

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 37

Inibição do Desenvolvimento Micelial de *Magnaporthe Oryzae* por Metabólito Extracelular Produzido por *Sarocladium Oryzae*

Márcio Vinícius de Carvalho Barros Côrtes
Débora Cristina de Sousa Lima
Valácia Lemes da Silva Lobo
Marta Cristina Corsi de Filippi
Anne Sitarama Prabhu

Santo Antônio de Goiás, GO
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462 - Km 12 - Zona Rural - Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 3533 2123

Fax: (62) 3533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Camilla Souza de Oliveira*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Membros: *Flávia Aparecida de Alcântara*

Luís Fernando Stone

Ana Lúcia Delalibera de Faria

Heloísa Célis Breseghello

Roselene de Queiroz Chaves

Henrique César de Oliveira Ferreira

Raquel Neves de Mello

Murillo Lobo Junior

Supervisão editorial: *Camilla Souza de Oliveira*

Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

Versão online (2012)

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Inibição do desenvolvimento micelial de *Magnaporthe oryzae* por metabólito extracelular produzido por *Sarocladium oryzae* / Marcio Vinicius de Carvalho Barros Córtes ... [et al]. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2012.

12 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 37)

1. Brusone. 2. *Sarocladium oryzae*. 3. Controle biológico. I. Córtes, Marcio Vinicius de Carvalho Barros. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 633.1894 (21. ed.)

© Embrapa 2012

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	7
Introdução.....	8
Material e métodos.....	8
Resultados e discussão	9
Conclusões.....	11
Referências	11

Inibição do Desenvolvimento Micelial de *Magnaporthe Oryzae* por Metabólito Extracelular Produzido por *Sarocladium Oryzae*

Márcio Vinícius de Carvalho Barros Côrtes¹

Débora Cristina de Sousa Lima²

Valácia Lemes da Silva Lobo³

Marta Cristina Corsi de Filippi⁴

Anne Sitarama Prabhu⁵

Resumo

A brusone (*Magnaporthe oryzae*) é a principal doença da cultura do arroz. Algumas estratégias para o biocontrole vêm sendo estudadas como integrantes do manejo integrado da doença. Com o objetivo de caracterizar parcialmente o filtrado da cultura de *Sarocladium oryzae* responsável por antagonismo a *M. oryzae*, o isolado CNPAF So 20G de *S. oryzae* foi inoculado em meio de cultura líquido e incubado à 30 °C. Após filtração do meio, sua fração apolar foi extraída e concentrada. Os cristais obtidos foram solubilizados em etanol. A solução foi diluída e adicionada em diferentes proporções em placas de Petri contendo meio BDA, gerando cinco tratamentos: 0,08, 0,15, 0,35, 0,75, 1,0 (µL de solução/mL de meio) que foram inoculados com discos de *M. oryzae* de cinco mm de diâmetro e incubadas a 25 °C por 10 dias. Foram

¹ Farmacêutico, Mestre em Bioquímica, analista Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, marciov@cnpaf.embrapa.br

² Graduanda em Farmácia, bolsista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, deborah_cristina@hotmail.com

³ Engenheira Agrônoma, Doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, valacia@cnpaf.embrapa.br

⁴ Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, cristina@cnpaf.embrapa.br

⁵ Biólogo, Ph.D. em Fitopatologia, bolsista do CNPq, pesquisador aposentado da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, prabhu@cnpaf.embrapa.br

feitas as medições dos diâmetros das colônias e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Foi observada relação linear inversa entre a proporção de metabólito extracelular apolar produzido por *S. oryzae* e o crescimento micelial de *M. oryzae*. Os dados mostraram que a utilização de *S. oryzae* no controle biológico da brusone pode ser uma estratégia promissora.

Termos para indexação: brusone, manejo integrado, *Sarocladium oryzae*.

Inhibition of *Magnaporthe oryzae* mycelia growth by extracellular metabolites of *Sarocladium oryzae*

Rice blast (*Magnaporthe oryzae*) is the most destructive disease worldwide. Some biocontrol strategies have been investigated for integrated disease management. The aim of this study was to characterize the extracellular metabolites of a rice pathogen *Sarocladium oryzae*. The isolate of *S. oryzae* CNPAF So 20G was cultivated in a liquid medium and incubated at 30° C. After 48 hours it was filtered and the non polar fraction was extracted and concentrated in ethanol. The *S. oryzae* filtrate solution was tested for antagonistic effect to *M. oryzae* in a bioassay using six treatments and three replications. The treatments consisted of the following concentration of 0, 0.08, 0,15, 0.35, 0,75 and 1.0 μL of extracellular metabolite per mL of BDA. Five millimeter discs containing *M. oryzae* were transferred to the BDA plates and incubated at 25 °C for 10 days. The colony growth was measured, the results were statistically analyzed and the treatments compared by Tukey test at 5% probability. There was a negative correlation between extracellular metabolite concentration and *M. oryzae* colony growth indicating that *S. oryzae* is one of the potential biological control agents for rice blast control.

Key words: Blast, Integrated management, *Sarocladium oryzae*

Introdução

Magnaporthe oryzae B. Couch (anamorfa *Pyricularia oryzae* Cavara) é o agente causal da brusone, a principal doença relacionada à cultura do arroz. Atualmente a doença é controlada pelo uso de fungicidas, que apesar de serem agressivos ao meio ambiente constituem uma estratégia eficiente. O uso de cultivares resistