae, Kamio & Hata (1963) / *Sarocladium attenuatum* W. Gams & D. Hawksw (1976) pertence ao Domínio *Eukaryota*, Reino *Fungi*, Sub-reino *Dikarya*, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Subclasse *Hypocreomycetidae*, Ordem *Hypocreales* e Gênero *Sarocladium* (NCBI). Está presente em todo o mundo (Mew & Gonzales, 2002), sendo o agente causal da podridão da bainha do arroz. É um patógeno da bainha e não infecta as folhas de arroz (Sakthivel et al., 2002). Os sintomas da doença, geralmente, aparecem na última bainha, abaixo da folha bandeira e sua infecção inicia-se na época da emissão das

panículas e pode aumentar até o final do ciclo (Ou, 1985; Sakthivel et al., 2002), apresentando lesões marrons acinzentadas nas bainhas (Ayyadurai et al., 2005).

Além dos aspectos de patogenicidade conhecidos, *S. oryzae* produz cerulenina (Matsumae, 1964; Omura, 1976; Sakthivel & Gnanamanickam, 1986), um metabólito secundário que funciona como um potente inibidor na biossíntese de ácidos graxos (Omura, 1976) e esta associada à resistência das plantas as doenças. A cerulenina inibe o metabolismo de ácidos graxos inibindo a síntese do ácido 6- metil salicílico (Padmavathi et al. , 1997). Desta forma, interfere na biossíntese de flavonóides, atuando na defesa e na sobrevivência das plantas e catalisando a formação da narigerina (Lamb et al., 1993; Padmavati et al., 1997).

2.7 VARIABILIDADE MORFOLÓGICA, GENÉTICA E BIOQUÍMICAS DE FUNGOS

As características morfológicas, como tamanho e forma de conídios e formato de apressórios são atributos utilizados para classificação taxonômica de muitos fungos (Sutton, 1992). Estas características são muitas vezes referidas como características morfométricas e permitem analisar a existência ou não de diversidade de muitos fungos, mensurando a taxa de crescimento, o diâmetro da colônia, a dimensão das células monilióides e o diâmetro das hifas (Cruz, 2008). A caracterização morfológica é útil, porém apresenta limitações devido ao baixo número de caracteres passíveis de serem analisados, da alta instabilidade e da dependência da composição do meio utilizado, das condições de incubação e das variações intrínsecas ao patógeno (Fungaro, 2000).

A variabilidade genética é outra classificação, em que conhecer uma população permite gerar informações sobre a identidade, a diversidade, a frequência e os relacionamentos filogenéticos entre os indivíduos, sendo capaz de diferenciá-los. Os marcadores moleculares são eficientes no fornecimento destas informações, sendo o uso de marcadores tipo RAPD uma alternativa simples, rápida e de baixo custo. Além de ser um método que requer baixa quantidade de DNA, revela alto grau de bandas polimórficas e amplifica vários locos gênicos sem o conhecimento prévio das sequências alvos (Michelmore et al., 1991; Lopes et al., 2002).

Conhecer a variabilidade bioquímica dos fungos é outra importante ferramenta para identificar novos recursos naturais bioativos. A produção de metabólitos secundários fúngicos,

por exemplo, vem compondo produtos farmacêuticos e agrícolas inovadores nos últimos anos (Jiang & An, 2000). Há uma diversidade de microrganismos, principalmente fungos, que produzem metabólitos secundários, sendo que vários destes atuam diretamente contra o crescimento e o desenvolvimento de outro(s) microrganismo(s). A identificação destes compostos bioativos é importante, pois caso sejam atóxicos (ao ser humano e aos animais) podem ser usados na fabricação e/ou compor formulações contra fitopatógenos (Zucchi & Melo, 2009).

3 VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Sarocladium oryzae*: MORFOLOGICA, GENÉTICA, PRODUÇÃO DE CERULENINA E A ATIVIDADE ANTAGÔNICA *IN VITRO*

RESUMO

Sarocladium oryzae é um fungo filamentososo, agente causal da podridão da bainha do arroz e apresenta antagonismo contra outros patógenos do colmo do arroz. O objetivo deste estudo foi avaliar isolados de *S. oryzae* quanto à variabilidade morfológica, genética e bioquímica; Avaliar a variabilidade de *S. oryzae* quanto à atividade antagônica aos patógenos do arroz: *Magnaporthe oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Thanatephorus cucumeris* e *Monographella albescens* e avaliar o efeito de *S. oryzae* na germinação de conídios e na formação de apressórios de *M. oryzae*. A caracterização morfológica em meio de cultura BDA, foi realizada avaliando-se a cor, a textura, o diâmetro da colônia, o tamanho dos conídios e a espessura das hifas. A variabilidade genética foi estudada utilizando o marcador RAPD e a variabilidade na produção de cerulenina foi quantificada em HPLC. O antagonismo *in vitro* dos isolados de *S. oryzae* aos quatro patógenos foi avaliado pelo método da cultura pareada. A ação do filtrado de *S. oryzae* sobre a germinação de conídios e a formação de apressórios de *M. oryzae* foi avaliada utilizando uma superfície hidrofóbica. Observou-se variabilidade morfológica entre os isolados de *S. oryzae*. Os mesmos apresentaram diferenças quanto à cor, à textura e ao tamanho das colônias, e quanto à espessura das hifas e ao tamanho dos conídios. Apresentaram ainda um elevado grau de polimorfismo no DNA da população estudada. A maioria dos isolados de *S. oryzae* foi capaz de produzir cerulenina, sendo a quantidade produzida pelos mesmos variáveis, onde So 03 foi o que produziu cerulenina em maior quantidade. A maioria dos isolados de *S. oryzae* apresentou antagonismo aos patógenos *C. miyabeans*, *M. oryzae*, *C. miyabeans* e *T. cucumeris*, sendo o isolado So 29, o que apresentou o maior halo de inibição. Os filtrados dos isolados de *S. oryzae*, So 03 e So 29 retardaram a germinação dos conídios e inibiram a formação dos apressórios de *M. oryzae* em 89,5% e 85%, respectivamente. Neste estudo, *S. oryzae* apresentou potencial antagônico aos patógenos do arroz, podendo ser utilizado em estudos promissores da interação planta-patógeno-antagonista.

Palavras-chave: *Magnaporthe oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Thanatephorus cucumeris* e *Monographella albescens*, metabólito secundário.

VARIABILITY OF *Sarocladium oryzae* ISOLATES: MORPHOLOGICAL, GENETIC, CERULENIN PRODUCTION AND *IN VITRO* ANTAGONISM

ABSTRACT

Sarocladium oryzae is a filamentous fungus, the causal agent of rice sheath rot and shows antagonism against and pathogens culm. The objective this study was to evaluate isolates of *S. oryzae* as the morphological variability, genetics and biochemistry; evaluate the variability of *S. oryzae* with antagonistic activity to rice pathogens: *Magnaporthe oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Thanatephorus cucumeris* and *Monographella albescens*; evaluate effect of *S.*

oryzae on conidial germination and appressorium formation of *M. oryzae*. Morphological characterization on PDA culture medium was performed by evaluating color, texture, colony diameter, conidia size and thickness of hyphae. Genetic variability has been studied using RAPD marker, and variability in cerulenin production was quantified by HPLC. Antagonism *in vitro* of *S. oryzae* isolates to four rice pathogens was evaluated by paired cultures method. The action of *S. oryzae* filtrate on conidial germination and appressorium formation of *M. oryzae* was evaluated using a hydrophobic surface. The morphological variability was observed among *S. oryzae* isolates. The isolates differed in color, texture and size of colonies, hyphae thickness and conidia size. A high degree of DNA polymorphism in the population studied was also observed. A majority *S. oryzae* isolates produced cerulenin, and the amount produced by the same was variable. The isolated So 03 produced cerulenin in greater quantities. Many isolates of *S. oryzae* showed antagonism to *M. oryzae*, *C. miyabeans*, *T.cucumeris* and *M. albescens*. The isolate So 29 presented the largest inhibition zone. The filtered of *S. oryzae*, isolates So 03 and So 29, delayed conidial germination and inhibited the appressorium formation of *M. oryzae* by 89% and 85%, respectively. In this study, *S. oryzae* showed in antagonist an to rice pathogens and can be used in further studies on plant-pathogen-antagonist interaction.

Key words: *Magnaporthe oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Thanatephorus cucumeris* and *Monographella albescens*, secondary metabolite.

3.1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos vitais nos ecossistemas. São eucarióticos, heterotróficos e altamente eficientes na degradação de uma gama de substratos. Ocorrem em associação com outras espécies, por exemplo, líquens ou micorrizas, como patógenos de animais e plantas ou como espécies de vida livre. Apresentam grande diversidade ecológica, fisiológica e morfológica e são agrupados em: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos (Azevedo, 1997; Jiang & An, 2000; Esposito & Azevedo, 2004; Mueller & Schmit, 2007).

A maioria dos fungos é conhecida por seu impacto negativo no bem estar humano, animal e vegetal. No âmbito vegetal, alguns gêneros são conhecidos por seu impacto positivo no controle de doenças de plantas, como os gêneros *Thichoderma* e *Acremonium* (Morandi & Bettioli, 2009). Estes são fungos filamentosos que têm habilidade em crescer em substratos simples e de baixo custo, além de produzir diversos metabólitos secundários (Meyer, 2008).

O fungo filamentoso *Sarocladium oryzae* é o agente causal da podridão da bainha na cultura do arroz, além de ser um patógeno específico da bainha, *S. oryzae* já foi relatado como antagonista contra patógenos fúngicos e bacterianos de arroz (Padmavathi et al., 1997; Gnanamanickam & Mew, 1991), devido a produção de um metabólito secundário, conhecido como cerulenina (Omura, 1976).

A cerulenina é um metabólito secundário produzido por algumas estirpes de *S. oryzae* (Matsumae et al., 1963, Omura et al., 1974, Ohno et al., 1974), pois nem todos os isolados de *S. oryzae* são capazes de produzir cerulenina, devido a ser uma condição variável dentro desta espécie e também já observada em outros fungos que produzem metabólitos. A cerulenina foi o primeiro antibiótico descrito por ter ação primária na síntese de lipídeos (Nomura et al., 1972) atuando como inibidor na biossíntese de ácidos graxos em células procariontes e eucariontes (Vance et al., 1972, Omura, 1976).

Uma abordagem sistemática de um organismo pode gerar informações sobre a morfologia, ecologia e inter-relações entre organismos, permitindo conhecer a história de

grupo, incluindo sua distribuição e evolução (Kanagawa & Neves, 2011). Já que foi observado que isolados de *S. oryzae* são capazes de produzir cerulenina (Omura (1976); Sakthivel et al. (2002); Bills et al. (2004)) além de que alguns isolados serem antagonicos à patógenos de arroz (Gnanamanickan & Mew (1991); Silva et al. (2007); Cortês et al. (2012)).

Deste modo, o objetivo deste estudo foi comparar isolados de *S. oryzae* quanto, a variabilidade morfológica, genética e quanto à produção do metabólito secundário, cerulenina e correlacionar o potencial antagonico deste isolados a patógenos fúngicos do arroz.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os dados referentes a este capítulo foram obtidos em laboratórios e áreas experimentais da Embrapa Arroz e Feijão, localizada no município de Santo Antônio de Goiás - GO. Os isolados utilizados neste trabalho foram originados da fazenda Palmital da Embrapa Arroz e Feijão.

3.2.1 Caracterização morfológica dos isolados de *Sarocladium oryzae*

A caracterização morfológica dos 28 isolados de *S. oryzae*, preservados em papel filtro cortados em aproximadamente 2,5 mm² de tamanho da coleção de fungos e microrganismos multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão (CFMMCNPAP) foi realizada em placas de Petri de 90 mm contendo meio de cultura BDA (batata-ágar-dextrose). Após a incubação por 14 dias a temperatura de 25°C e 80% de umidade, as colônias desenvolvidas foram caracterizadas quanto à cor, textura, diâmetro da colônia, tamanho de conídios e espessura das hifas. O diâmetro das colônias foi medido em mm utilizando um paquímetro digital (Digimess Stainless Steel). As medidas do tamanho dos conídios e a espessura das hifas foram realizadas com auxílio de microscópio óptico Nikon com aumento de 60 vezes. Foram preparadas lâminas de cada isolado e coradas com azul de metileno, medindo-se o tamanho de 30 conídios e a espessura de 30 hifas aleatoriamente utilizando-se o software NIS-Elements Advanced Research (Nikon Instrumentes Inc.).

3.2.2 Caracterização dos isolados de *Sarocladium oryzae* quanto à produção de cerulenina

3.2.2.1 Produção e extração da cerulenina

Os 28 isolados de *S. oryzae* da CFMMCNPAP foram cultivados em meio de cultura BDA e mantidos em câmara de incubação (25°C a 80% umidade) por seis dias. Após este período, foram retirados, com auxílio de um perfurador, discos de micélio de 5 mm e os mesmos foram transferidos para Erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido, considerado o meio mais adequado para a produção de cerulenina (Omura, 1976). Os Erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora orbital por 10 dias a 130 RPM e a 25°C. Após este período os meios foram transferidos para tubos tipo Falcon e centrifugados a 3880 G e 4 °C, o micélio foi descartado e o sobrenadante filtrado para remover possíveis fragmentos de micélio, obtendo-se 50 mL de filtrado de cada isolado, ao qual foi adicionado clorofórmio na razão de 1:1 (v/v) para extração do metabólito extracelular de característica apolar por meio da técnica de fracionamento com clorofórmio. A obtenção do metabólito foi realizada em funil de decantação, agitando a mistura por três vezes e observando a formação de duas fases distintas. Toda a fase apolar contida no funil de decantação foi coletada e transferida para um evaporador rotativo em banho maria a 40° C e a vácuo. Nesta etapa do processo foi eliminado o clorofórmio da mistura, resultando apenas em cristais com alto teor de cerulenina, os quais foram solubilizados em 150 µL de etanol 99% (Masuma et al., 1982).

3.2.2.2 Quantificação da cerulenina

A quantificação da cerulenina produzida por *S. oryzae* foi obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Perkin Elmer Flexar) pelo método proposto por Bills et al. (2004) com adaptações. As leituras foram realizadas com Chromera Speciation Software (Perkin Elmer) a 210 nm. Foi utilizada a coluna C 18 (150 x 4,6 mm x 5 µm) em temperatura de 40°C, onde a fase móvel B (acetonitrila) foi diluída em A (água). As leituras foram realizadas por 15 minutos, havendo a diluição da fase móvel por 9 minutos (15% B – 100% B) e por mais 3 minutos (100 % B – 15% B). As concentrações de cerulenina das amostras foram determinadas através de um padrão de cerulenina (Sigma) obtendo uma curva padrão com as

concentrações de 0,00125 - 0,2 µg/µL. Os dados de concentrações foram analisados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) com o programa SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

3.2.3 Potencial antagônico *in vitro* de *Sarocladium oryzae* aos principais patógenos fúngicos de arroz

A avaliação do potencial antagônico de *S. oryzae* aos patógenos fúngicos *M. albescens*, *C. miyabeans*, *T. cucumeris* e *M. oryzae* foi realizada pelo método da cultura pareada (Romeiro, 2007) e todos os testes foram realizados com a fase assexuada dos patógenos. Os pareamentos foram conduzidos em placas de Petri de 90 mm contendo meio BDA, onde discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram depositados em lados opostos da placa, distante um do outro em 45 mm. Sendo um disco de um dos patógenos (*M. albescens*, *C. miyabeans* e *M. oryzae*) e outro de isolados de *S. oryzae*. No teste de antagonismo com *T. cucumeris*, os isolados de *S. oryzae* foram plaqueados dois dias antes. Devido a característica de rápido crescimento micelial de *T. cucumeris* (Parmeter & Whitney, 1970). No tratamento testemunha, os patógenos foram cultivados isoladamente, colocando-se um disco de micélio no centro da placa. As culturas pareadas foram incubadas em ambiente controlado e receberam as condições favoráveis para o desenvolvimento de cada patógeno. A avaliação da formação de halo de inibição foi realizada assim que o tratamento testemunha atingiu crescimento total, ocupando toda a placa. O delineamento experimental utilizado foi DIC com três repetições. Os dados foram analisados pelo programa SASM-Agri e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.2.4 Efeito do filtrado de *S. oryzae* sobre a germinação de conídios e a formação de apressório de *Magnaporthe oryzae*

Os isolados de *S. oryzae* So 03 (isolado que produziu maior quantidade de cerulenina) e So 29 (melhor antagonista *in vitro* contra *M. oryzae*) foram selecionados para compor o

ensaio de germinação de conídios e de formação de apressórios de *M. oryzae*. Para preparar os filtrados de So 03 e So 29 foi utilizada a metodologia proposta por Côrtes et al. (2014). A obtenção da suspensão de conídios de *M. oryzae* (Filippi & Prabhu, 2001) foi ajustada para a concentração de 1×10^4 conídios. mL⁻¹ e filtrada para retirar possíveis fragmentos de hifas.

Foram utilizadas placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril e sobreposto com uma lâmina de vidro, a qual recebeu três cortes de lâmina de plástico (meio hidrofóbico), sendo cada placa representativa de um tratamento e cada corte uma repetição. O delineamento experimental foi em DIC com três repetições por tratamento. Os tratamentos foram: T1 (10 µL de So 03 + 10 µL da suspensão de conídios de *M. oryzae*); T2 (10 µL de So 29 + 10 µL da suspensão de conídios de *M. oryzae*) e T3 (10 µL suspensão de conídios de *M. oryzae* + 10 µL de água destilada estéril). Os volumes para cada tratamento foram adicionados sobre os cortes, homogeneizados e cobertos com lamínulas.

As avaliações foram realizadas em 60 conídios de *M. oryzae* a 1, 3, 6, 12 e 20 horas após o preparo das lâminas, observando-se o atraso ou inibição na germinação de conídios e na formação de apressórios de 60 conídios de *M. oryzae*, utilizando microscópio Nikon Eclipse 80i com epi-fluorescência em calcufluor 0,1% (Sigma).

Nos testes de germinação de conídios e formação de apressórios de *M. oryzae* na presença do filtrado de *S. oryzae* foram analisadas as seguintes variáveis: média de conídios com tubo germinativo formado, média de conídios deformados e a média de apressórios formados ao longo dos tempos estabelecidos. Consequentemente foi possível calcular a porcentagem de inibição da formação do tubo germinativo e de apressórios de *M. oryzae* por filtrado de *S. oryzae*.

3.2.5 Variabilidade genética dos isolados de *Sarocladium oryzae*

Para a obtenção do DNA genômico de *S. oryzae*, os 28 isolados da CFMMCNPAP foram cultivados em meio de cultura BDA por sete dias em condições controladas (temperatura de 25 °C e umidade de 80%). Após este período o micélio foi removido para extração do DNA seguindo o protocolo proposto por Dellaporta et al. (1983). O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 2000) em comprimento de onda (λ) igual a

260 nanômetro (nm) e diluído para concentração 100 nanogramas (ng/μL) (Ayyadurai et al, 2005).

A amplificação do DNA foi obtida em reação de cadeia de polimerase (PCR) com kit Qiagen® PCR Multiplex utilizando-se primers oligonucleotídeos (Tabela 1) que produzem RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) em fungos filamentosos (Bridge et al., 1997).

Tabela 1. Sequências dos primers oligonucleotídeos selecionados para a amplificação do DNA de *Sarocladium oryzae* pela reação de PCR.

Primer	Sequências
CAT	5'-CAT CAT CAT CAT CAT-3'
GF	5'-TCC TCC TCC TCC TCC-3'
MR	5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'
RY	5'-CAG CAG CAG CAG CAG-3'

O DNA foi amplificado em termociclador (ESCO Swift.MaxPro) com um ciclo de denaturação inicial de 95°C por 30''; 30 ciclos de denaturação (95°C/1'), anelamento (42°C/1') e extensão (72°C/1') e realizada extensão final a 72°C por 10'. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1%), corado com SYBR Green e adicionado à solução tampão TBE 0,5x com a utilização de um marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

O gel foi visualizado e documentado em transiluminador de luz ultravioleta e a genotipagem foi transformada em valores binários para as bandas visualizadas em cada linha, considerando, 1 (presença) e 0 (ausência) de bandas. Utilizando-se o programa NTSYS-PC (Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs) (Rohlf, 2000), foi construída uma matriz de dissimilaridade genética, utilizando a distância genética de Nei (1972) e, posteriormente, gerando um dendograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetical Average).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização morfológica dos isolados de *Sarocladium oryzae*

Pela caracterização quanto à coloração das colônias, os isolados de *S. oryzae* foram divididos em três grupos, sendo estes representados pelas cores, rosa claro, alaranjado claro e alaranjado. O maior deles, foi o de colônias de cor rosa claro, com doze isolados. A cor alaranjado claro, apresentou nove representantes e a cor alaranjado, apenas sete (Tabela 2). Foi possível verificar a variabilidade morfológica quanto ao atributo cor das colônias dos isolados de *S. oryzae* avaliados (Figura 2).

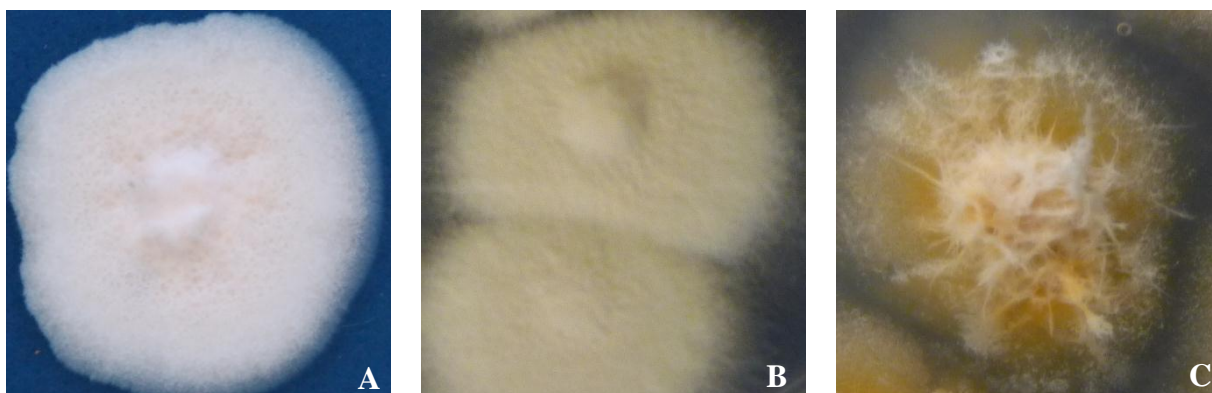


Figura 2. Variabilidade morfológica quanto à coloração das colônias de isolados de *S. oryzae*, representada pelas cores: (A) Rosa claro; (B) Alaranjado claro e (C) Alaranjado.

Quanto a textura formou-se dois grupos, o maior grupo foi representado por colônias cotonosas e o outro, com apenas três isolados de textura aérea. O diâmetro das colônias após o crescimento de 14 dias com proposto por Mew e Gonzales (2002) foi menor (3,45 x 3,64 cm) no isolado So 01 e maior (9 x 9 cm) no isolado Am 11.

Os isolados So 23 e So 31 apresentaram menor valor, 1,05 μm , de espessura média das hifas, enquanto que os maiores medições foram verificadas nos isolados So 03 e Am 11, os quais mediram 2,36 e 2,42 μm respectivamente. Em relação à variação de espessura das hifas,

Tabela 2. Caracterização de isolados de *S. oryzae* cor, textura das colônias, diâmetro das colônias, média da espessura das hifas, variação de espessura das hifas, média do comprimento dos conídios e variação do comprimento dos conídios.

Isolados	Cor	Textura das colônias	Diâmetro das colônias (cm)	Média da espessura das hifas (μm)	Varição da espessura das hifas (μm)	Média do tamanho dos conídios (μm)	Varição do tamanho dos conídios (μm)
So 01	Alaranjado claro	Cotonosa	3,45 x 3,64	1,90	1,34 - 2,53	5,06	3,32 - 9,95
So 02	Alaranjado	Cotonosa	5,37 x 5,36	1,78	1,04 - 3,22	5,22	2,44 - 7,61
So 03	Alaranjado Claro	Cotonosa	4,48 x 4,53	2,36	1,06 - 3,28	4,95	3,59 - 6,53
So 04	Rosa claro	Cotonosa	3,71 x 3,59	1,95	0,82 - 3,39	4,21	3,07 - 5,56
So 05	Rosa claro	Cotonosa	5,67 x 5,75	1,68	0,96 - 2,44	4,12	2,20 - 6,84
So 06	Alaranjado	Aérea	3,50 x 3,70	1,32	0,81 - 2,14	5,83	3,80 - 8,70
So 07	Rosa claro	Cotonosa	6,03 x 5,93	1,43	0,8 - 2,84	5,33	3,62 - 8,21
So 08	Alaranjado claro	Cotonosa	4,04 x 4,09	1,25	0,79 - 1,82	5,23	4,12 - 6,33
So 09	Alaranjado claro	Cotonosa	3,53 x 4,03	1,34	0,58 - 1,96	4,52	2,66 - 6,08
So 10	Alaranjado	Aérea	4,36 x 5,06	1,83	1,21 - 3,87	6,24	4,17 - 8,04
So 12	Alaranjado claro	Cotonosa	4,14 x 3,79	1,58	0,87 - 2,63	5,05	4,05 - 6,17
So 13	Alaranjado claro	Cotonosa	3,47 x 3,52	1,76	0,97 - 2,77	5,32	4,03 - 6,56

Continua...

Tabela 2. Continuação.

So 14	Rosa claro	Cotonosa	3,82 x 3,37	1,55	0,86 - 2,51	5,01	2,98 - 6,47
So 15	Rosa claro	Cotonosa	4,13 x 4,20	1,50	0,69 - 2,59	5,13	3,52 - 6,74
So 16	Rosa claro	Cotonosa	4,13 x 4,34	1,59	0,91 - 2,63	5,57	3,37 - 8,53
So 17	Rosa claro	Cotonosa	3,83 x 3,78	1,52	1,01 - 2,28	4,5	2,86 - 7,56
So 20	Rosa claro	Cotonosa	5,26 x 5,52	1,51	1,07 - 2,43	5,7	4,96 - 6,63
So 23	Alaranjado	Cotonosa	5,62 x 5,52	1,05	0,75 - 2,16	6,36	4,14 - 8,27
So 24	Alaranjado claro	Cotonosa	4,26 x 3,96	1,55	0,87 - 2,95	6,04	4,34 - 7,37
So 25	Rosa claro	Cotonosa	3,69 x 3,76	1,92	1,17 - 3,12	5,55	4,09 - 7,71
So 26	Alaranjado claro	Cotonosa	3,85 x 3,93	1,23	0,57 - 2,59	5,48	4,19 - 7,07
Sa 27	Rosa claro	Cotonosa	3,27 x 3,29	1,84	1,02 - 3,07	4,76	3,61 - 6,22
Sa 29	Alaranjado claro	Cotonosa	4,76 x 4,95	1,66	1,13 - 2,83	4,5	3,00 - 7,71
So 30	Alaranjado	Cotonosa	6,39 x 6,43	1,51	1,07 - 3,06	4,48	3,44 - 6,66
So 31	Rosa claro	Cotonosa	5,36 x 4,92	1,05	0,80 - 2,16	4,98	2,25 - 7,35
Sa A	Rosa claro	Cotonosa	4,52 x 4,68	1,46	0,86 - 2,52	4,90	3,80 - 6,18
53 B	Alaranjado	Cotonosa	3,98 x 4,22	1,45	0,70 - 2,19	6,32	4,77 - 7,88
Am 11	Alaranjado	Aérea	9 x 9	2,42	0,80 - 3,75	4,45	2,65 - 6,39

a menor variação, foi observada no isolado So 08, variando de 0,79 - 1,82 μm (1,03 μm) enquanto a maior variação foi de 2,95 (0,8 - 3,75 μm) no isolado Am 11.

Houve variação quanto ao tamanho médio dos conídios, sendo os isolados So 05 e So 04 os que apresentaram as menores médias, 4,12 e 4,21 μm respectivamente. Os isolados So 23, 53B e So10 apresentaram os maiores tamanhos de conídios, com médias de, 6,36, 6,32 e 6,24 μm respectivamente. O isolado So 01 foi o que apresentou a maior variação nas medições dos conídios, observando uma diferença de 6,63 μm , ou seja, apresentou um comprimento variando entre 3,32 e 9,95 μm , enquanto o isolado So 20 teve uma diferença menor, 1,67 μm , variando entre 4,96 e 6,63 μm .

Segundo Bernal et al. (2002) as cores das colônias de *S. oryzae* cultivadas em meio BDA são da cor rosa pálido. Cordona (2013) relatou que as colônias de *S. oryzae* variam de cor, de esbranquiçadas a alaranjadas em meio BDA. O resultados deste trabalho, quanto ao atributo cor das colônias, coincidem como dos trabalhos relatados, pois foi possível observar colônias tanto da cor rosa, quanto da cor alaranjada.

Bills et al. (2004) observaram que isolados de *S. oryzae* cultivados em meio BDA e ágar-extrato de malte formaram conídios hialinos, lisos, asseptados, de formato elipsoidal a pouco cilíndrico, variando de 3 μm a 8 μm de comprimento. Mew e Gonzales (2002) verificaram diferenças no tamanho de conídios quando cultivados em três meios de cultura, sendo que os valores mensurados foram próximos aos verificados por Bills et al. (2004). Neste estudo, os conídios apresentaram também tais características descritas pelos autores acima, sendo que a variação do comprimento dos conídios difere dos valores mencionados, algumas vezes é menor que 3 μm e outras maiores que 8 μm (Tabela 2).

Quanto a presença de conídios de *S. oryzae* com comprimento superior ao padrões encontrados, Couto & Menezes (2004) também observaram tal relação em isolados de *Colletotrichum musae*. Estes autores atribuíram a ocorrência de segregação genética na proporção de 3:1 (três conídios de tamanho normal e um conídio fora do tamanho tipo padrão). E inferiram que tais fatores podem estar relacionados com a condição nuclear dos conídios, sendo um comportamento variável de acordo com o ambiente de cultivo da espécie. Portanto, estes fatores podem também ter influenciado no tamanho dos conídios de *S. oryzae* avaliados neste estudo.

Bills et al. (2004) relataram a formação de dois tipos de hifas, hifa filamentosa, que ocorreu em todas as colônias com aproximadamente 2 μm de espessura, pouco septada e hialinas e hifas aéreas com aproximadamente 3,5 μm de espessura, densamente septadas e de formato contorcido. Foi possível observar que esta descrição se repetiu neste estudo, sendo as hifas filamentosas caracterizadas como hifas ramificadas e também presente na maioria das colônias. As hifas aéreas receberam denominação de hifas septadas e foram pouco frequentes.

Mew e Gonzales (2002) observaram que colônias de *S. oryzae* incubadas por 14 dias em meio BDA apresentaram crescimento máximo de 4,33 cm. Bernal et al. (2002) compararam o crescimento de *S. oryzae* em cinco meios de cultura (BDA, ágar Sabouraud dextrose, ágar Czapek-Dox, ágar extrato de malte e ágar extrato de arroz) em colônias com 15 dias e observaram que o menor crescimento das colônias de *S. oryzae* foi em meio BDA, 3,5 cm, enquanto que no meio ágar extrato de malte, as colônias alcançaram crescimento de 5,1 cm. Shahjahan et al. (1977) afirmaram que o crescimento de *S. oryzae* é lento em meio de cultura BDA, podendo atingir de 3 cm a 3,5 cm de diâmetro após 10 dias de incubação a 28°C. O crescimento das colônias de *S. oryzae*, apesar de que, a maioria dos isolados analisados neste trabalho terem crescimento superior aos descritos anteriormente, também pode ser considerado lento. Já que, apenas o isolado Am 11 foi capaz de desenvolver em toda placa.

O pH do meio de cultura e a temperatura de incubação podem ter influenciado o crescimento das colônias de *S. oryzae*. Estas interferências no crescimento já foram observadas em muitos microrganismos e ainda não foram relatadas no desenvolvimento de colônias de *S. oryzae*. Perante à isto, há necessidade de estudos com este microrganismo em diferentes estímulos físico-químicos com o objetivo de avaliar o potencial de crescimento de *S. oryzae* sob diferentes condições de pH e temperatura.

3.3.2 Variabilidade dos isolados de *Sarocladium oryzae* quanto à produção de cerulenina

Dos 28 isolados de *S. oryzae* analisados, 11 isolados não produziram teores de cerulenina detectáveis em HPLC (Tabela 3). No total, 60% dos isolados (17 isolados) produziram cerulenina em níveis detectáveis pela técnica utilizada. O isolado So 03, foi o que produziu cerulenina em maior quantidade, 296 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cerulenina.

Tabela 3. Produção de cerulenina por isolados de *S. oryzae*.

Isolados	Quantidade de cerulenina* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
So 01	ND
So 02	20,0 defgh
So 03	296,0 a
So 04	14,6 efgh
So 05	ND
So 06	7,5 gh
So 07	ND
So 08	ND
So 09	122,3 b
So 10	ND
So 12	53,8 cde
So 13	55,5 cd
So 14	64,5 c
So 15	5,2 h
So 16	48,9 cdef
So 17	52,0 cdef
So 20	13,2 fgh
So 23	ND
So 24	ND
So 25	26,5 cdefgh
So 26	46,1 cdefg
So 27	27,8 cdefgh
So 29	ND
So 30	ND
So 31	5,2 h
So A	38,3 cdefgh
53B	ND
Am 11	ND

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ¹ND: Não detectável

Os cromatógrafos (Figura 3) apresentaram dois picos de expressão da cerulenina, sendo um relativo ao tempo de retenção da cerulenina em 6,46 minutos e o outro do produto de degradação da cerulenina em 6,26 minutos.

Omura (1976) atribui à presença de dois picos nos cromatógrafos à instabilidade da cerulenina em solventes orgânicos. Sakthivel et al. (2002) reforçaram que estes dois picos devem ter o mesmo espectro ultravioleta com um padrão de cerulenina, para comprovar que tais características são comuns à molécula.

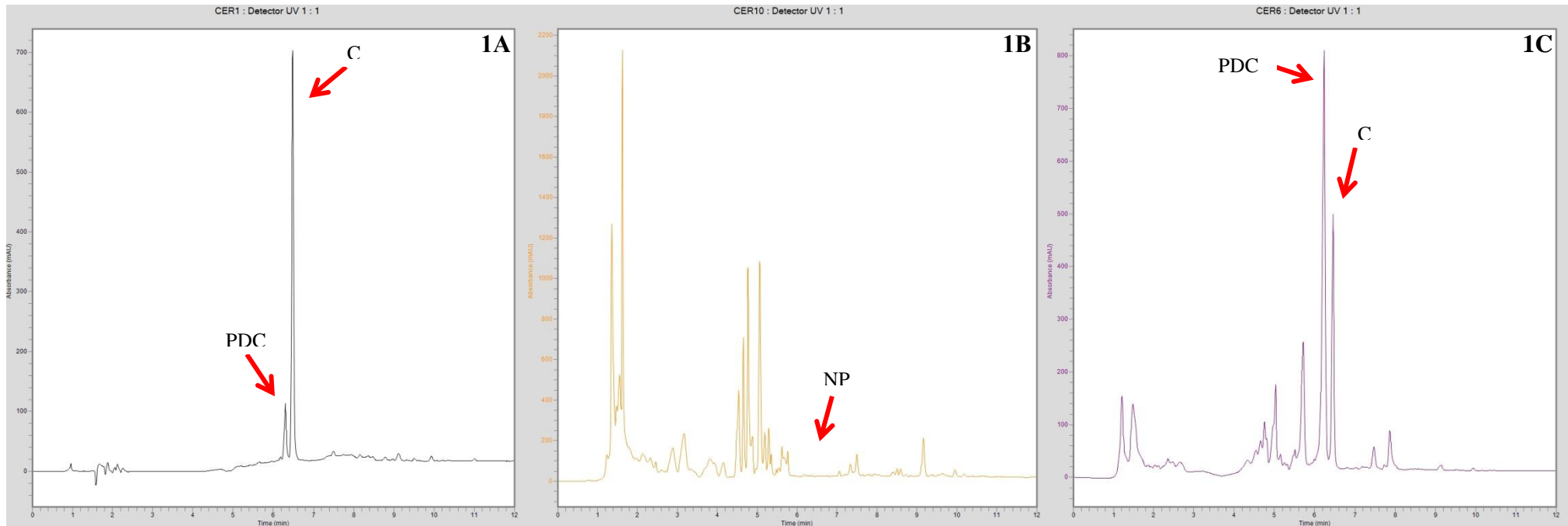


Figura 3.

Cromatograma (1A) Padrão de cerulenina (Sigma) exibindo dois picos, de produto de degradação da cerulenina (PDC) em 6,26 minutos e cerulenina (C) em 6,46 minutos; (1B) Amostra que não produz cerulenina (NP), exibindo a ausência de picos entre 6,26 e 6,46 minutos e (1C) Amostra que produz cerulenina, mostrando como na amostra padrão dois picos, de produto de degradação da cerulenina (PDC) em 6,26 minutos e cerulenina (C) em 6,46 minutos.

Omura (1976) atribui à presença de dois picos nos cromatógrafos à instabilidade da cerulenina em solventes orgânicos. Sakthivel et al. (2002) reforçaram que estes dois picos devem ter o mesmo espectro ultravioleta com um padrão de cerulenina, para comprovar que tais características são comuns à molécula.

A presença de dois picos de cerulenina nos cromatógrafos é uma característica da molécula que foi observada por diversos autores (Omura, 1976; Sakthivel et al., 2002; Bills et al., 2004) enquanto que o tempo de retenção variou entre estes trabalhos. Isto não implica erro, pois o uso de um padrão da cerulenina é que ira mostra a expressão ativa da cerulenina em cada observação. Bills et al. (2004) inferiram ainda que isolados armazenados a mais de quarenta anos, ainda são capazes de produzir cerulenina.

3.3.4 Inibição *in vitro* de *Sarocladium oryzae* aos principais patógenos fúngicos de arroz

Foi verificado antagonismo entre isolados de *S. oryzae* e os patógenos avaliados. Observou a formação de cinco grupos no pareamento de *S. oryzae* x *M. oryzae*, quatro grupos entre *S. oryzae* x *C. miyabeanus* e três grupos entre *S. oryzae* x *M. albescens* e *S. oryzae* x *T. cucumeris*. O número de isolados dentro de cada grupo variou conforme o patógeno pareado com *S. oryzae* (Tabela 4).

Na avaliação do antagonismo *in vitro* entre isolados de *S. oryzae* x *M. oryzae* houve a formação de cinco grupos, com destaque para o isolado So 29, que separadamente compôs o grupo 1, diferindo dos demais isolados, apresentando o maior halo de inibição, medindo, 13,28 mm. O segundo constitui-se por cinco isolados (So 04, So 06, So 09, So 24 e So 25), com halos variando de 8,62 mm a 10,09 mm. O terceiro grupo foi formado por quatro isolados (So 12, So 15, So 26 e So A) e os valores de inibição variaram de 6,07 mm a 7,87 mm. O quarto grupo contou com sete isolados (So 03, So 05, So 08, So 13, So 14, So 27 e 53B) e os valores do halo de inibição variaram de 2,33 mm a 4,76 mm. O último grupo, com halos variando de 0,12 a 1,72 mm foi composto por dez isolados (So 02, So 07, So 10, So 16, So 17, So 20, So 23, So 30, So 31 e Am 11) (Tabela 4).

O antagonismo *in vitro* entre isolados de *S. oryzae* x *C. miyabeanus* formou quatro grupos. O grupo 1 foi constituído por oito isolados que apresentaram os maiores halos de inibição. Neste grupo estão os isolados So 08, So 12, So 13, So 14, So 15, So 25, So 27 e So

29, com halos variando de 10,77 mm a 13,76 mm. Um segundo grupo foi formado também por oito isolados, sendo eles So 03, So 07, So 09, So 16, So 24, So 26, So A e So 53B, com halos variando de 8,10 mm a 9,76 mm. O terceiro grupo contou com quatro isolados (So 01, So 04, So 20 e So 31) com halos variando de 5,58 a 7,51 mm e o quarto e último grupo apresentou os menores halos de inibição (0,43 a 1,27 mm) com sete isolados de *S. oryzae* (So 05, So 06, So 10, So 17, So 23, So 30 e Am 11) (Tabela 3).

Tabela 4. Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos do arroz por isolados de *S. oryzae*.

Isolados	<i>Cochliobolus</i>	<i>Magnaporthe</i>	<i>Monographella</i>	<i>Thanatephous</i>
	<i>miyabeanus</i>	<i>oryzae</i>	<i>albescens</i>	<i>cucumeris</i>
Halo de inibição (mm)*				
So 01	7,16 c	3,55 d	7,20 b	0,28 c
So 02	0,76 d	0,25 e	0,66 c	0,00 c
So 03	9,27 b	3,87 d	2,31 c	2,29 c
So 04	7,18 c	9,10 b	8,03 a	1,75 c
So 05	0,64 d	3,61 d	0,52 c	0,00 c
So 06	0,63 d	8,62 b	3,79 c	0,00 c
So 07	8,25 b	0,31 e	1,50 c	0,00 c
So 08	11,92 a	3,47 d	3,98 b	0,64 c
So 09	9,76 b	9,60 b	9,12 a	0,00 c
So 10	0,43 d	0,12 e	0,63 c	0,00 c
So 12	10,77 a	6,61 c	8,07 a	5,47 b
So 13	12,34 a	4,76 d	7,58 b	5,37 b
So 14	11,96 a	4,20 d	2,70 c	0,00 c
So 15	13,01 a	7,34 c	8,50 a	5,45 b
So 16	9,01 b	0,87 e	5,63 b	0,47 c
So 17	0,87 d	0,32 e	0,43 c	0,00 c
So 20	7,51 c	1,13 e	9,00 a	1,25 c
So 23	0,53 d	0,95 e	2,50 c	0,00 c
So 24	8,98 b	9,30 b	9,02 a	0,46 c
So 25	11,91 a	10,09 b	6,19 b	5,67 b
So 26	8,28 b	7,87 c	8,58 a	2,87 c
So 27	13,55 a	3,72 d	5,09 b	1,00 c
So 29	13,76 a	13,28 a	10,29 a	8,69 a
So 30	0,48 d	0,87 e	0,95 c	0,00 c
So 31	5,58 c	1,72 e	1,62 c	1,15 c
So A	9,37 b	6,07 c	10,29 a	0,54 c
53B	8,10 b	2,33 d	6,58 b	0,35 c
Am 11	1,27 d	0,13 e	1,04 c	0,00 c
Controle	0,00 d	0,00 e	0,00 c	0,00 c

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

A verificação do antagonismo entre isolados de *S. oryzae* e *M. albescens* formou três grupos. O grupo 1 (So 04, So 09, So 12, So 15, So 20, So 24, So 26, So 29 e So A) foi o que apresentou os maiores halos de inibição contra *M. albescens*, variando de 8,03 mm a 10,29 mm. O segundo grupo com sete isolados (So 01, So 08, So 13, So 16, So 25, So 27 e 53B) formou halos entre 3,98 mm e 7,58 mm e terceiro grupo composto com os menores valores halos de inibição, de 0,43 mm a 3,79 mm foi constituído com 12 isolados (So 02, So 03, So 05, So 06, So 07, So 10, So 14, So 17, So 23, So 30, So 31 e Am 11) (Tabela 4).

Finalmente, na constatação do antagonismo entre *S. oryzae* e *T. cucumeris*, foi observado visto que o maior halo inibição foi de 8,69 mm, formado pelo pareamento com o isolado So 29, que formou sozinho o grupo 1. O segundo grupo apresentou halos entre 5,37 mm e 5,67 mm e foi representado por quatro isolados (So 13, So 15, So 12 e So 25). O último grupo foi o que apresentou o maior número de isolados, 22 no total, e com tamanho de halos variando entre 0 e 2,87 mm. Neste último grupo pode-se considerar que não houve antagonismo entre alguns isolados de *S. oryzae* (So 02, So 05, So 06, So 07, So 09, So 10, So 14, So 17, So 23 e So 30) contra *T. cucumeris*, pois não houve a formação de halo de inibição (Tabela 4).

Entre os quatro grupos de patógenos avaliados contra *S. oryzae* foi possível observar correlação significativa entre os grupos. Entre o grupo *C. miyabeanus* e *M. oryzae* há correlação de 0,53, entre *C. miyabeanus* e *M. albescens* de 0,67, entre *C. miyabeanus* e *T. cucumeris* de 0,6, entre *M. oryzae* e *M. albescens* de 0,7, entre *M. oryzae* e *T. cucumeris* de 0,61 e entre *M. albescens* e *T. cucumeris* de 0,52. O maior valor de correlação observado está entre *M. oryzae* e *M. albescens*.

Pelos resultados apresentados (Tabela 4), é possível observar que os isolados de *S.oryzae* apresentaram variabilidade quanto ao potencial antagônico, apresentando níveis de antagonismos variáveis conforme o patógeno pareado, com exceção para o isolado So 29 o qual apresentou potencial antagônico aos quatro patógenos avaliados, apresentado os maiores halos de inibição. O isolado So 29 (Figura 4) foi isoladamente o melhor antagonista *in vitro* contra *M. oryzae* e *T. cucumeris* e no pareamento com *C. miyabeanus* e *M. albescens* compôs o grupo dos melhores antagonistas.

Os resultados apresentados indicam que o antagonismo *in vitro* entre os isolados de *S. oryzae* e os patógenos avaliados, não é devido à ação apenas da cerulenina. Pois, o isolado So 29, que apresentou os maiores halos de inibição para os patógenos avaliados, não produziu cerulenina a níveis detectáveis conforme verificado (item 3.3.3, tabela 2).

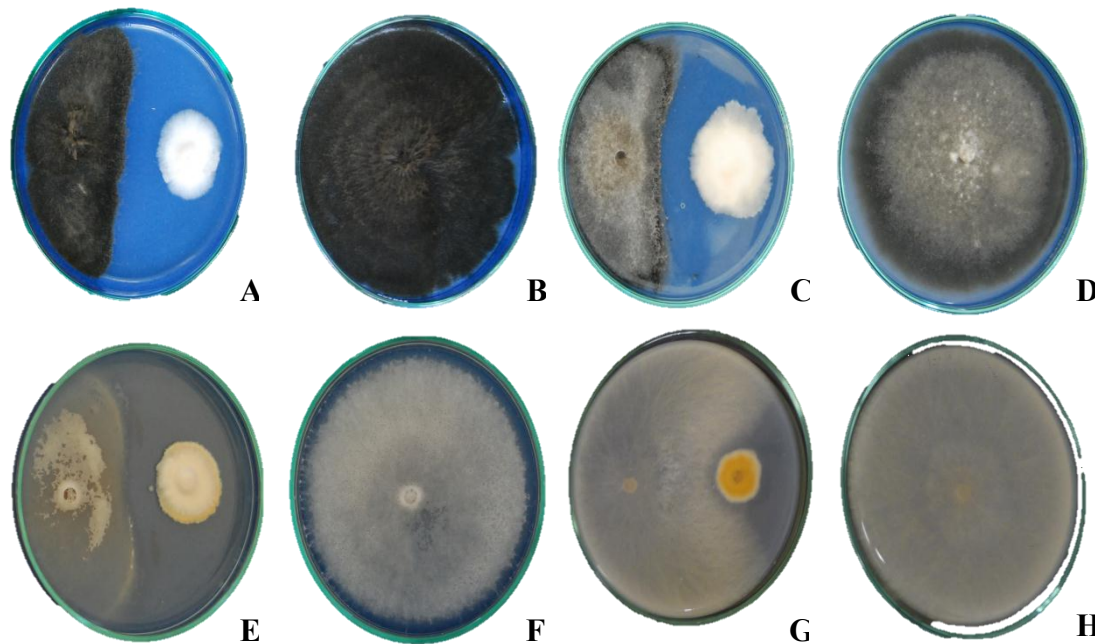


Figura 4. Antagonismo de So 29 e testemunha de cada patógeno. (A) So 29 x *C. miyabeanus*; (B) *C. miyabeanus*; (C) So 29 x *M. oryzae*; (D) *M. oryzae*; (E) So 29 x *M. allbescens*; (F) *M. allbescens*; (G) So 29 x *T. cucumeris* e (H) *T. cucumeris*.

E ainda, foi possível observar (dados não apresentados) que este isolado, So 29, produz outro metabólito secundário, o ácido helvólico (Tschen & Wen, 1980, Tschen et al., 1997) e que a melhor atividade antagonista deste isolado pode estar ligada a presença deste metabólito como verificado por Gnanamanickam & Mew (2001). Entretanto, o isolado So 03, que produziu a maior quantidade de cerulenina, não compõe o melhor grupo para nenhum dos patógenos aqui estudados, e ainda no paramento entre *S. oryzae* x *M. allbescens* e *S. oryzae* x *T. cucumeris*, este isolado ficou no último grupo. Assim, há a hipótese que outros mecanismos, ou compostos estejam envolvidos no antagonismo *in vitro* entre *S. oryzae* contra os patógenos pareados.

Garcia et al. (2003) observaram que isolados de *S. oryzae* são capazes de produzir proteínases *in vitro* usando como substrato azocaseína, e que estas proteases podem inibir o crescimento de outros fungos, fato este que também pode estar associado a ação antagonista observada por isolados de *S. oryzae*. Omura et al. (1986), Gnanamanickam & Mew (2001) e Prabhu et al. (2007) relataram ação antagônica de *S. oryzae* sob *M. oryzae*, sendo *S. oryzae* responsável por inibir o crescimento micelial deste patógeno. Silva et al. (2007) constataram *in vivo* e *in vitro* o antagonismo de *S. oryzae* contra *M. oryzae* porém não identificaram a causa deste efeito. Cortês et al. (2014) definiram que a ação *in vitro* do efeito antagônico de *S. oryzae* sob *M. oryzae* é o metabólito extracelular com característica apolar, a cerulenina.

Neste estudo, acredita-se que a cerulenina não seja a única molécula responsável pela ação antagônica, pois em assim sendo, o isolado So 03 estaria entre as isolados que apresentaram os maiores halos de inibição *in vitro*, o que foi observado com o isolado So 29, o qual não produziu cerulenina em níveis detectáveis. Diante do exposto, a ação antagonista observada por *S. oryzae* aos quatro patógenos, pode ser uma antibiose direta, pela produção de metabólitos secundários ou enzimas líticas no meio de cultura, fato este, que pode impedir e/ou restringir o crescimento dos patógenos, conforme observado por Bettioli & Ghini (1995) e Benítez et al. (2004), estudando outros ACB.

Gnanamanickam & Mew (2001) mostraram haver ação antagônica *in vitro* de *S. oryzae* contra *T. cucumeris*, observando sensibilidade de *T. cucumeris* na presença de *S. oryzae*. Os mesmos autores avaliaram colmos de plantas de arroz e concluíram que *S. oryzae* inibiu o crescimento micelial e atrasou a formação de escleródios de *T. cucumeris*. E que tal inibição provavelmente ocorreu devido à presença da cerulenina produzida por *S. oryzae*. Neste trabalho, o crescimento dos escleródios foi desuniforme entre as repetições, não sendo possível concluir a ocorrência de atraso na formação dos escleródios.

Halfeld-Viera et al. (2002) afirmaram que o uso de teste de antibiose e antagonismo *in vitro* proporcionam apenas informações adicionais importantes, mas não podem ser empregados isoladamente, como um critério de seleção para um antagonista *in vivo*. Estes testes apresentam resultados muito artificiais, ao mesmo tempo em que não conseguem pré-estabelecer qual é a relação entre o antagonista-patógeno-hospedeiro em condições naturais. Porém, estes ensaios devem ser realizados para adicionar informações sobre o antagonista e não devem ser omitidos.

3.3.5 Efeito do filtrado de *S. oryzae* sobre a germinação de conídios e a formação de apressório de *Magnaporthe oryzae*

Os filtrados de So 03 e So 29 interferiram na germinação de conídios e formação de apressórios de *M. oryzae* e se diferiram do tratamento controle (Figura 5). Inicialmente, nas avaliações feitas até 3 horas após o tratamento, tanto o filtrado de So 03 quanto o de So 29 retardaram a formação do tubo germinativo.

O tratamento com o filtrado de So 03 inibiu em 89,5% a formação de apressórios enquanto que com o filtrado de So 29 a inibição foi de 85%. Observou-se ainda, que conídios de *M. oryzae* quando na presença dos filtrados de So 03 e So 29 além de não formarem apressórios apresentaram deformação na estrutura dos conídios, sendo observados 32% e 20%, de conídios deformados, respectivamente. No tratamento testemunha não houve conídios deformados (Figura 6).

Em condições semelhantes à deste trabalho, Côrtes et al. (2014) verificaram inibição *in vitro* na germinação de conídios e na formação de apressórios de *M. oryzae* quando tratados com extrato bruto de *S. oryzae* contendo cerulenina. Ohtake et al. (1999) atribuíram que com o aumento das concentrações de cerulenina, ocorre a redução na formação de apressórios de *M. oryzae*, e que esta resposta está ligada ao fato da cerulenina ser um inibidor da síntese de lipídeos. Para Ebbolle (2007) a síntese de lipídeo é um dos principais componentes necessários para a germinação de conídios e formação de apressórios. Thines et al. (2004) observaram que a cerulenina tem propriedades bioquímicas que impedem a formação de apressórios de *Magnaporthe oryzae*.

Neste trabalho, ambos os isolados de *S. oryzae*, So 03 e So 29, apresentaram ação sobre os processos iniciais de infecção da brusone. Wilson & Talbot (2009) descreveram que os conídios de *M. oryzae* após aderirem a um substrato ou na presença de água livre (Bourett & Howard, 1990; Hamer et al., 1988) começam a emitir o tubo germinativo, e este irá se prender ao hospedeiro havendo diferenciação das células e formação do apressório e, conseqüentemente dar-se-á a penetração nos tecidos foliares que resultará na doença.

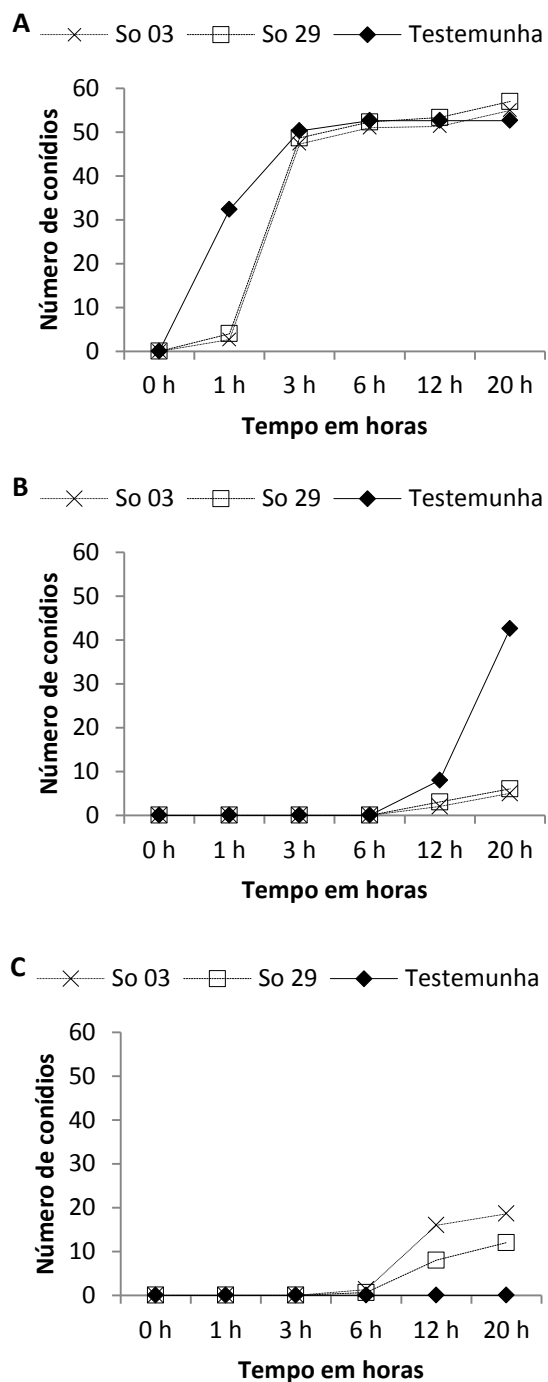


Figura 5. Ação dos filtrados de *S. oryzae* dos isolados So 03 e So 29 sobre o desenvolvimento conídios de *M. oryzae*. (A) Número de conídios de *M. oryzae* com tubo germinativo formado, (B) Número de conídios de *M. oryzae* com apressórios formados e (C) Número de conídios de *M. oryzae* deformados.

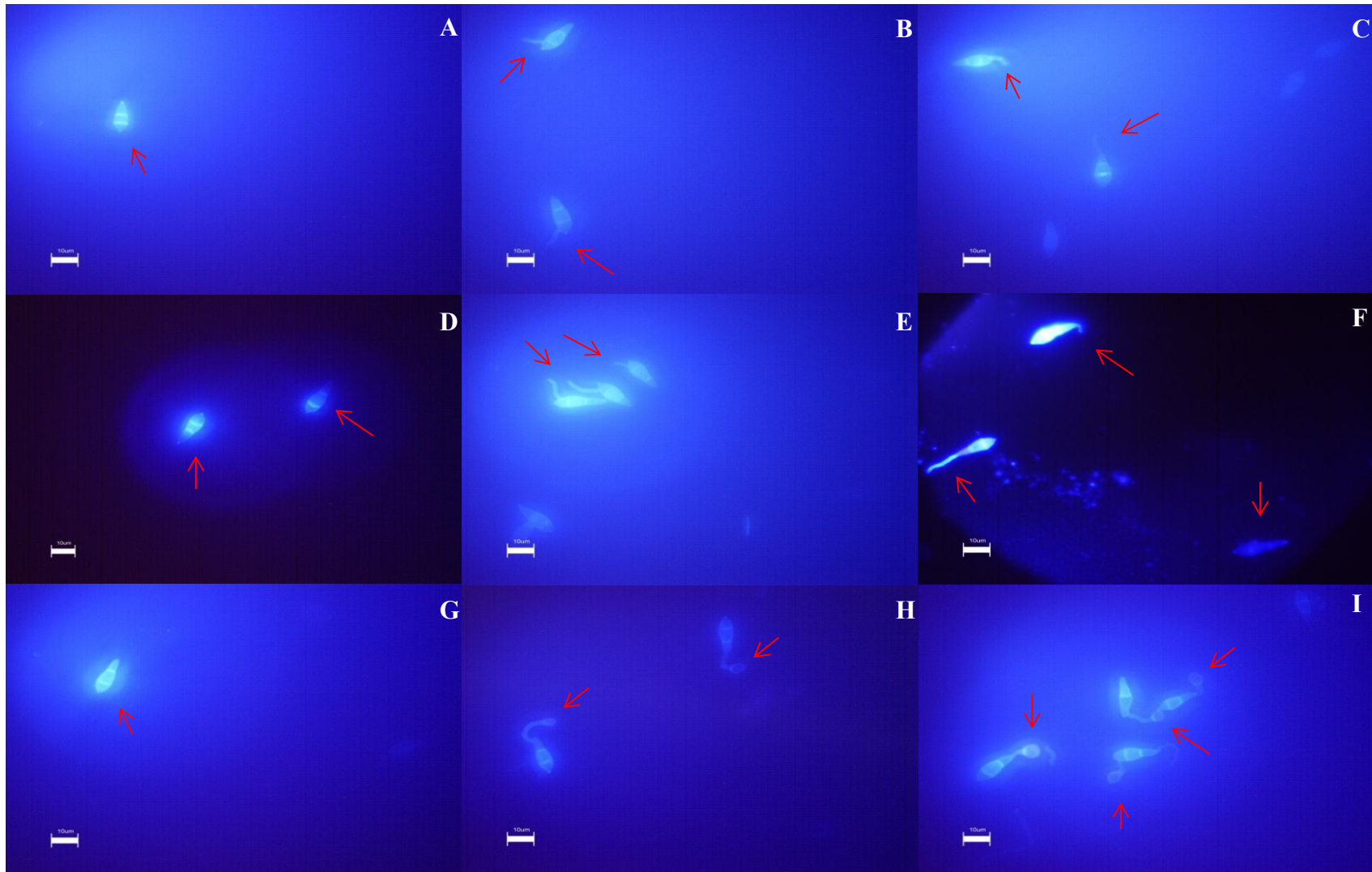


Figura 6. Efeito do filtrado de *S. oryzae* na germinação e formação de apressórios de conídios de *M. oryzae*. (A) 0 hora/ So 03; (B) 12 horas/ So 03; (C) 20 horas/ So 03; (D) 0 hora/ So 29; (E) 12 horas/ So 29; (F) 20 horas/ So 29; (G) 0 hora/ *M. oryzae*; (H) 12 horas/ *M. oryzae* e (I) 20 horas/ *M. oryzae*.

Estes filtrados, ao atrasarem, reduzirem ou inibirem a formação e a germinação dos conídios, conseqüentemente podem atuar na redução da severidade da brusone. Khan & Hsiang (2003) afirmaram que a ausência da formação de apressórios de um fitopatógeno pode auxiliar no controle da doença, pois o apressório é uma estrutura de infecção especializada que se forma a partir de uma hifa ou tubo germinativo, o qual é importante no processo de penetração do fungo através da superfície foliar do hospedeiro. Portanto, sem a penetração do fitopatógeno na célula da planta hospedeira não há o estabelecimento das relações parasitárias estáveis e conseqüentemente tem-se a ausência e/ou a redução da doença.

3.3.6 Variabilidade genética dos isolados de *Sarocladium oryzae*

Os primers Saro-RY e Saro-CAT não amplificaram o DNA dos isolados de *S. oryzae*. Os primers Saro-GF e Saro-MR foram capazes de agrupar os indivíduos de *S. oryzae*, que apresentaram os mesmos padrões de amplificação, seguido de determinação do coeficiente de dissimilaridade. O polimorfismo entre os isolados variou entre 0 - 0,58 (Figura 7), sendo possível observar que a maior diferença entre os grupos foi de 0,58 para um valor máximo de 1.

Houve a formação de 12 grupos entre os isolados de *S. oryzae* com o coeficiente de dissimilaridade de 0,58 e estes podem ser agrupados da seguinte forma: grupo 1: So 01, So 10, So 17 e Am11; grupo 2: So 09; grupo 3: 53B; grupo 4: So 05, So 08, So 30 e So 16; grupo 5: So 14 e So 24; grupo 6: So 02, So 06, So 23 e So A; grupo 7: So 03; grupo 8: So 04 e So 27; grupo 9: So 25; grupo 10: So 31; grupo 11: So 12, So 13, So 15 e So 26 e grupo 12: So 20. Os grupos 1, 4, 6 e 11 apresentaram maior número de indivíduos dentro do grupo, tendo cada um quatro isolados de *S. oryzae*.

A variabilidade molecular de *S. oryzae* até o presente momento só foi estudada uma vez por Ayyadurai et al. (2005) onde foi possível observar em uma população de 32 isolados a formação de 13 grupos. Estes autores apresentaram resultados semelhantes aos deste estudo, utilizando isolados oriundos de três regiões geográficas da Índia enquanto que neste trabalho os isolados foram coletados em uma mesma região geográfica, no município de Santo Antônio de Goiás, Brasil. Ayyadurai et al. (2005) usando os mesmos primers deste trabalho, observaram o coeficiente de similaridade, concluindo que os isolados são diferentes em 0,52.

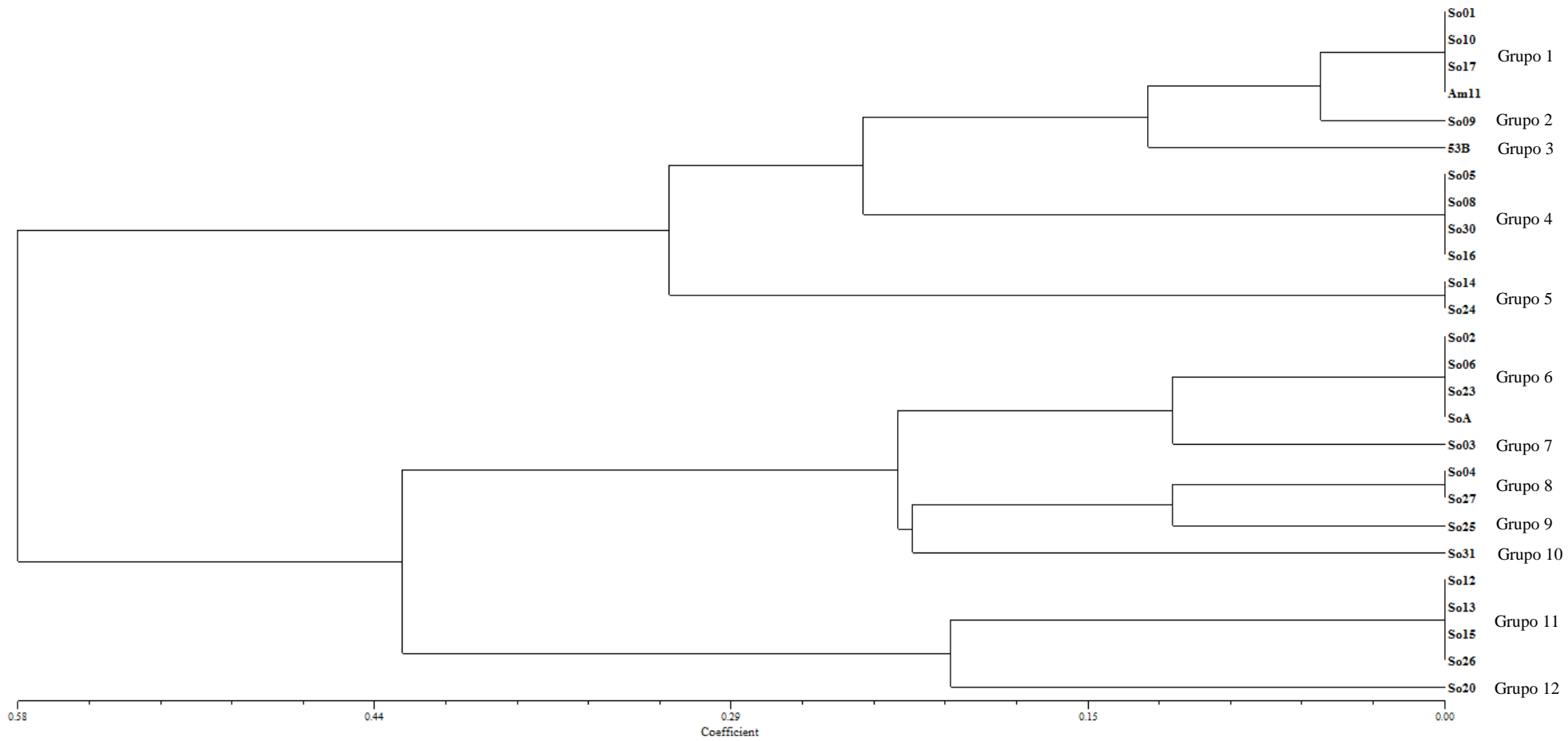


Figura 7. Dendrograma de isolados de *S. oryzae* obtido a partir de coeficiente de dissimilaridade genética através do agrupamento de bandas polimórficas com RAPD em combinação com os primers GF e MR.

Assim, é possível inferir que *S. oryzae* tanto no Brasil quanto na Índia parecem não haver muitas diferenças do DNA deste patógeno.

Havendo semelhanças no coeficiente obtido em estudo no Brasil (0,58) e na Índia (0,52). Portanto, observou-se polimorfismo do DNA em ambos os estudos, sendo que a biogeografia deste patógeno em relação às características genéticas parece variar pouco entre as populações.

Ayyadurai et al. (2005) observaram uma correlação baixa entre a variabilidade genética e a produção de cerulenina. Neste trabalho, há uma correlação muito baixa ($r = 0,45$) entre estas variáveis, podendo atribuir a baixa correlação ao elevado grau de polimorfismo do DNA de *S. oryzae* e a variabilidade na produção da cerulenina por isolados de *S. oryzae*. Corroborando com os resultados deste autor. Onde se observou que alguns isolados produzem altas quantidades de cerulinas e outros em que a produção deste metabólito estava abaixo do nível de detecção, além do alto grau de polimorfismo observado. Por isto, a força e a direção entre estas duas variáveis analisadas é baixa, concluindo que a variabilidade genética e a variabilidade na produção de cerulenina têm comportamentos distintos.

3.4 CONCLUSÕES

Há variabilidade quanto à morfologia dos isolados de *S. oryzae* avaliados.

Ocorre variabilidade genética no DNA da população de *S. oryzae*.

A maioria dos isolados de *S. oryzae* é capaz de produzir cerulenina. O isolado So 03 é o que mais produz cerulenina.

Existe antagonismo *in vitro* entre isolados de *S. oryzae* em relação aos patógenos pareados, *M. albescens*, *C. miyabeans*, *M. oryzae* e *T. cucumeris*. O isolado So 29 foi o melhor antagonista *in vitro*.

Não houve relação entre a produção de cerulenina e o antagonismo *in vitro* aos patógenos avaliados.

Houve variação no antagonismo entre os patógenos pareados contra *S. oryzae*, correlação entre os grupos destes patógenos, sendo que o antagonismo não está relacionado com a produção de cerulenina.

O filtrado de isolados de *S. oryzae*, So 03 e So 29 retardam a germinação dos conídios e inibem a formação de apressórios de *M. oryzae*, sendo So 03 melhor que So 29.

4 SUPRESSÃO DA SEVERIDADE DA BRUSONE FOLIAR EM ARROZ POR *Sarocladium oryzae* E MECANISMOS DE DEFESAS

RESUMO

Magnaporthe oryzae é o agente causal da brusone do arroz, principal doença desta cultura. Este fungo é responsável por perdas de até 100% na produtividade. O controle da doença é feito pelo uso do manejo integrado, onde as principais práticas são o uso de cultivares resistentes e o controle químico. O uso de agentes de biocontrole ou os metabolitos produzidos por estes, pode ser mais uma prática a ser inserida ao manejo integrado, podendo potencializar o controle da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *S. oryzae* na supressão da brusone foliar, investigando o potencial da suspensão de conídios e do filtrado de *S. oryzae* na ativação do mecanismo de defesa das plantas de arroz contra o patógeno *M. oryzae*. Foram utilizadas plantas de arroz da cultivar BRS Primavera, um isolado virulento de *M. oryzae* (Py10.900) e como antagonista o isolado So 03 de *S. oryzae*. As plantas de arroz foram pulverizadas na forma de suspensão de conídios (SC) e filtrado (FI) em várias concentrações, antes e depois da inoculação com *M. oryzae*, definindo assim o melhor momento e a melhor concentração para avaliação da supressão da brusone foliar. Para a quantificação da atividade enzimática e do ácido salicílico-AS, as plantas foram pulverizadas com *S. oryzae* na forma de suspensão de conídios (SC) na concentração de 3×10^5 conídios.mL⁻¹ e filtrado (FI) 100% concentrado dois dias antes da inoculação com *M. oryzae*. A SC reduziu a severidade da brusone foliar em 68,8% e o FI em 75,5%. Os maiores valores de atividade enzimática específica em relação aos controles (plantas inoculadas com água e com *M. oryzae*, somente) foram para LIPOX, às 5 horas com o FI, as 24 e 72 horas para com a SC. A PAL teve expressão às 48 horas com FI e às 72 horas com a SC. A atividade da quitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase e o do fitohormônio ácido salicílico não apresentaram diferenças em relação aos controles. As alterações nas atividades das enzimas-chave, como da LIPOX e PAL indicam a indução de resistência em plantas de arroz tratadas com antagonista *S. oryzae* expostas ao patógeno *M. oryzae*.

Palavras-chaves: *Magnaporthe oryzae*, biocontrole, indução de resistência, atividade enzimática.

SUPPRESSION OF LEAF BLAST SEVERITY RICE BY *Sarocladium oryzae* AND MECHANISM DEFENSES.

ABSTRACT

Magnaporthe oryzae is the causal agent of rice blast disease and the principal of this rice culture. This fungus is responsible for losses up to 100% in productivity. Disease control is done by the use of integrated management, where the main practices are the use of resistant cultivars and chemical control. The use of biocontrol agents or metabolites produced by these, may be more practical to insert the integrated handling and may improve disease control. The objective of this study was to evaluate the potential of conidial suspension and filterat of *S. oryzae* in suppression of severity leaf blast and investigate this potential role in activating the

mechanism of plant defense against *M. oryzae*. Rice plants cultivar BRS Primavera virulent isolate of *M. oryzae* (Py10.900) and isolate So 03 of *S. oryzae* were used. The rice plants were sprayed with spore suspension (SC) and culture filtrate (FI) of *S. oryzae* at various concentrations before and after inoculation with *M. oryzae*, thus defining the best time and the best concentration for evaluation of suppression of leaf blast. For quantification of enzymatic activity and salicylic acid - SA plants were sprayed with spore suspension (CS) 3×10^5 conídios.mL⁻¹ and filtrate (FI) 100% concentrate of *S. oryzae*, two days before inoculation with *M. oryzae*. The SC and FI reduced the severity leaf blast in 68.8% and 75.5%, respectively. The highest specific enzyme activity compared to controls (plants inoculated with water and *M. oryzae*, only) were to LIPOX at 5 hours with F, 24 to 72 hours with the SC. The PAL had expression at 48 hours with FI and at 72 hours with the SC. The expression of chitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase and phytohormone salicylic acid showed no differences compared to controls. Changes in the activities of key enzymes such as PAL and LIPOX indicate the induced of resistance in rice plants treated with antagonist *S. oryzae* exposed to the pathogen *M. oryzae*.

Key words: *Magnaporthe oryzae*, biocontrol, induced resistance, enzymatic activity.

4.1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais importantes cultivados no mundo, é uma fonte primária de alimento para mais de um terço da população mundial, responsável por 27% do fornecimento de energia e 20% ingestão de proteínas da dieta humana (FAO, 2004). As doenças causadas por fungos são uns dos fatores limitantes da produção de arroz, sendo a brusone uma das doenças mais destrutivas. A brusone tem como o agente causal a *Magnaporthe oryzae* Couch, anamorfo - *Pyricularia oryzae* Cav. que é um patógeno de distribuição mundial, podendo causar perdas de até 100% na produção, dependendo da suscetibilidade da cultivar, das condições ambientais e das práticas de manejo.

O controle da brusone deve ser feito de forma preventiva adotando-se o manejo integrado da doença, que requer um conjunto de práticas que tem como componentes a resistência genética das cultivares, as práticas culturais e o controle químico (Prabhu & Filippi, 2006). Os estudos de controle biológico estão em evidência sendo considerada uma medida de controle a ser inserida no manejo integrado para assegurar uma agricultura sustentável (Lahlali & Hijri, 2010), além da preocupação com o uso excessivo de agrotóxicos, os agricultores vem buscando e selecionando métodos alternativos mais amigáveis ao meio ambiente e também relativamente mais barato em comparação ao uso de fungicidas sintéticos.

Os agentes de controle biológico são organismos que atuam sobre o crescimento e/ou desenvolvimento de fitopatógenos, promovem resistência a estresses abióticos e aumentam a eficiência de uso do nitrogênio pelas plantas, proporcionando maior produção sustentável. Estes benefícios ocorrem porque os antagonistas reprogramam a expressão de genes na planta, ativando rotas metabólicas (Shoresh et al., 2010). O uso de microrganismos no controle de

fitopatógenos aparece como uma abordagem bastante atraente e realista, e muitos já foram identificados como agentes de biocontrole (Massart e Jijakli, 2006).

O fungo *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams e Hawksworth, primeiro descrito como *Acrocyndrium oryzae* (Sawada, 1922), é conhecido pelo potencial como antagonista a vários fungos, agentes causais de doenças do colmo do arroz, inclusive a *M. oryzae* (Gnanamanickimam; Mew, 1991, Silva et al., 2007). Este fungo produz o metabólito secundário, a cerulenina (Omura, 1976; Sakthivel et al., 2002), o qual inibe o crescimento micelial, a germinação de conídios e formação de apressórios de *M. oryzae*.

A indução de resistência sistêmica em plantas com uso de antagonista, como *S. oryzae* pode ser considerada uma ferramenta na redução da aplicação de agrotóxicos, permitindo que o hospedeiro se proteja através de seus próprios mecanismos de defesa, obtendo uma proteção duradoura e não específica. Por isto, é de grande importância conhecer o comportamento e atuação das enzimas e dos hormônios que são elicitados nas interações planta-patógeno-antagonista no patossistema *O. sativa* x *M. oryzae* com antagonista *S. oryzae*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* a supressão da brusone foliar do arroz por *S. oryzae* e pelo filtrado produzido pelo mesmo, bem como quantificar a resposta de defesa da planta por ativação de processos bioquímicos expressos pela atividade enzimática.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os dados referentes a este capítulo foram obtidos em laboratórios e áreas experimentais da Embrapa Arroz e Feijão, localizada no município de Santo Antônio de Goiás-GO.

4.2.1 Plantio e manutenção das plantas de arroz

Sementes de arroz da cultivar BRS Primavera foram desinfestadas em álcool 70% e hipoclorito de sódio e semeadas em bandejas plásticas (15 x 30 x 10 cm) contendo 3 kg de solo. O solo recebeu adubação de 5 g de NPK (5-30-15) mais micronutrientes (3 g de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) e 3 g de sulfato de ferro ($FeSO_4$)). As sementes foram distribuídas em oito sulcos e cada sulco recebeu em média 15 sementes. Após o plantio as bandejas foram regadas

com água e mantidas em casa de vegetação. Aos 14 dias após o plantio foi realizada a primeira adubação de cobertura com sulfato de amônia (1g sulfato de amônio/bandeja) e a segunda aos 19 dias na mesma dosagem.

4.2.2 Preparo do inóculo, inoculação e avaliação

O isolado So 03 foi escolhido para avaliação de seu potencial na supressão da brusone foliar *in vivo*, pois produz maior quantidade de cerulenina (item 3.3.3). Este isolado foi avaliado quanto à forma de aplicação (filtrado ou suspensão de conídios); à concentração e ao momento de inoculação (horas antes ou depois *M. oryzae*).

Para o preparo do filtrado foi transferindo um disco de micélio de 5 mm do isolado So 03 para Erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido. Estes Erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora orbital por sete dias a 130 RPM a 25°C. Após o período de incubação, o meio líquido foi filtrado em Millipore e obtido o filtrado 100% concentrado, que também foi diluído para as concentrações de 75% e 50%. A suspensão de conídios de *S. oryzae* foi obtida de colônias desenvolvidas em meio de cultura BDA e utilizada nas concentrações de 3×10^5 conídios.mL⁻¹, 3×10^3 conídios.mL⁻¹ e 3×10^2 conídios.mL⁻¹.

Os filtrados (100%, 75% e 50% concentrados) e as suspensões de conídios (3×10^5 conídios.mL⁻¹, 3×10^3 conídios.mL⁻¹ e 3×10^2 conídios.mL⁻¹) foram pulverizados separadamente em plantas de arroz da cultivar BRS Primavera compondo 30 tratamentos mais uma testemunha, plantas pulverizadas somente com *M. oryzae* (Figura 8).

A inoculação de *M. oryzae* foi realizada aos 21 dias após o plantio com o isolado Py 10.900, da CFMMCNPAP na concentração de 3×10^5 conídios. mL⁻¹. O cultivo deste isolado e o preparo do inóculo de *M. oryzae* foi realizado conforme descrito por Filippi & Prabhu (2001).

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, com três repetições, sendo cada repetição uma bandeja com aproximadamente 80 plantas. A avaliação da severidade da brusone foi realizada em 20 plantas por repetição, sete dias após a inoculação com *M. oryzae*, utilizando-se uma escala de notas de dez graus, variando de zero a nove (Leung et al., 1988). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($\rho \leq 0,05$) com auxílio do programa SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

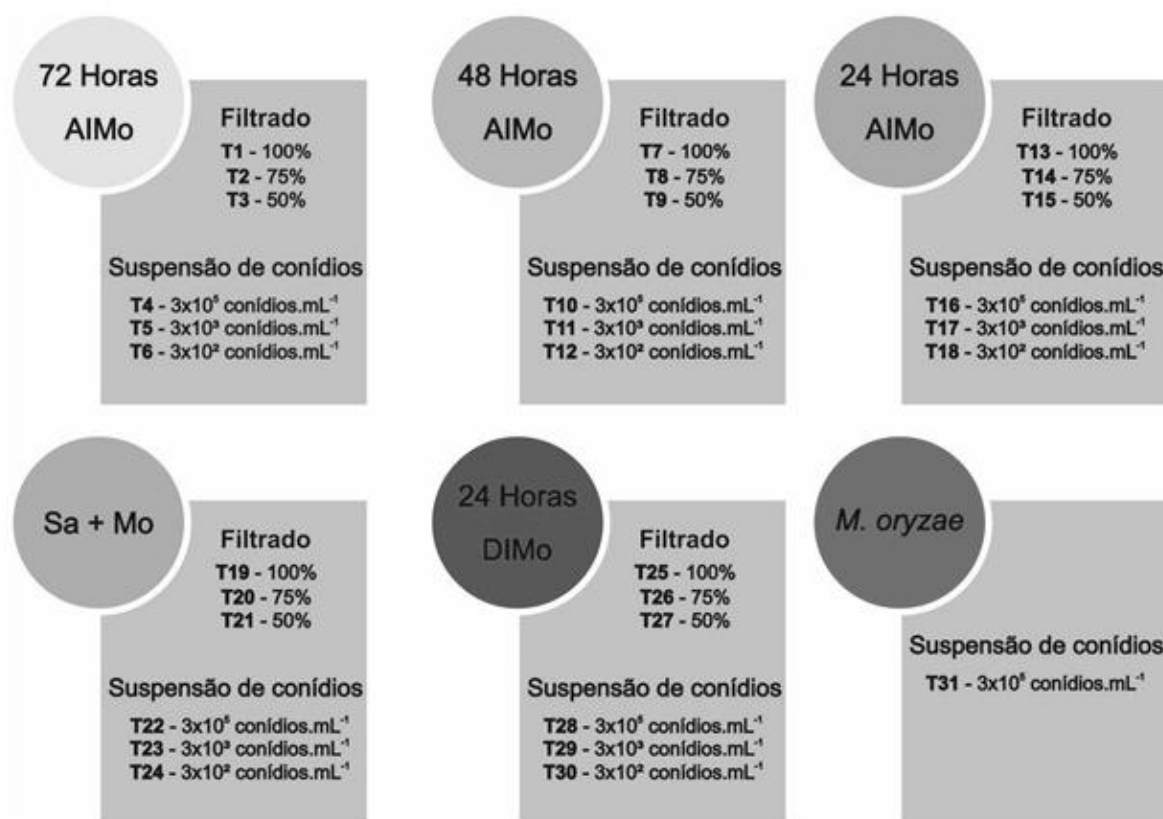


Figura 8. Momentos de aplicação e concentrações do filtrado e da suspensão de conídios de *S. oryzae* para a supressão da brusone foliar do arroz.*

*Onde: **72 Horas AIMo**: *S. oryzae* inoculado 72 horas antes de *M. oryzae* com T1, T2, T3 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, consecutivamente) e T4, T5 e T6 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, consecutivamente); **48 Horas AIMo**: *S. oryzae* inoculado 48 horas antes de *M. oryzae* com T7, T8, T9 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, consecutivamente) e T10, T11 e T12 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, consecutivamente); **24 Horas AIMo**: *S. oryzae* inoculado 24 horas antes de *M. oryzae* com T13, T14, T15 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, consecutivamente) e T16, T17 e T18 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, consecutivamente); **Sa + Mo**: *S. oryzae* inoculado junto *M. oryzae* com T19, T20, T21 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, consecutivamente) e T22, T23 e T24 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, consecutivamente); **24 Horas DIMo**: *S. oryzae* inoculado 24 horas depois de *M. oryzae* com T25, T26, T27 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, consecutivamente) e T28, T29 e T30 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, consecutivamente) e **M oryzae**: plantas inoculadas somente com *M. oryzae*.

Este ensaio foi realizado para definir a concentração e o momento de aplicação de *S. oryzae* que tenha melhor efetividade na supressão da brusone foliar para posterior quantificação enzimática neste tratamento.

4.2.3 Avaliação da supressão da brusone foliar e quantificação da atividade enzimática e do teor de ácido salicílico nas folhas de arroz

O plantio e manutenção das plantas de arroz foram realizados conforme o item 4.2.1 e o preparo do inóculo e a inoculação segundo o item 4.2.2. As plantas de arroz da cultivar BRS Primavera foram pulverizadas pelo antagonista *S. oryzae*, na concentração de filtrado 100% e suspensão de conídios 3×10^{-5} conídios.mL⁻¹, 48 horas antes da inoculação com o isolado desafiante de *M. oryzae* (Py 10.900) na concentração de 3×10^{-5} conídios.mL⁻¹. Os tratamentos utilizados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Tratamentos para quantificação da atividade enzimática e do teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.

Nome	Tratamento
T1	Plantas pulverizadas somente com água
T2	Plantas pulverizadas somente com filtrado de <i>S. oryzae</i>
T3	Plantas pulverizadas somente com a suspensão de conídios de <i>S. oryzae</i>
T4	Plantas pulverizadas com filtrado de <i>S. oryzae</i> e inoculadas 48 horas depois com <i>M. oryzae</i>
T5	Plantas pulverizadas com suspensão de conídios e inoculadas 48 horas depois com <i>M. oryzae</i>
T6	Plantas inoculadas somente com <i>M. oryzae</i>

Foram coletadas de 10 a 15 folhas por tratamento para quantificação da atividade enzimática e do teor de ácido salicílico. E no total foram realizadas 10 coletas em diferentes tempos (Tabela 6).

A avaliação da severidade da brusone foliar foi realizada utilizando-se uma escala de notas de dez graus, variando de zero a nove (Leung et al.,1988). Foram realizadas quatro avaliações, aos três, quatro, seis e sete dias após a inoculação com *M. oryzae*. O cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi obtido de acordo com (Campbell & Madden, 1990) e a redução da severidade de brusone foliar calculada pelo índice de Mackinney (Balardin et al.,1990) estimando a percentagem de controle da doença, considerando cada tratamento em relação a testemunha. Os valores da AACPD foram

submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com o programa SASM-Agri.

Tabela 6. Número da coleta, momento de cada coleta e tratamentos coletados para a quantificação da atividade enzimática e do teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.

Coletas	Momento da coleta	Tratamentos coletados
1	Antes da pulverização com <i>S. oryzae</i>	T1
2	3 horas após a pulverização com <i>S. oryzae</i>	T1, T2 e T3
3	5 horas após a pulverização com <i>S. oryzae</i>	T1, T2 e T3
4	24 horas após a pulverização com <i>S. oryzae</i>	T1, T2 e T3
6	3 horas após a inoculação de <i>M. oryzae</i>	T1, T2, T3, T4, T5 e T6
7	5 horas após a inoculação de <i>M. oryzae</i>	T1, T2, T3, T4, T5 e T6
8	24 horas após a inoculação de <i>M. oryzae</i>	T1, T2, T3, T4, T5 e T6
9	48 horas após a inoculação de <i>M. oryzae</i>	T1, T2, T3, T4, T5 e T6
10	72 horas após a inoculação de <i>M. oryzae</i>	T1, T2, T3, T4, T5 e T6

Os dados de atividade enzimática das PR-proteínas, peroxidase, lipoxigenase e fenilalanina amônia-liase e teor de ácido salicílico nas folhas de arroz foram submetidos à análise realizadas no programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 21.0 (IBM, 2012) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

4.2.4 Obtenção do extrato enzimático

As amostras foram maceradas em almofariz de cerâmica com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó verde de textura fina. Para obtenção do extrato enzimático (EE) as amostras foram transferidas para microtubos graduados em 2 mL, preenchendo $\frac{1}{4}$ do tubo com a amostra macerada e o volume completado com tampão de extração de proteínas ((10 Mm Tris-HCl; 150 mM NaCl ; 2 Mm EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); 2 Mm DTT (2-mercaptoetanol); 1 Mm PMSF (fenilmetilsulfonilflúor); Leptina (10 mg.mL⁻¹) e Apotina (10 mg.mL⁻¹)). As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por um minuto, centrifugadas por cinco minutos a 9300 g e o sobrenadante transferido para outro microtubo, sendo o volume novamente completado para 2 mL com tampão de extração de proteínas. Este EE foi a base para a quantificação da atividade das proteínas totais, proteínas relacionadas à patogênese, quitinase (EC 3.2.1.14) e β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.6) e as demais enzimas,

peroxidase (EC 1.11.1.7), lipoxigenase (EC 1.13.11.12) e fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5).

4.2.4.1 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de colorimetria (Bradford, 1976). Aliquotou-se 50 μL do EE de cada amostra e adicionou-se 1 mL do reagente “coomassiebrilliant blue” (CBB). Estas as amostras foram deixadas em repouso, onde houve o contato do reagente com o extrato enzimático por 15 minutos. Após transferiu-se 100 μL de cada amostra para placa de Elisa[®], onde foi realizada a leitura em espectrofotômetro de microplacas Epoch (Biotek) no comprimento de 595 nm utilizando software Gen5 Data Analyses (Biotek). Preparou-se uma curva padrão de proteínas totais com albumina de soro bovino (BSA) e as leituras das amostras correspondentes aos extratos enzimáticos foram convertidas em concentração de proteína solúvel.

4.2.4.2 Atividade da quitinase (EC 3.1.1.14)

Foi determinada pelo método de Pan et al. (1991) modificado, onde em cada amostra foi adicionados 50 μL do EE em triplicata com 300 μL de quitina (1%). A quitina (Sigma) foi dissolvida em tampão acetato a 0,1M e pH 5.0. Esta reação foi mantida por 24 horas em temperatura ambiente (25°C). Após este período, foi adicionado 1mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 1%. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, transferiu-se 200 μL de cada amostra para um novo microtubo contendo 1,25 μL de água destilada autoclavada. Após a diluição em água, foram transferidos 200 μL desta amostra para a placa de Elisa[®] e realizada a leitura em espectrofotômetro de microplacas Epoch (Biotek) no comprimento de 540 nm com software Gen5 Data Analyses (Biotek).

4.2.4.3 Atividade da β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.6)

Foi determinada pelo método de Pan et al. (1991) e Côrtes et al. (2008) modificados, onde foi adicionado 50 μL do EE, em triplicata, de cada amostra mais 300 μL de laminarina

(1%) dissolvida em tampão acetato a 0,1M e pH 5.0. Esta reação foi mantida por 24 horas em temperatura ambiente (25°C). Após este período, foi adicionado 1 mL DNS (1%) às amostras as quais foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Em seguida transferiu-se 200 µL de cada amostra para um novo microtubo contendo 1,25 µL de água. Ao final, 200 µL de cada amostra foram distribuídas em placa de Elisa[®] e realizadas a leitura em espectrofotômetro de microplacas Epoch (Biotek) no comprimento de onda de 540 nm com software Gen5 Data Analyses (Biotek).

4.2.4.4 Atividade da lipoxigenase (EC 1.13.11.12)

Foi determinada pelo método de Axelrod et al. (1981) modificado, onde adicionou-se 100 µL do EE, em triplicata, de cada amostra mais 1,5 mL de ácido linoléico (1%) dissolvido em tampão fosfato a 50 mM e pH 6.0. Esta reação foi mantida por 24 horas em temperatura ambiente (25°C). Foi realizada a leitura em espectrofotômetro Spectrum SP-2000 UV no comprimento de onda de 234 nm.

4.2.4.5 Atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7)

Foi determinada pelos métodos de Keeseey (1987) e Côrtes et al. (2008) modificados, utilizado o programa WinSpec 2.3 no modo tempo x absorbância. Em cada leitura, foi adicionado na cubeta 1 mL de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)(ABTS), o qual foi diluído em tampão acetato a 0,1M e pH 4.0 Com a cubeta dentro do espectrofotômetro Spectrum SP-2000UV e comprimento de onda de 405 nm, adicionou-se às amostras 100 µL de peróxido de hidrogênio.

4.2.4.6 Atividade da fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5)

Foi determinada pelo método descrito por Alunni et al. (2003) quantificando o produto gerado (ácido trans-cinâmico) pela hidrólise do substrato L – fenilalanina, onde foram adicionados 100 µL do EE de cada amostra, em triplicata, mais fenilalanina dissolvida em tampão borato a 0,1M e pH 9.0. Esta reação foi mantida por 12 horas em temperatura

ambiente (25°C) e por 10 minutos a 0°C. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro Spectrum SP-2000 UV no comprimento de onda de 290 nm.

4.2.4.7 Conversão de valores de absorbância para atividade específica de cada enzima

Os valores de absorbância (AU) das PR-proteínas (quitinase e β -1,3-glucanase) foram transformados em atividade específica ($\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). A curva padrão para dosagem de açúcares redutores em DNS foi obtida com auxílio de padrões de glicose variando de 0 - 10 mM. As demais enzimas (peroxidase, lipoxigenase e fenilalanina amônia-liase) foram convertidas de unidades de absorbância, com padrão de dosagem de proteínas solúveis. A curva padrão para dosagem de proteínas (Bradford, 1976) foi obtida nas concentrações de proteína 0 - 1 mg.mL^{-1} .

4.2.5 Extração de ácido salicílico das folhas de arroz

O método de extração do ácido salicílico utilizado foi adaptado do descrito por Yalpani et al. (1991) e Silverman et al. (1995). Pesou-se 200 μg das folhas maceradas para cada amostra e adicionou-se 1,5 mL de metanol (90%). As amostras foram homogeneizadas e agitadas em vórtex por 1 minuto e centrifugadas por 15 minutos, 25°C a 5000 g. Após a centrifugação retirou-se 600 μL de sobrenadante de cada amostra e adicionou 500 μL de ácido tricloroacético (5%) mais 600 μL da mistura de acetato de etila, ciclopentano e isopropanol (50:50:1). As amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex por 1 minuto. A etapa seguinte foi à retirada 500 μL do sobrenadante e sua transferência para um novo microtubo e a cliolofilização deste volume obtendo cristais pelo processo de secagem dos solventes. Os cristais foram suspensos em tampão (23% de metanol e 77% de tampão acetato (2 Mm e pH 5.0)). Todas as amostras foram filtradas em filtro Millipore® de 0,22 μm . As leituras foram realizadas em triplicata por coinjeção de 20 mL em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Perkin ElmerFlexar) por repetição.

4.2.5.1 Quantificação do ácido salicílico das folhas de arroz

A quantificação do ácido salicílico foi realizada por separação isocrática da fase móvel com 23% de metanol e 77% de tampão acetato (20 Mm/pH 5.0) em HPLC (Yalpani et. al., 1991). Foi usada a coluna C18 (250 x 2,1 mm x 5 µm), com fluxo da fase móvel de 1mL/min e a temperatura da coluna foi de 30 °C (+/- 2°C). O comprimento de onda para detecção do ácido salicílico em HPLC foi de 280 nm utilizando o software Chromera (Perkin Elmer) e um padrão de ácido salicílico (Sigma).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito da concentração de inóculo e do momento de aplicação do antagonista *Sarocladium oryzae*

Observou-se a formação de três grupos distintos pelo teste de Scott-Knott (Figura 9). Os melhores tratamentos, em que se observou a maior redução na severidade da brusone foliar foram: 48AF2 (filtrado de *S. oryzae* na concentração de 75% inoculado 48 horas antes de *M. oryzae*), 48AF1 (filtrado de *S. oryzae* na concentração de 100 % inoculado 48 horas antes de *M. oryzae*), 72AF1 (filtrado de *S. oryzae* na concentração de 100 % inoculado 72 horas antes de *M. oryzae*) e 72AF2 (filtrado de *S. oryzae* na concentração de 75% inoculado 72 horas antes de *M. oryzae*).

Nas condições avaliadas, *S. oryzae* inoculado 72 horas ou 48 horas antes do patógeno *M. oryzae*, protegeu as plantas de arroz, e conseguiu reduzir a brusone foliar, possivelmente impedindo o desenvolvimento de *M. oryzae* e sua colonização nas folhas de arroz. Sena et al. (2013) obtiveram redução da brusone foliar em casa de vegetação, utilizando suspensão de conídios e extrato bruto de *Epicoccum* sp. e observaram diferenças entre os dois métodos de aplicação, onde o melhor foi o extrato bruto de *Epicoccum* spp. Quando este foi aplicado 48 horas antes de *M. oryzae* reduziu em 97,6% a severidade da brusone foliar. Naureen et al. (2009) observaram redução na incidência da brusone por rizobactérias, associando este tipo de ação a cultivar utilizada e ao tipo de solo.

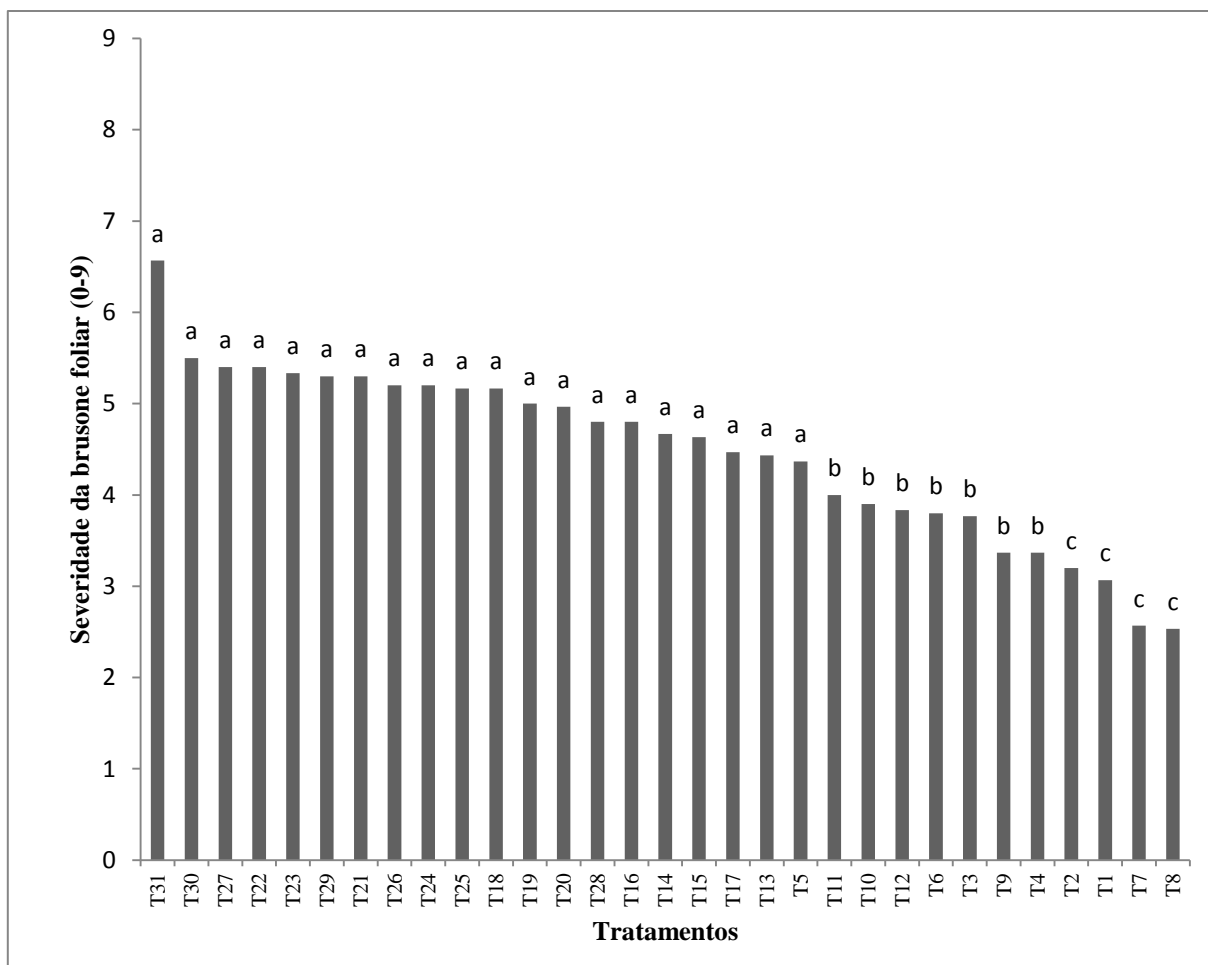


Figura 9. Redução da severidade da brusone foliar em plantas de arroz pulverizadas com *S. oryzae* em diferentes mometos na forma de filtrado e suspensão de conídios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). *

***Onde:** T1, T2, T3 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, respectivamente) e T4, T5 e T6 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, respectivamente) inoculados 72 horas antes de *M. oryzae*; T7, T8, T9 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, respectivamente) e T10, T11 e T12 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, respectivamente) inoculados 48 horas antes de *M. oryzae*; T13, T14, T15 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, respectivamente) e T16, T17 e T18 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, respectivamente) inoculados 24 horas antes de *M. oryzae*; T19, T20, T21 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, respectivamente) e T22, T23 e T24 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, respectivamente) inoculados junto com *M. oryzae*; T25, T26, T27 (filtrado nas concentrações de 100%, 75% e 50%, respectivamente) e T28, T29 e T30 (suspensão de conídios nas concentrações de 3×10^5 , 3×10^3 e 3×10^2 conídios.mL⁻¹, respectivamente) inoculados 24 horas depois de *M. oryzae* e T31 (testemunha) plantas inoculadas somente com *M. oryzae*.

Lucas et al. (2009) observaram que rizobactérias, *Pseudomonas fluorescens* e *Chryseobacterium balustinum*, isoladamente ou em conjunto tiveram ação na supressão da brusone e protegeram as panículas

Neste estudo, o filtrado do isolado So 03 tem maior eficiência que a suspensão de conídios de *S. oryzae* na supressão da severidade da brusone nas folhas, o que pode estar relacionado ao fato de o filtrado ser composto por reagentes específicos para a produção de cerulenina (Omura, 1976) e este é o isolado que produziu cerulenina em maior quantidade. Consequentemente, com a produção eficiente deste metabólito e o contato com hospedeiro antes do patógeno ocorre eliciação de defesa da planta, tendo como resposta a redução na severidade da brusone foliar.

Os tratamentos com o filtrado, principalmente quando pulverizados 48 hoars e 72 horas antes de *M. oryzae* apresentaram maior eficiência na supressão da brusone foliar. Alguns autores trabalharam com aplicação antecipada do antagonista e obtiveram resultados satisfatórios. Senna et al. (2013) conseguiram reduzir a severidade da brusone foliar em um valor superior a 90 % quando inocularam o filtrado do antagonista *Epicoccum* sp. 48 horas antes de *M. oryzae*. Neste trabalho, também foi possível concluir que a pulverização antecipada do antagonista *S. oryzae* e de seu filtrado suprimiu mais a brusone foliar do que os tratamentos que aplicaram antes o patógeno *M. oryzae* e posteriormente o antagonista ou como também quando aplicados simultaneamente.

Para Gomes et al. (2000) o sucesso do controle biológico de doenças da parte aérea depende do modelo biológico escolhido. Assim, há um indicativo de quais os mecanismos de ação são mais adequados, para um controle efetivo, de uma doença e o uso correto de antagonistas e seus produtos, que podem ser considerados elicitores. O que implica na adoção de estratégias de seleção e desenvolvimento de agentes de biocontrole mais promissores.

No patossistema *M. oryzae* x *Oryza sativa* na presença do antagonista *S. oryzae* alguns estudos já foram realizados. Gnanamanickam & Mew (2001) relataram que a presença de *S. oryzae* tornou o desenvolvimento de *M. oryzae* vulnerável. Prabhu et al (2007) e Silva et al. (2007) em estudos *in vitro* demonstraram a ação antagônica de *S. oryzae* contra *M. oryzae*. Côrtes et al. (2014) mostraram que *S. oryzae* favoreceu a supressão da brusone foliar *in vivo*, quando aplicado na forma de extrato bruto, contendo cerulenina na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3.2 Supressão da brusone foliar e quantificação da atividade enzimática e teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.

O antagonista *S. oryzae*, quando aplicado 48 horas antes da inoculação de *M. oryzae* na forma de filtrado na concentração de 100% (48 AF1) e a suspensão de conídios na concentração de 3×10^5 conídios.mL⁻¹ (48 AS1) reduziram em até 75,5 % e 68,8 % a severidade da brusone foliar, respectivamente. Houve diferenças entre as duas formas de aplicação de *S. oryzae*, em relação ao controle (plantas inoculadas somente com *M. oryzae*). O tratamento com 48 AF1 apresentou menor severidade da brusone foliar em relação ao tratamento 48 AS1, formando lesões menores e pouco esporulativas (Figura 10).

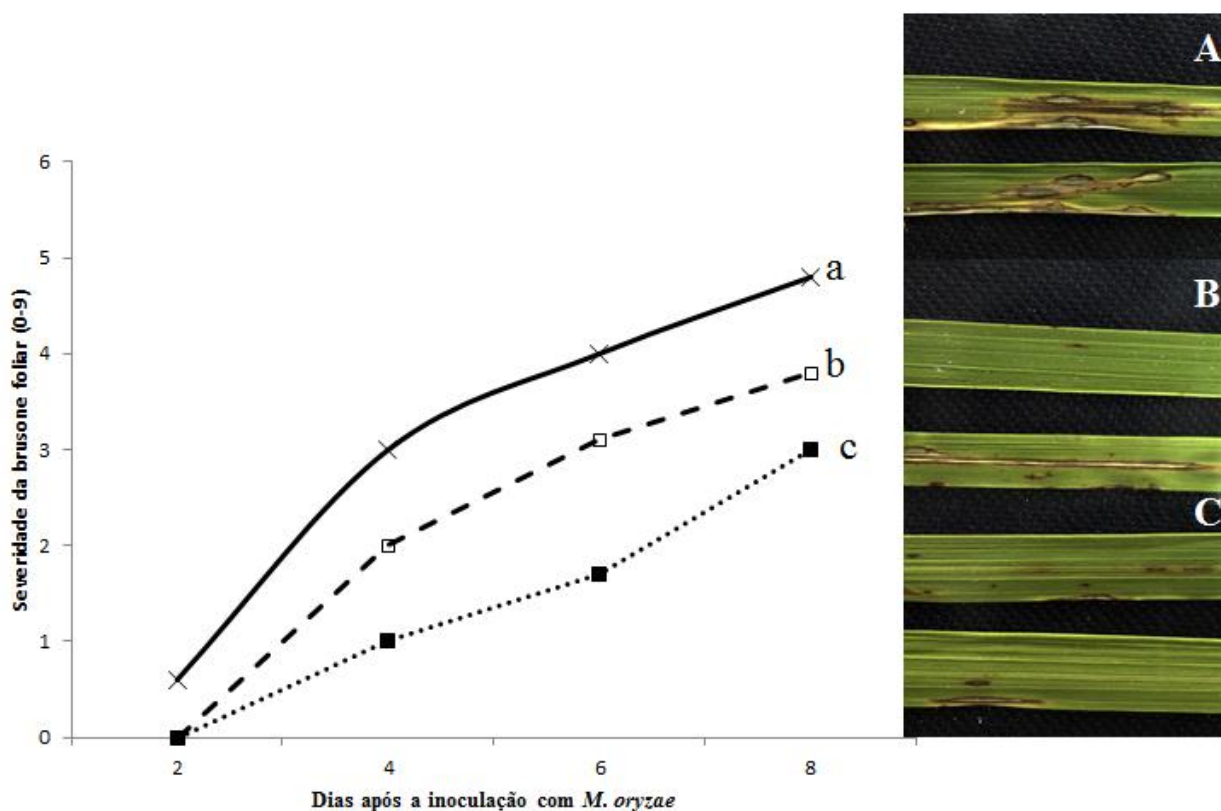


Figura 10. Severidade da brusone foliar em plantas de arroz ao longo do tempo, quando tratadas com (A) Controle: somente suspensão de conídios de *M. oryzae*; (B) Suspensão de conídios de *S. oryzae* aplicado 48 horas antes da inoculação desafiante com *M. oryzae* e (C) Filtrado de *S. oryzae* aplicado 48 horas antes da inoculação desafiante com *M. oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

No cálculo da AACPD os tratamentos diferiram estatisticamente entre si. Os tratamentos 48 AF1 e 48 AS1 além de suprimirem a severidade da brusone foliar, apresentaram AACPD de 10,22 e 16,42 respectivamente, enquanto que no tratamento controle foi de 22,45. Assim foi possível concluir que, o tratamento 48 AF1 é superior a 48 AS1, sendo que há menor relação de doença x tempo.

A presença de *S. oryzae*, tanto do filtrado quando da suspensão de conídios nas folhas de arroz protegeu os tecidos do hospedeiro, interferindo no desenvolvimento normal de *M. oryzae*. O que resultou em menor severidade da doença e formação de lesões em menor número e tamanho. O antagonista *S. oryzae* tem papel importante na epidemiologia da brusone, um ve que reduz os processos infecciosos iniciais da doença, reduzindo a germinação dos conídios e a formação de apressórios *in vitro* (Capítulo 1, item 3.3.5) e *in vivo*, como foi possível observar pela supressão da severidade da brusone avaliada pela AACPD (Figura 11).

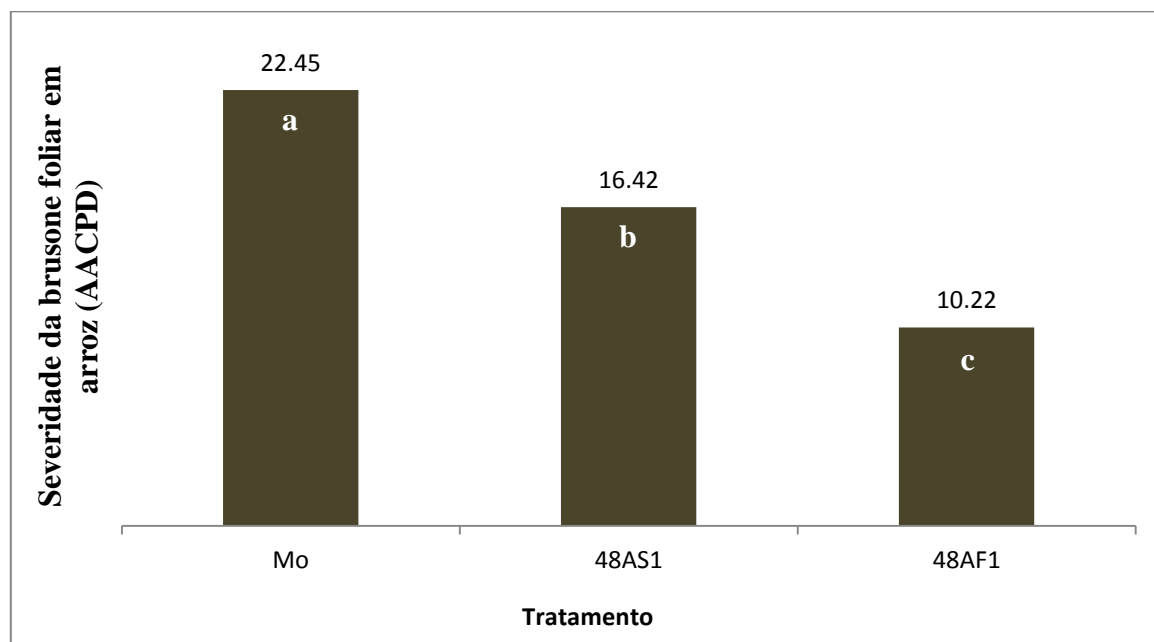


Figura 12. Supressão da severidade da busone foliar em arroz, em plantas tratadas com filtrado e suspensão de conídio de *S. oryzae*. As barras representam os tratamentos comparados, onde Mo é a planta inoculada somente com *M. oryzae*; 48AS1 são as plantas inoculadas 48 horas antes com a suspensão de conídios de *S. oryzae* e *M. oryzae* e 48 AF1 são as plantas inoculadas 48 horas antes com o filtrado de *S. oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Após a avaliação da severidade da brusone foliar, as plantas foram transplantadas das bandeijas para vasos. E foi possível observar na fase reprodutiva a formação da bainha, e estas não apresentaram os sintomas de podridão da bainha, bem como, nas folhas, não apresentaram sintomas brusone foliar nos tratamentos com a suspensão de conídios, filtrado e no controle (Figura 12).

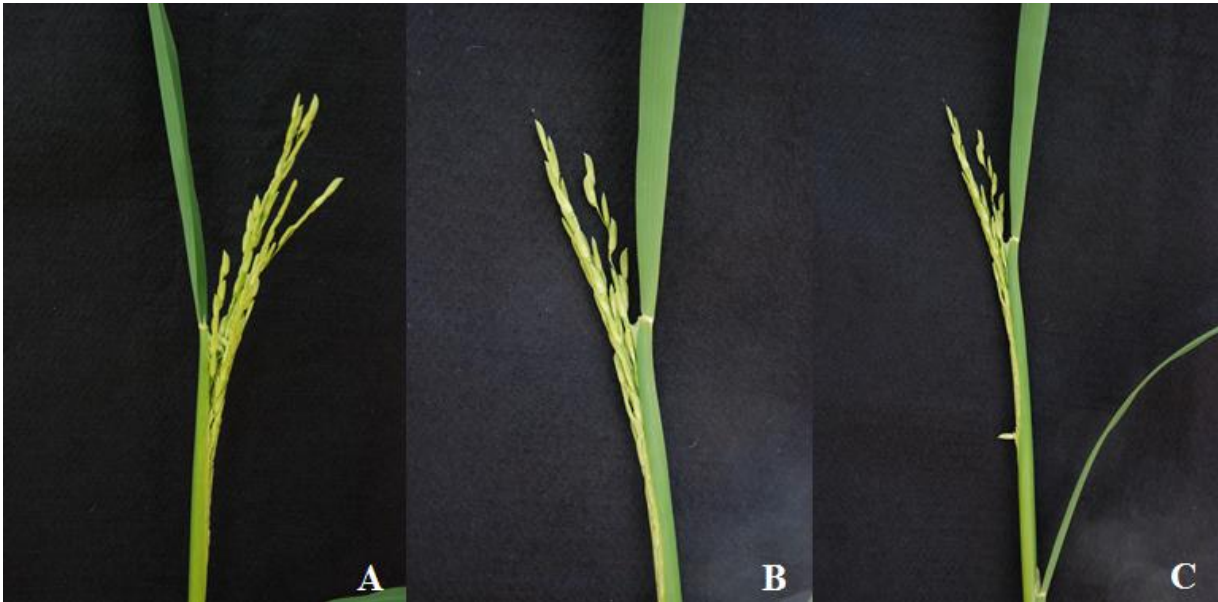


Figura 12. Bainhas e folhas de arroz nos tratamentos: (A) *M. oryzae* + suspensão de conídios de *S. oryzae*, (B) *M. oryzae* + filtrado de *S. oryzae* e (C) Controle (plantas inoculadas somente com água).

No patossistema *O. sativa* x *M. oryzae* alguns resultados promissores já foram apresentados usando ACB na supressão da doença. Cortês et al. (2014) em condições semelhantes a este trabalho, usaram o filtrado de *S. oryzae* com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cerulenina e conseguiram suprimir em 63% a brusone foliar do arroz. Yu et al. (2013) reduziram a incidência da brusone nas folhas de arroz ao tratar as plantas tanto com filtrado quanto com a suspensão de conídios de *Staphylococcus* spp. Filippi et al. (2011) avaliaram duas rizobactérias (rizo-46 e rizo-55) inoculadas via rega do solo, 15 dias antes da inoculação com *M. oryzae* e observaram redução em 95 e 90 % da severidade da brusone foliar, respectivamente.

Em outros patossistemas, diversos autores tem relatado a efetividade dos ACB. Foster (1950) foi um dos pioneiros em estudos com filtrado de *Trichoderma* sp. contra o vírus do mosaico do fumo (TMV), quando observou a redução da capacidade infectiva do vírus, em até 90%, em plantas de *Nicotinia glutinosa*. Morandi & Bettiol (2009) fizeram um levantamento de diversos estudos posteriores relatando o uso de *Trichoderma* como agente de controle biológico que atua contra diversos patógenos, como *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Crinipellis*, nas culturas do feijão, soja, algodão, fumo, morango, tomate, cebola, alho, cacau e em algumas plantas ornamentais. Para Bettiol et al. (2008) *Trichoderma* é sem dúvida o agente de controle biológico de doenças de plantas mais estudado e utilizado no Brasil e na América Latina.

Quanto às bactérias antagonistas, as de maior prevalência e as mais estudadas são as do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces* (Campos-Silva et al., 2008). Mariano et al. (2004) observaram que *B. subtilis* e *P. fluorescentes* protegeram plântulas de feijão contra o tombamento causado por *R. solani*. Sousa et al. (2006) relataram que *Streptomyces* proporcionou 98,8% de inibição na eclosão de J2 de *Meloidogyne incognita* e também observaram redução no número de galhas e de ovos nas raízes de mudas de tomate.

Para Lanna Filho et al. (2010) a versatilidade de um agente de controle biológico de doenças de plantas é um fator determinante que possibilita a sua manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos. Além de ser uma característica esperada em um antagonista, esta adaptabilidade é necessária para que a ativação dos mecanismos de defesa das plantas possam driblar os fitopatógenos. Assim, devido à ampla gama de patógenos de doenças de plantas, um antagonista e seus produtos, como a suspensão de conídios e o filtrado de *S. oryzae* devem ser também avaliados na supressão de outras doenças, bem como em condições não controladas, para assim, ser possível estabelecer quais são as especificidades deste ACB.

4.3.3 Atividade enzimática e teor de ácido salicílico nas folhas de arroz.

4.3.3.1 Atividade enzimática e o teor de ácido salicílico nas folhas de arroz inoculadas somente com o antagonista *S. oryzae*, na ausência de *M. oryzae*

A expressão enzimática observada na interação entre *S. oryzae* e as plantas de arroz (Figura 13) apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos inoculados conforme apresentados na Figura 13.

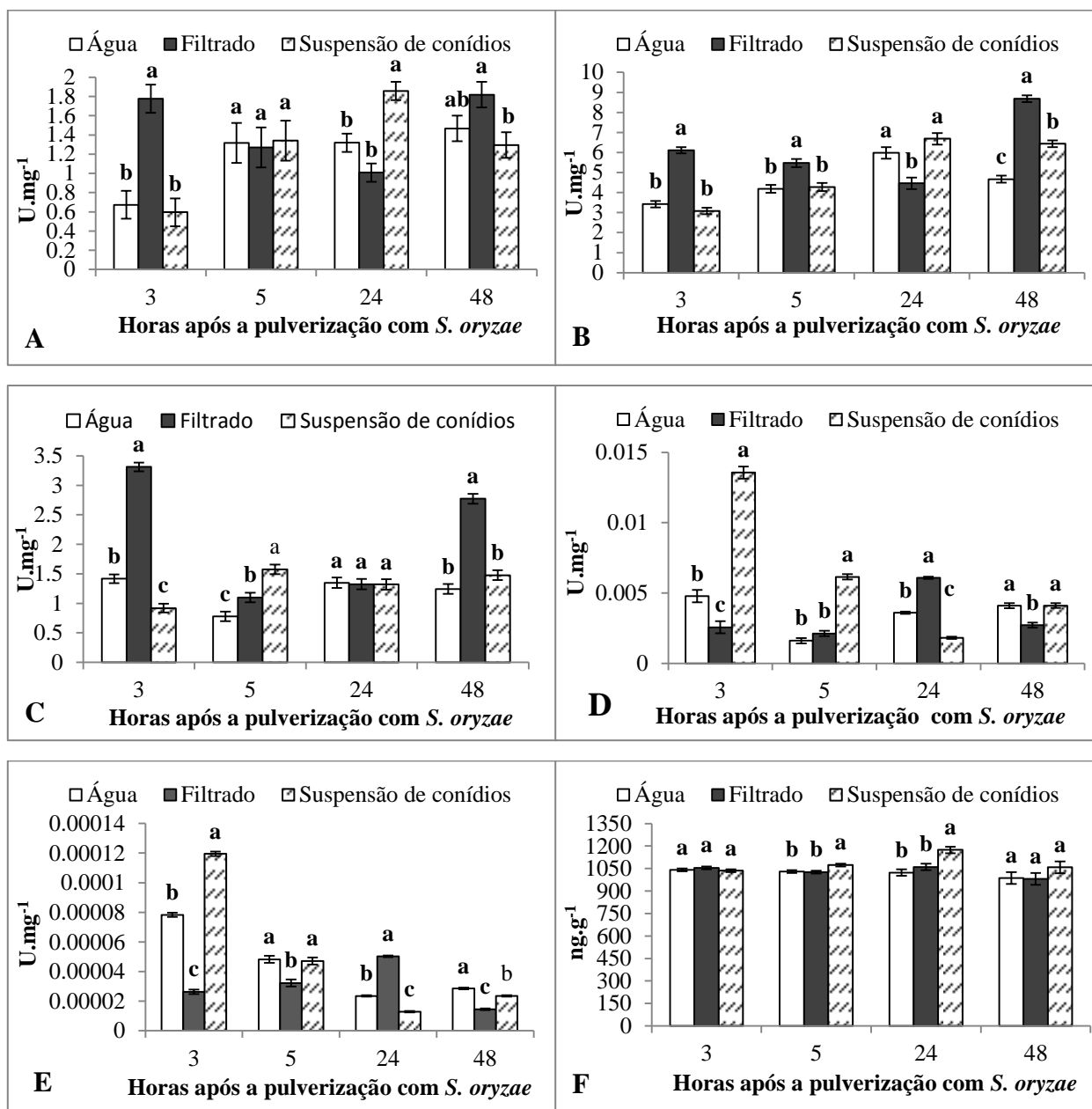


Figura 13. Atividade enzimática e quantificação do ácido salicílico em plantas de arroz tratadas com suspensão de conídios e filtrado de *S. oryzae* e coletadas às 3, 5, 24 e 48 após a pulverização de *S. oryzae*. Onde: (A) Quitinase; (B) β-1,3-Glucanase (C) Peroxidase; (D) Lipoxigenase; (E) Fenilalanina amônia-liase e (F) Ácido salicílico.

Foi possível observar que às 3 horas após a pulverização com o filtrado e a suspensão de conídios de *S. oryzae* que as enzimas quitinase, β -1,3-glucanase e peroxidase apresentaram atividade no tratamento com filtrado e a lipoxigenase teve expressão, apenas no tratamento com a suspensão de conídios. A fenilalanina e o ácido salicílico não diferiram do tratamento controle (plantas inoculadas somente com água).

Após 5 horas, β -1,3-glucanase e peroxidase foram superiores com o filtrado de *S. oryzae* e a enzimas peroxidase e lipoxigenase e o teor de ácido salicílico com a suspensão de conídios de *S. oryzae*. As demais enzimas não apresentaram atividade neste momento. Após 24 horas, lipoxigenase e fenilalanina amônia-liase tiveram expressão no tratamento com filtrado de *S. oryzae* e a quitinase e o teor de ácido salicílico no tratamento com a suspensão de conídios de *S. oryzae*.

Na última avaliação antes da presença do desafiador *M. oryzae*, 48 horas após a pulverização de *S. oryzae*, o tratamento com filtrado de *S. oryzae* teve expressão em β -1,3-glucanase e peroxidase apenas, enquanto que a suspensão de conídios diferiu do tratamento testemunha somente em β -1,3-glucanase.

A β -1,3-glucanase e a peroxidase foram majoritariamente as enzimas mais expressivas no tratamento com filtrado de *S. oryzae* tendo atividade as 3 horas, 5 horas e 48 horas após a inoculação, no tempo em que, no tratamento com a suspensão de conídios de *S. oryzae*, a lipoxigenase teve dois momento de expressão, as 3 horas e 5 horas e o teor de ácido salicílico, as 5 horas e 24 horas após a pulverização.

Wu & Bradford (2003) relataram que em plantas, a quitinase e a β -1,3 glucanase são pouco expressas constitutivamente, mas prontamente induzidas sob estresse. As condições da casa de vegetação, onde as plantas estavam no momento da pulverização e após a pulverização do filtrado e da suspensão de conídios de *S. oryzae*, podem ter favorecido o estresse das plantas e conseqüentemente o aumento da atividade desta enzimas também no tratamento controle. Para Graham et al. (2003) um aumento nos níveis de atividade de quitinases por agentes bióticos também pode provocar uma função de defesa das plantas.

Assim, pode-se inferir que há reconhecimento do filtrado e da suspensão de conídios de *S. oryzae* pela planta e que estes podem atuar na ativação de diferentes mecanismos ou rotas metabólicas de defesa nas plantas de arroz.

4.3.3.2 Atividade enzimática e teor de ácido salicílico nas folhas de arroz após a inoculação com *M. oryzae*

Após o tratamento com o antagonista *S. oryzae* e a inoculação de *M. oryzae* as características enzimáticas observadas anteriormente tomaram proporções bem distintas (Figura 14 A e 14 B). Neste momento houve a interação de *S. oryzae*, na forma de filtrado e de suspensão de conídios, com o patógeno *M. oryzae* e as plantas de arroz, além de ainda observar a interação isolada, ou seja, plantas tratadas somente com filtrado ou somente com suspensão de conídios.

Antes da inoculação com *M. oryzae*, a atividade de cada enzima foi comparada com as plantas inoculadas somente com água (controle positivo), nesta etapa contou-se com o controle negativo, as plantas inoculadas somente com *M. oryzae*.

Os maiores valores de atividade específica em relação aos controles (plantas inoculadas com água e com *M. oryzae*, somente) foram para lipoxigenase, 5 horas com o filtrado, 24 horas e 72 horas para com a suspensão de conídios (Figura 14 B). A fenilalanina amônia-liase teve atividade 48 horas com o tratamento filtrado e 72 horas com a suspensão de conídios. A expressão da quitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase e o do fitohormônio ácido salicílico não apresentaram diferenças em relação aos controles (Figura 14 B).

Cinco horas após a inoculação do patógeno desafiador *M. oryzae*, houve a expressão da lipoxigenase e fenilalanina amônia-liase no tratamento com o filtrado de *S. oryzae* e da peroxidase no tratamento com a suspensão de conídios de *S. oryzae*. A lipoxigenase também se expressou superior aos controles (plantas inoculadas somente com água e plantas inoculadas somente com *M. oryzae*) em plantas tratadas com a suspensão de *S. oryzae* 24 horas e 72 horas após a inoculação de *M. oryzae*. A fenilalanina amônia-liase teve expressão também neste tratamento 72 horas após a inoculação de *M. oryzae*.

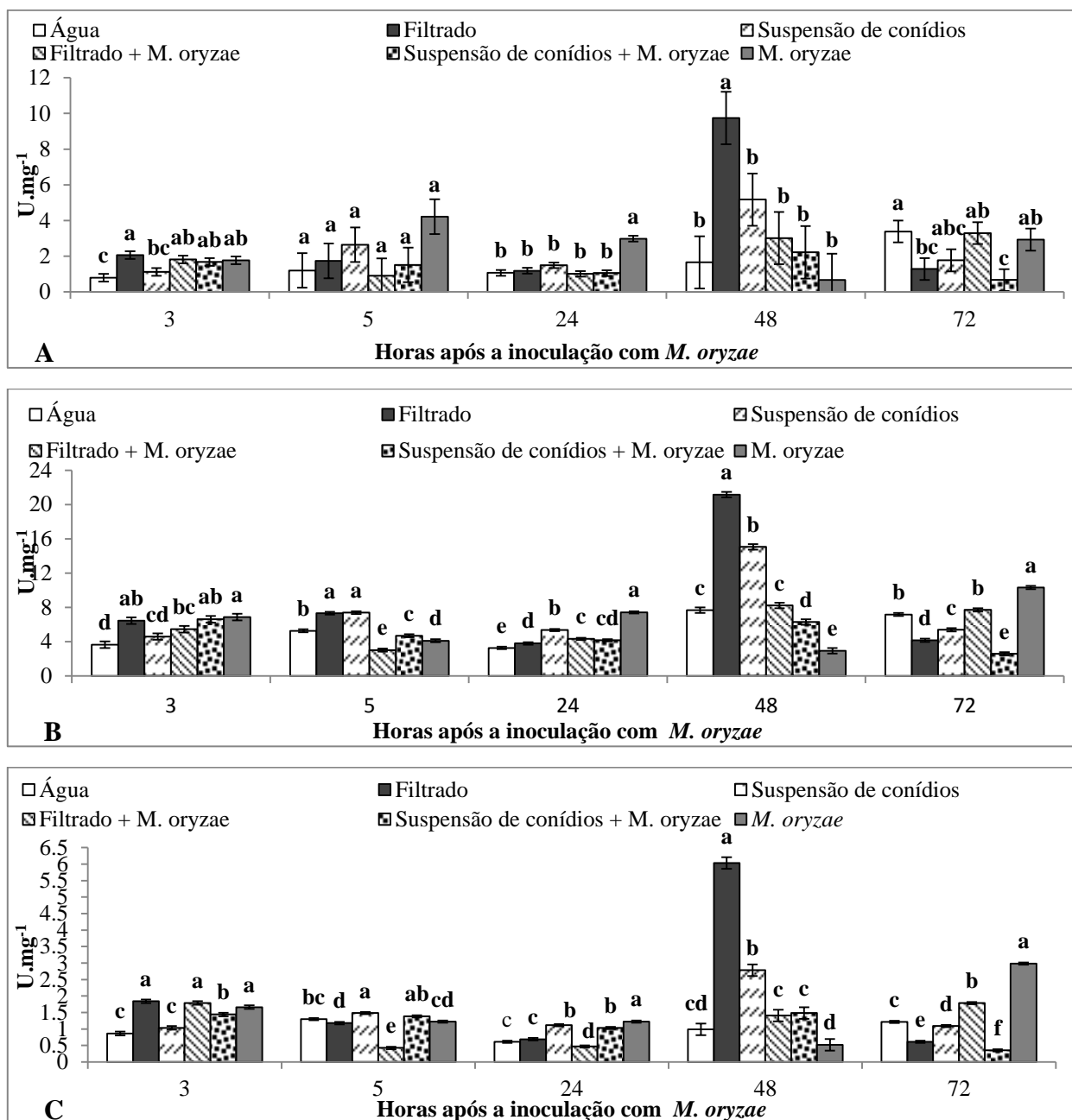


Figura 14 A. Atividade enzimática de plantas de arroz, tratadas com suspensão de conídios e filtrado de *S. oryzae* e inoculadas após 48 horas com *M. oryzae*. Coletas às 3, 5, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com *M. oryzae*. Onde: (A) Quitinase; (B) β -1,3-Glucanase e (C) Peroxidase.

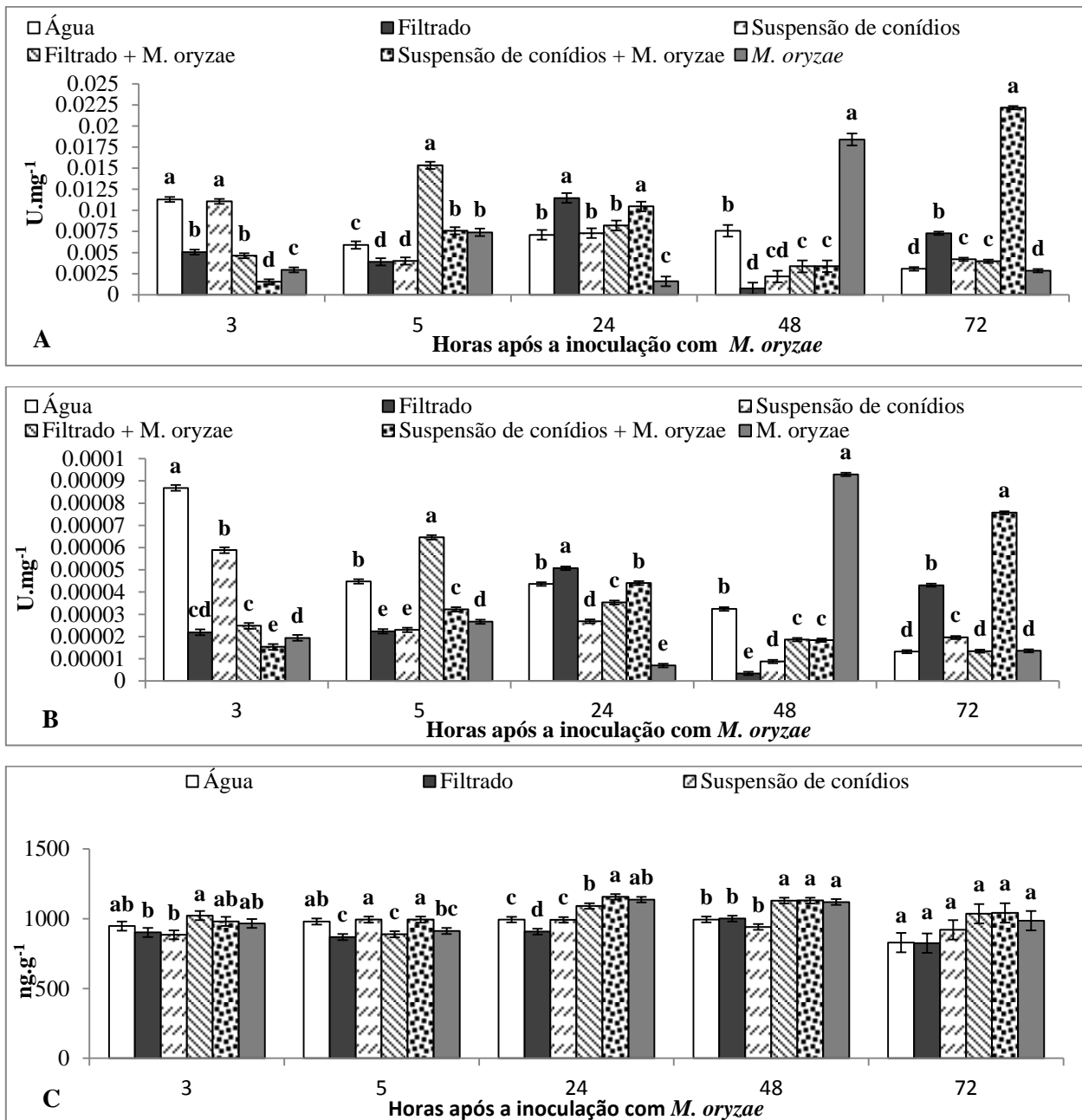


Figura 14 B. Atividade enzimática e teor de ácido salicílico em plantas de arroz, tratadas com suspensão de conídios e filtrado de *S. oryzae* e inoculadas após 48 horas com *M. oryzae*. Coletas às 3, 5, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com *M. oryzae*. Onde: (A) Lipoxigenase; (B) Fenilalanina amônia-liase e (C) Ácido salicílico.

A lipoxigenase está associada à síntese de ácidos graxos presente na peroxidação de lipídeos da parede celular. Omura (1976) relatou que a cerulenina produzida por *S. oryzae* é um potente inibidor do metabolismo de ácidos graxos e que participa na formação da narigerina. A narigerina é um importante flavonoíde que tem ação tóxica sob alguns patógenos fúngicos e bacterianos do arroz (Padmavathi et al., 1997) e deve ser considerada importante na resistência das plantas de arroz às doenças. Sakthivel et al. (2002) questionaram que a narigerina pode atuar com um possível intermediário de defesa na via dos flavonoídes em plantas de arroz, podendo atuar como sinalizador na via do AS, ativando RSA ou RSI.

Tal fato parece ser comprovar neste trabalho, mostrando a atividade desta enzima superior aos controles em 5 horas, 24 horas e 72 horas entre os dois tratamentos que suprimiram a brusone foliar em 75,5 % com filtrado de *S. oryzae* e 68,8% com a suspensão de conídios de *S. oryzae*.

O aumento da atividade da lipoxigenase nos tratamentos com *S. oryzae*, tanto com filtrado como com a suspensão de conídios, era um fato esperado neste trabalho. Já que, foi relatado que, *S. oryzae* produz cerulenina, um metabólito secundário associado à síntese de ácidos graxos. Assim, o aumento nos níveis de lipoxigenase está diretamente associado à presença deste antagonista, entretanto para Ohta et al. (1991) o aumento na atividade de lipoxigenase em folhas de arroz ocorre devido a resposta de infecção de *M. oryzae* nas plantas de arroz.

Há uma relação entre o aumento dos níveis fenilalanina amônia-liase e o ácido salicílico (Campos et al., 2003), porém não foi possível observá-lá nem antes e nem após a inoculação com *M. oryzae*. Silverman et al. (1995) relataram que as plantas de arroz, normalmente tem altos índices de ácido salicílico nas folhas e que estes valores podem variar de acordo com as condições de estresse a que as plantas são expostas, como temperatura, umidade, nutrição e parasitas

Quanto a atividade da fenilalanina amônia-liase, é possível relacionar que esta enzima pode ser induzida por fermento (Saltveit, 2000) ou luz (Chen et al., 2002) e o pico da atividade enzimática ocorre entre 24 horas a 48 horas no máximo após a indução (presença do patógeno). A antecipação do pico dessa enzima, provavelmente, pode estar relacionada com a sua função no início da rota biossintética da lignina. Por outro lado, trabalhos com indutores bióticos e abióticos em bananeira e feijoeiro tem evidenciado atividade tardia da fenilalanina

amônia-liase, aos 6 dias, 8 dias e 12 dias após a indução (Campos et al., 2003; Saravanan et al., 2004).

Neste trabalho foi possível observar pico da fenilalanina amônia-liase às 5 horas após a inoculação com *M. oryzae* no tratamento com o filtrado de *S. oryzae* e às 72 horas após a inoculação com *M. oryzae* no tratamento com a suspensão de conídios de *S. oryzae*. O que comprova que esta enzima, além da lipoxigenase, também pode está relaciona com a resposta de defesa das plantas de arroz.

A aplicação de microrganismos saprófitas, sejam eles da rizosfera, epífitas ou endofíticos, desencadeia o processo de resistência sistêmica induzida (RSI) via moléculas de jasmonatos e etileno, com aumento da atividade de peroxidase, lipoxigenase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase, e em raros casos se confirma a produção de proteínas PR (van Loon, 1997).

Resultados relacionando biocontrole à indução de resistência pelo aumento de proteínas, principalmente pelo aumento de atividade algumas enzimas são encontrados com relativa freqüência na literatura (Silva, 2009). Tuzun et al. (1995) buscaram o controle de bactérias fitopatogênicas como de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* pela microbiolização de sementes de tomate com rizobactéria e mostraram um aumento de atividade de peroxidases, tal fato também foi observado por Halfeld-Vieira et al. (2006) usando um antagonista UFV-IEA6.

Para Baysal et al. (2003) e Macagnan et al. (2008) as alterações nas atividades das enzimas-chave, como da lipoxigenase e fenilalanina amônia-liase permitem acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos. Sendo assim, é possível concluir que houve tanto RSI e RSA neste estudo. Visto que, há expressão do ácido salicílico em planta tratadas com antagonista, no caso do tratamento com a suspensão de conídios de *S. oryzae* antes da presença do patógeno, o que pode ter desencadeado os processos iniciais de defesa da planta, além deste fitohormônio ser um sinalizador da rota da RSA. A RSI pode ser observada nos dois tratamentos, com filtrado e com a suspensão de conídios, devido a expressão da lipoxigenase e fenilalanina amônio-liase neste.

O fungo *S. oryzae* não produz as enzimas quitinase e β -1,3-glucanase em valores detectáveis (dados não relatados). E neste caso é possível concluir que a atividade das PR-proteínas, quitinase e β -1,3-glucanase são respostas da planta e não da presença do antagonista *S. oryzae*, pois este não produz estas enzimas.

4.4 CONCLUSÃO

O fungo *S. oryzae* é capaz de suprimir a severidade da brusone foliar em condições de casa vegetação e tem potencial promissor para estudos em campo.

O ácido salicílico tem expressão apenas no tratamento com a suspensão de conídios de *S. oryzae* antes da presença de *M. oryzae* e participa do processo de defesa da planta de arroz contra este patógeno.

As enzimas lipoxigenase e fenilalanina amônio-liase tem atividade nos tratamentos com *S. oryzae* na forma de filtrado e de suspensão de conídios e podem estar relacionadas a ativação de defesa da planta de arroz contra o patógeno *M. oryzae*, atuando na supressão da brusone foliar.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- Os isolados de *S. oryzae* apresentam variabilidade morfológica e genética;
- A maioria dos isolados de *S. oryzae* produz cerulenina;
- Há potencial antagônico *in vitro* entre *S. oryzae* contra *C. miyabeans*, *M. oryzae*, *C. miyabeans* e *T. cucumeris*;
- Os filtrados de *S. oryzae* (So 03 e So 29) conseguem atrasar a formação de tubo germinativo e inibir a formação de apressórios de *M. oryzae*;
- O fungo *S. oryzae* é capaz de suprimir a brusone foliar em casa de vegetação;
- Os picos de atividade do teore de ácido salicílico no tratamento com a suspensão de conídios de *S. oryzae* antes da inoculação com *M. oryzae* expressa uma ativação de defesa da planta de arroz.
- A atividade das enzimas lipoxigenase e fenilalanina amônio-liase relatam a presença de mecanismos bioquímicos de defesa.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. B.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1189-1193, 2007.
- ALUNNI, S.; CIPICIANI, A.; FIORONI, G.; OTTAVI, L. Mechanisms of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by phenol inhibitors and phenol / glycine synergistic inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 412, p. 170-175, 2003.
- ALVES, S. B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. **Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. Piracicaba. FEALQ, 2008, 414 p.
- ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. 501p.
- ARAÚJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.
- ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S. Progresso da brusone nas folhas e características agronômicas nas gerações avançadas de somaclones aromáticos da cultivar de arroz IAC 47. **Fitopatologia Brasileira**. Braspilia, v. 26, p. 606-613, 2001.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, v. 71, p. 441-451, 1981.
- AYYADURAI, N.; KIRUBAKARAN, S. I.; SRISHA, S.; SAKTHIVEL, N. Biological and molecular variability of *Sarocladium oryzae*, the sheath rot pathogen of rice (*Oryza sativa* L). **Current Microbiology**, v. 50, p. 319-323, 2005.
- AZEVEDO, J. L. **Fungos Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia**. Biotecnologia, Ciência; Desenvolvimento, v. 1, 1997, p. 12-15.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recente advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 1-36, 2000. BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria: [s.n], 48p., 2001.
- BALARDIN, R. S.; PASTOR-CORRALES, M. A.; OTOYA, M. M. Resistência de germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 102-103, 1990.
- BALBINOT JR, A. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; RIZZARDI, M. A.; MEROTTO JR, A.; VIDAL, R. A. Velocidade de emergência e crescimento inicial de cultivares de arroz

irrigado influenciando a competitividade com as plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n.3, p.305-316, 2001.

BAYSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, v.52, p.747-753, 2003.

BENITEZ, 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.

BERNAL, T. B.; RAMÍREZ, I. S.; LÓPEZ, M. A.; PORRAS, A. Determinación del medio de cultivo para el crecimiento y esporulación de *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams & Hawks. **Fitosanidad**, v. 6, n. 1, p. 15-18, 2002.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991, p. 223-236.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia**, v. 1, Princípios e conceitos, 3, ed. São Paulo Agronômica Ceres, 1995, p 717-728.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente, pp.80-96, 2003.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagonísticos à *Pyricularia oryzae* para o controle de brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 15, n. 3/4, p. 257-266, 1989.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2009, 341 p.

BILLS, G. F.; PLATAS, G.; GAMS, W. Conspecificity of the cerulenin and helvolic acid producing '*Cephalosporium caerulens*', and the hypocrealean fungus *Sarocladium oryzae*. **Mycological Research**, v. 108, p. 1291-1300, 2004.

BONMAN, J. M. Rice Blast. In: **Compendium of Rice Diseases**. Eds. WEBSTER, R.K.; GUNNEL, P.S. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA, 1992, p. 14-18.

BOURETT, T.M.; HOWARD, R. J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, v. 68, p. 329-342, 1990.

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.

BRIDGE, P. D.; PEARCE, D. A.; RIVERA, A.; RUTHERFORD, M. A. VNTR derived oligonucleotides as PCR primers for population studies in filamentous fungi. **Lett Appl Microbiol** 24:426–430, 1997.

BUSO, G. S. C.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 7, n 1, p. 107-117, 1998.

BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia Sclerotiorum* by seed treatment with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 34-42, 2004.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York, NY: Wiley, 1990, 532 p.

CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bacterias endofíticas no controle e inibicao in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V., ANTUNES, L. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B.; OSORIO, V. A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 129-134, 2003.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001.

CHANDRARATNA, M. F. **Genetics and breeding of rice**. Longmans. London, 1964, 389 p.

CHANG, T. T. Rice, In: SIMMONDS, N. W. (Ed) **Evolution of crop plants**. Longman. New York, 1996, p. 147-155.

CHEN, Y.; SHIN, J.; LIU, Z. Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mungbean hypocotyls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 33-39, 2002.

CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, p. 37–43, 1994.

CLERGEOT, P. H.; GOURGUES, M.; COTS, J.; LAURNS, F.; LATORSE, M. P.; PEPIN, R.; THARREAU, D.; LEBRU, M. C. *PLSI*, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. **Plant Biology**, v. 98, p. 6963-6968, 2001.

COLEN, C. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos) - Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: décimo primeira levantamento**, agosto 2014. Brasília. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_07_08_59_54_boletim_graos_agosto_2014.pdf. Acesso em: 07/2014.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. The American Phytopathological Society, Minnesota, 1983, 539 p.

CORDONA, R. *Sarocladium oryzae*: agente causal de la pudrición de la vaina del arroz em Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 33, p. 80-82, 2013.

CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at rice blast “hot spot” breeding site in eastern Colômbia. **Plant Disease**, v. 77, p. 1029-1035, 1993.

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

CÔRTEZ, M. V. C. B.; VIANA, H. F.; SILVA, F. R.; SILVA-LOBO, V. L.; SILVA, G. B.; PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. Quantificação da atividade enzimática de proteínas relacionadas à patogênese no patossistema *Oryza sativa/Magnaporthe oryzae*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás-GO, n. 34, p. 1-18, 2008.

COUCH, B. C.; KOHN, L. M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia**, v. 94, p. 683-693, 2002.

COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, pág. 406-412, 2004.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Diversidade genética**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2008. 278p.

CUTTER, E. G. Anatomia vegetal. **Parte II -órgãos experimentos e interpretação**. São Paulo, Roca, 1987. 336p.

DALLAGNOL, J. L.; NAVARINI, L.; BALARDIN, R. S.; GOSENHEIMER, A.; MAFFINI, A. A. Dano das doenças foliares na cultura do arroz irrigado e eficiência de controle dos fungicidas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 3, p. 313-318, 2006.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v.1, p.19-20, 1983.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004

EBBOLE, D.J. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 437-456, 2007.

EDWARDS, G.; WALKER, D. **C3, C4: Mechanisms, and celular and environmental regulation of photosynthesis**. Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1983. 542p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Informações técnicas sobre o arroz de terras altas: Estados de Mato Grosso e Rondônia - safras 2007/2008**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Communication: **Concern about rice production**. 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/rice2004/en/pdf/hossain.pdf>. Acesso em: 07/2014

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical databases**. Visualizado em 18 fev. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 07/2014

FILIPPI, M. C. C.; DASILVA, 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.

FILIPPI, M. C. C.; PRABHU, A. S.; LEVY, E. M. Espectro de virulência de isolados de *Magnaporthe grisea* em arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXIX, 1996, **Resumos...** Campo Grande-MS, Fitopatologia Brasileira, v. 21, p. 398, 1996.

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 27-35, 2001.

FILIPPI, M. C. C.; PRABHU, A. S. Integrated effect of host plant resistance and fungicidal seed treatment on rice blast control in Brazil. **Plant Disease**, v. 81, p. 351-355, 1997.

FOKKEMA, N. J. E. Biological control of aerial plant surfaces. In: KOMADA, H.; KIRITANI, K.; BAY-PETERSEN, J. The biological control of plant diseases. Taipei, Taiwan: **Food & Fertilizer Thecnology Center for the Asian and Pacific Region**. p. 41-48, 1990.

FOSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. **Bragantia**, v. 10, p. 139-148, 1950.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biociência - Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n.14, p. 12-16, 2000.

GARCIA, D. M.; DIAZ, C. H.; ARTILES, Y. C.; RAMOS, R. A.; RUBÍ, J. A. Characterization of the proteinases secreted by *Sarocladium oryzae*. **Biociência Aplicada**, v. 20, p. 170-172, 2003.

GNANAMANICKAM, S. S.; MEW, T. W. Interactions between *Sarocladium oryzae* and stem attacking fungal pathogens of rice. **Plant and Soil**, v. 138, p. 213-219, 2001.

GOMES, A. S.; PAULETTO, E. A.; FRANS, A. F. H. Uso e manejo da água em arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JR., A. M (Ed.) **Arroz Irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2004, p.417-455.

GOMES, R. C.; SEMÊDO, L. T.; SOARES, R.M.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 146-150, 2000.

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, p. 77-81, 2012.

GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGRY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, H. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, v. 8, p. 629-643, 1996.

GRAHAM, J. H.; LEITE JÚNIOR, R. P. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. **Plant Disease**, n. 88, p. 745-750, 2004.

GROTH, D. Leaf scald. In: WEBSTER, R.; GUNNEL, P. (Ed.). **Compendium of rice diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. p. 18.

GUNNEL, D.; EDDLESTON, M.; PHILLIPS, M. R.; KONRADSEN, F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. **BMC Public Health**, v. 7, p. 357-398, 2007.

HAGLE, S. K.; SHAW, C.G. **Avoiding and reducing losses from Armillaria root disease.** In: SHAW, C.G.; KILE, G.A. (Eds.). *Armillaria* root disease. Agricultural Handbook, n. 691. USDA Forest Service, Washington DC, USA. pp. 157-173, 1991.

HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes no filopano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidade da parte aérea da cultura.** 2002. 98 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia.). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2002.

HALFELD-VIEIRA, B.; VEIRA-JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; ALVES, H. S. S.; BARACT-PEREIRA, M.C. A indução de resistência sistêmica em tomateiro pelo filoplano autóctone residente *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1247-1252, 2006.

HAMER, J.E.; HOWARD, R.J.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science**, v. 239, p. 288-290, 1988.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, A reviews. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. ***Trichoderma* and *Gliocladium***. Taylor & Francis, London, 1998, 278 p.

HEYDARI, A.; MISAGHI, I. J. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. **Plant and Soil**, v. 202, p. 109-116, 1998.

HILLMANN, M. Ponto de equilíbrio aplicado a sistemas de produção de arroz irrigado. **ConTexto**, Porto Alegre, v. 1, n. 1, 2º semestre 2001.

HOWARD, R. J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 50, p. 491-512, 1996.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**, v. 62, p. 31-35, 1978.

IBM Corp. Released. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp, 2012.

ILO. **International Labor Organization**. World Day for Safety and Health at Work: A Background Paper. In: Focus Programme on Safe Work. Geneva: International Labour Office, The World Health Organization; 2005.

IRRI. International Rice Research Institute . **Rice Almanac: Source book for the most important economic activity on earth**. Edited by: MACLEAN, J. L.; DAWE, D. C.; HARDY, B.; HETTEL, G.P. 2002, 253 p.

JACH, G.; GÖRNBHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINSDORF, E.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, v. 8, p. 97-109, 1995.

JIA, Y.; McADAMS, S.A.; BRYAN, G. T. Direct interaction of resistance gene and virulence gene products confers rice blast resistance. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 19, n. 15, p. 4004-4014, 2000.

JIANG, Z. D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches, Study in Natural Products. **Chemistry**, v. 22, p. 245-272, 2000.

JUNAID, J. M.; DAR, N. A.; BHAT, T. A.; BHAT, A. H.; BHAT, M. A. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. **International Journal of Modern Plant & Animal Sciences**, Florida, USA, v. 1(2), p. 39-57, 2013.

KANAGAWA, A. I.; NEVES, M. A. **Biologia e sistemática de fungos, algas e briófitas**. Cardernos CB Virtual 2. UFPB, 2011, 67 p.

KEESEY, J. **Biochemica information**. Indianapolis IN, USA: Boehringer Manhein Biochemicals, 1987.

KELLOGG, E. A. Evolutionary history of grasses. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1198-1205, 2001.

KHAM, A.; HSIANG, T. The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 433-442, 2003.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4ª Ed.vol. 2, São Paulo, Agronômica Ceres, 2005, 479 p.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica**, n° 28, p. 292-295, 2002.

KERR, A.; TATE, M.E. Agrocins and the biological control of crown gall. **Microbiology Science**, v.1, p.1-4, 1984.

LAHLALI, R.; HIJRI, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani*AG3 on potato plants. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 311, p. 152-159, 2010.

LAMB, C. J.; RYALS, J. A.; WARD, E. R.; DIXON, R. A. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. **Biotechnology in Agriculture**, v. 15, p. 45-60, 1993.

LANNA-FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, p. 12-20, 2010.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.1, p. 89-96,1997.

LEITE, B.; RONCATO, L. D. B.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. In: LUZ, W. C. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 1 ed. Passo Fundo, RS, 1997, v. 5, p. 235-280.

LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R. C.; D'SOUZA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W. C.; WANG, P.; XUEWEN, P.; WAUGH, M.; HEITMAN, J. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 746-785, 2000.

LEUNG, H., BORROMEO, E.S., BERNARDO, M.A. & NOTTEGHEM, J.L. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, n. 78, p. 1227-1233, 1988.

LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F. S.; ZEIGLER, R. S.; XU, S.; HAMER, J. E. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology**, v. 83, p. 1427-1433, 1993.

LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against some phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 277-282, 2001.

LO, C. T. General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. **Plant Pathology Bulletin**, v. 7, p. 155-166, 1998.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 56-60, 2002.

LORITO, M.; HAYES, C. K.; ZONIA, A.; SCALA, F.; DEL, S. G.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E. Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides. **Molecular Biotechnology**, v. 2, p. 209- 217, 1994.

LUCAS, J. A.; SOLANO, B. R.; MONTES, F.; OJEDA, J.; MEGIAS, M.; MAÑERO GUTIERREZ, F. J. Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. **Field Crops Research**, v. 114, p. 404-410, 2009.

LUCON, C. M. M. **Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo**. n.77, ago, 2008. Disponível em:
http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. da S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.34-37, 2008.

MACLEAN, J. L.; DAWE, D. C.; HARDY, B.; HETTER, G. P. **Rice Almanac**. 3ª ed. Internacional Rice Research Institute, Los Baños, Phillipines. 2002 p. 59-235.

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, Botucatu, p. 186-188, 2008.

MALAVOLTA, V. M. A.; PARISI, J. J. D.; TAKADA, H. M.; MARTINS, M. Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos, transmissão do patógeno às plântulas e produção. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 336-340, 2002.

MARCELLO, C. M.; STEINDORFF, A. S.; PETROFEZA-SILVA, P.; SILVA-NASCIMENTO, R.; BATAUS, L. A. M.; ULHOA, C. J. Expression analysis of the exo- β -1,3- glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiological Research**, v. 165, p. 75-81, 2010.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.1, p. 69-409, 1993

MASSART, S.; JIJAKLI, H. M. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents. **Journal Microbiology**, v. 69, p. 229-241, 2006.

MASUMA, R.; TANAKA Y.; OMURA, S. Enhancement of cerulenin production by a natural zeolite, an ammonium ion-trapping agent. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 35, n. 9, p. 1184-1193, 1982.

MATSUMAE, A.; NOMURA, S.; HATA, T. Studies on cerulenin. IV. Biological characteristics of cerulenin. **The Journal of Antibiotics**, v. 17, p. 1-7, 1964.

MAZZANTI DE CASTANON, M. A.; GUTIERREZ, A. S. Enfermedades del cultivo del arroz en Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, 471 (suplemento), 2001.

MELO, I.S. Potencialidade de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W (Ed.) **Controle Biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPMA, 1991, p. 135-156.

MEW, T.W. AND GONZALES, P. **A handbook of rice seed borne fungi**. Los Baños, Laguna: IRRI ; ENFIELD, N.H. : Science Publishers, p. 27-31, 2002.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 177-185, 2008.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 50, p. 500–513, 2007.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Integração de métodos biocompatíveis no manejo de doenças e pragas: experiências em plantas ornamentais e medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 31-34, 2008.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 1-5, 2007.

NAKAZAWA, A., NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 323-328, 2001.

NAMAI, T.; KATO, T.; YAMAGUCHI, Y.; TOGASHI, J. Time-course alteration of lipoxygenase activity in blast-infected rice leaves. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 56, p. 26-32, 1990.

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A.; LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 161–169, 2000.

NAUREEN, Z.; YASMIN, S.; HAMEED, S.; MALIK, K. A, HAFEEZ, F. Y. Characterization and screening of plant growth promoting bacteria isolated from maize grown in Pakistani and Indonesian soil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, p. 447-459, 2005.

NCBI. National Center for Biotechnology Information - *Cochliobolus miyabeanus*.

Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Cochliobolus+miyabeanus>

NCBI. National Center for Biotechnology Information - *Magnaporthe oryzae*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Magnaporthe+oryzae>

NCBI. National Center for Biotechnology Information - *Monographella albescens*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Monographella+albescens>

NCBI. National Center for Biotechnology Information - *Sarocladium oryzae*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=284135&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

NCBI. National Center for Biotechnology Information - *Thanatephorus cucumeris*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=107832&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

NOMURA, S.; HORIUCHI, T.; HATA, T.; OMURA, S. The action mechanism of cerulenin. I. Effect of cerulenin on sterol and fatty acid biosynthesis in yeast. **The Journal of Biochemistry**, v. 71, p. 783-796, 1972.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 28-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*, **Federation of European Microbiological Societies: Elsevier Science**, v. 183, p. 119-123, 2000.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1039-1044, 1996.

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.

OHNO, H.; OHNO, T.; AWAYA, J.; OMURA, S. Inhibition of 6-methylsalicylic acid synthesis by the antibiotic cerulenin. **Journal of Biochemistry**, v. 78, p. 1149-1152, 1975.

OHNO, T.; AWAYA, J.; KESADO, N.; OMURA, S. Mechanism of action of CM-55 a synthetic analogue of the antilipogenic antibiotic cerulenin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 6, p. 378-392, 1974.

OHTA, H.; SHIDA, K. PENG, Y.; FURUSAWA, I.; SHISHIYAMA, J.; AIBARA, S.; MORITA, Y. A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant physiology**, v. 97, p. 94-98, 1991.

OHTAKE, M.; YAMAMOTO, H.; UCHIYAMA, T. Influences of metabolic inhibitors and hydrolytic enzymes on the adhesion of aplanospores of *Pyricularia oryzae* to wax-coated cover glasses. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 978-982, 1999.

OMURA, S. The Antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. **Bacteriological Reviews of American Society for Microbiology**, v. 40, n.3, p. 681-697, 1976.

OMURA, S.; KATAGIRI, M.; AWAYA, J.; FURUKAWA, T.; UMEZAWA, I.; ÔI, N.; MIZOGUCHI, M.; AOKI, B.; SHINDO, M. Relationship between the structures of fatty acid amide derivatives and their antimicrobial activities. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 6, p. 207-215, 1974.

OU, S. H. **Rice diseases**. 2nd ed. Kew, Surrey (England): Commonwealth Mycological Institute, 1985, 380 p.

PADMAVATI, M.; SAKTHIVEL, N.; THARA, K. V.; REDDY, A. R. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibitions by flavonoids. **Phytochemistry**, v. 46, p. 499-502, 1997.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M.; Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**, APS net, p 1-25, 2006.

PAN, S. Q.; YE, X. S.; KUC, J. Association of a β -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mold in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 39, p. 25-39, 1991.

PARMETER, J.R. & WHITNEY, H.S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: Parmeter, J.R. (Ed.) *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. London. University of California Press. 1970. pp.7-19.

PENNISI, E. Armed and dangerous. **Science**, v. 327, p. 804-805, 2010.

PIETERSE, C. M. J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S. C. M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308-316, 2009.

PINHEIRO, F. J. A.; PORTES, T. A.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Procurando um arroz c4 mediante exame anatômico foliar. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 246-254, 2000.

PORTERO, M. A. **Producción integrada del arroz en el sur de España**. Fundación Caja Rural del Sur, Sevilla, 2010, 316 p.

PRABHU, A. S. **Controle das principais doenças de arroz de sequeiro**. Informe Agropecuário, v.14, p. 58-63, 1988.

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. C. **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. 1. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2006, 388p.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. 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.; VALENTE, B. (Ed.). **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast**. Netherlands: Springer Science, p. 257-267, 2009.

PRABHU, A. S.; LOPES, A. M.; ZIMMERMANN, F. J. P. Infecção da folha e do grão de arroz por *Helminthosporium oryzae* e seus efeitos sobre os componentes de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v.15, p. 183-189, 1980.

PRABHU, A. S.; MORAIS, O. P. Blast disease management in upland rice in Brazil. Proceedings, International Upland Rice Conference, 1985, Jakarta, Indonesia. Progress in upland rice research, **Manila**, p. 382-394, 1986.

PRABHU, A. S.; SILVA, L. P.; SILVA-LOBO, V. L.; FILIPPI, M. C. C.; CESAR, M. C. *In vitro* inhibition of *Pyricularia grisea* by *Sarocladium oryzae*, the causal agent of sheath rot disease. **Tropical Plant Pathology**, v. 32, p. S258, 2007.

PRABHU, A. S.; VIEIRA, N. R. A. **Sementes de arroz infectadas por *Drechslera oryzae*: germinação, transmissão e controle**. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1989, 39p.

RAPP, P. 1,3- β -glucanase and β -glucosidase activities of *Sclerotium gluvanicum*: synthesis and properties. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2847-2858, 1989.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. New York: Exeter Software, 2000. 83p.

ROMEIRO, R.S. Controle biológico de doenças de plantas—procedimentos. Viçosa: Editora UFV. p. 172, 2007.

SAKTHIVEL, N.; AMUDHA, R.; MUTHUKRISHNAN. S. Production of phytotoxic metabolites by *Sarocladium oryzae*. **Mycological Research**, v. 106, p. 609-614, 2002.

SAKTHIVEL, N.; GNANAMANICKAM, S. S. Isolation of and assay for cerulenin produced by sheath rot pathogen *Sarocladium oryzae* (Saw) Gams. **Current Science India**, v. 55, p. 988-989, 1986.

SALTVEIT, M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, p. 61-69, 2000.

SANTOS, A. B.; PRABHU, A. S.; FERREIRA, E.; FAGERIA, N. K. Fertilização silicatada na severidade de brusone e na incidência de insetos-praga em arroz irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande-PB. v.13, n.5, p.537-543, 2009.

SANTOS, G. R.; CUNHA, A. C. F.; IGNACIO, M.; CASTRO NETO, M. D.; REIS, M. R.; AGUIAR, R. W. S. Diversidade de Magnaporthe grisea em arroz de terras altas no sul do Estado do Tocantins, na safra 2008/09. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 1, p. 65-70, 2012.

SANTOS, G. R.; KORNDÖRFER, G. H.; REIS FILHO, J. C. D.; PELÚZIO, J. M. Adubação com silício: influência sobre as principais doenças e sobre a produtividade do arroz irrigado por inundação. **Revista Ceres**, v.50, n. 287, p.1-8, 2003.

SANTOS, G. R.; RANGEL, P. H. N.; SANTIAGO, C. M.; LEÃO, F. F.; MARRA, B.; ALMEIDA, J. D. Reação a doenças e caracteres agronômicos de genótipos de arroz de várzeas no estado do Tocantins. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 26, p. 51-57, 2005.

SARAVANAN, T.; BHASKARAN, R.; MUTHUSAMY, M. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt. **Plant Pathology Journal**, v. 3, p. 72-80, 2004.

SAWADA, R. **Descriptive catalogue of Formosan fungi II Report**, Government Research Institute Department of Agriculture (Formosa) v.2, p.135, 1922.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 227-248.

SENA, A. P. A. **Supressão de Magnaporthe oryzae com Epicoccum sp.**2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2012.

SHAIKH, S. A.; DESHPANDE, M. V. Enzimas quitinolíticas: sua contribuição para a pesquisa básica e aplicada. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 486-475, 1993.

- SHAJABAN, A. K.; HARAHA, Z.; RUSH, M. C. Sheath Rot of Rice Caused by *Acrocyndrium oryzae* in Louisiana. **Plant Diseases Reporter**, v. 61, p. 307-310, 1977.
- 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, E. G.; MOURA, A. B.; BACARIN, M. A.; DEUNER, C. C. Alterações metabólicas em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas por *Pseudomonas* sp. e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 98-104, 2009.
- SILVA, F. B.; SILVA, F. J. T.; FERNADES, F. S.; LEAL, L. V.; POLETTO, I. Isolamento e seleção de *Trichoderma* spp. antagonistas à *Pestalotiopsis clavispora*, patógeno da noqueira pecã. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8(3), p. 109-118, 2013.
- SILVA, L.P.S.; PRABHU, A.S.; SILVA-LOBO, V.L.; FILIPPI, M.C.; CÉSAR, M.C. Inibição in vitro de *Pyricularia grisea* por *Sarocladium oryzae*, o agente causal da podridão da bainha em arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XL., 2007. **Resumos...** Maringá: Fitopatologia Brasileira, v.32, p. S 258, ago. 2007.
- SILVA-LOBO, V. L. Efeito do tratamento químico de sementes de arroz no controle da brusone nas folhas e na qualidade sanitária e fisiológica das sementes. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 162-166, 2008.
- SILVERMAN, P.; SESKAR, M.; KANTER, D.; SCHWEIZER, P.; METRAUX, J. P.; RASKIN, I. Saalicylic acid in rice. Biosynthesis, conjugation, and possible role. **Plant Physiology**, v. 108, p. 633-639, 1995.
- SKAMNIOTI, P.; GURR, S. J. **Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease**. Review: Trends in Biotechnology, v. 27, n. 3, p. 141-150, 2009.
- SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos**. 2006. 217 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.
- SOUSA, C. S. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; ALMEIDA, G. M. C. O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1759-1766, 2006.
- SUTIC, D. D.; SINCLAIR, J. B. **Anatomy and physiology of diseased plants**. Boston: CRC Press, 1991. 232p.
- SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxon: CAB International, 1992. p. 1-26.

THINES, E.; ANKE, H.; WEBER, R. W. S. Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection morphogenesis in phytopathogenic fungi. **Mycological Research**, v. 108, p. 14–25, 2004.

TIWARI, A. K. **Biological control of chick pea wilt complex using different formulations of *Gliocladium virens* through seed treatment**. Ph.D. thesis submitted to G. B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar India, p. 167, 1996.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; MARCO, J. L.; POÇAS-FONSECA, M. J.; FELIPE, M. S. S. O uso de leveduras e fungos filamentosos para expressão heteróloga de enzimas. In: BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 3. p. 55-69.

TSCHEN, J. S.; CHEN, L.; HSICH, S.; WU, T. Isolation and phytotoxic effects of helvolic acid from plant pathogenic fungus *Saracladium oryzae*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 38, p. 251-256, 1997.

TSCHEN, J. S.; WEN, F. S. Physiological studies on etiology of tge sterility or rice plantas. **Journal Plant Protect**, v. 22, p. 57-62, 1980.

TSUDA, K.; SATO, M.; GLAZEBROOK, J.; COHEN, J. D; KATAGIRI, F. Interplay between MAMP triggered and SA-mediated defense responses. **The Plant Journal**, v. 53, p. 763–775, 2008.

TUZUN, S.; KLOEPPER, J. W. Potential application of plant growth promoting rhizobacteria to induce systemic disease resistance. In: R. HAMMERSCHMIDT,; J. KUC (Ed.). *Induced resistance to diseases in plants*. Dordrech: **Kluwer Academic Publishers**, p. 115-127, 1995.

TWEDDELL, R. J.; JABAJI-HARE, S. H.; CHAREST, P. M. Production of chitinases and β -1,3-glucanases by *Stachybotryselegans*, a mycoparasite of *Rhizoctoniasolani*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 489-495, 1994.

VAHL, L. C. **Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. 1991. 167 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 1991.

VAN LOON, L. C., REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135–162, 2006.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. M.; PITERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

- VAN NGUYEN, N.; FERRERO, A. Meeting the challenges of global rice production. **Paddy Water Environ**, v. 4, p. 1-9, 2006.
- VANCE, D.; GOLBERG, U.; MITSUHASHI, O.; BLOCH, K.; OMURA, S.; NOMURA, S. Inhibition of fatty acid synthetases by the antibiotic cerulenin. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 48, p. 649-656, 1972.
- VÁZQUEZ-GARDIDUENÃS, S.; LEAL-MORALES, C. A., HERRERA-ESTRELLA, A. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 89, p. 1442-1446, 1998.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p 1-10, 2008.
- VINHA, M. B.; PINTO, C. L. O.; PINTO, C. M. F.; SOUZA, C. F.; SOUZA, M. R. M.; OLIVEIRA, L. L. Impactos do uso indiscriminado de agrotóxicos em frutas e hortaliças. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.1, n.1, p. 102-107, 2011.
- WALTERS, D.; HEIL, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, p. 3-17, 2007.
- WANG, X. Lipid signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 329-336, 2004.
- WEBSTER, R. K.; GRUNNEL, P. S. **Compendium of rice disease**. Minnessota: APS
- WELLER, D. M. Biological control of rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 379-407, 1988.
- WILSON, R. A., AND TALBOT, N. J. Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Nature Review: Microbiology**, v. 7, p. 185-195, 2009.
- WOLSKI, E. A.; LIMA, C.; AGUSTI, R.; DALEO, G. R.; ANDREU, A. B.; LEDERKREMER, R. M. An α -glucan elicitor from the cell wall of biocontrol binucleate *Rhizoctonia* isolate. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 340, p. 619-627, 2005.
- WU, C. T.; BRADFORD, K. J. Class I chitinase and beta-1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiology**, v. 133, p. 263-73, 2003.
- XU, J. R.; HAMER, J. E. MAP Kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenesis growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Genes and Development**, v. 10, p. 2696-2706, 1996.

- YALPANI, N., SILVERMAN, P., WILSON, T.M.A., KLEIER, D.A., RASKIN, I. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. **Plant Cell**, v. 3, p. 809-818, 1991.
- YING, H. X.; QIONG, L. X.; LI, W.; LING, W.; FEI, L.; SHENG, C. Y.; MING, C. Z.; PING, L. Y.; HUA, P. Q. Identification of the novel recessive gene pi55(t) conferring resistance to *Magnaporthe oryzae*. **Science China: Life Sciences**, v. 55, n. 2, p. 141-149, 2012.
- YU, Q.; LIU, Z.; LIN, D.; ZHANG, W.; SUN, Q.; ZHU, J.; LIN, M. Characterization and evaluation of *Staphylococcus* sp. Strain LZ16 for the biological control of rice blast caused by *Magnaporthe oryzae*. **Biological Control**, v. 65, p. 338-347, 2013.
- ZEIGLER, R. S., LEONG, S. A., AND TENG, P. S. In: ZEIGLER, R. S. **Blast Disease**, 1994, p 267-292.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, London, v. 23, p. 753-771, 2006.
- ZHANG, J.; ZHOU, J. M. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. **Molecular Plant**, v. 3, n. 5, p. 783-793, 2010.
- ZHU, B. L.; CHEN, T. H. H.; LI, P. H. Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. **Planta**, v. 198, p. 70-77, 1996
- ZHU, Y.; PAN, J.; QIU, J.; GUAN, X. Isolation and characterization of a chitinase gene from entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 314-320, 2008.
- ZUCCHI, T.B.; MELO, I.S. Controle biológico de fungos aflatoxigêncios. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2009, p 69-85.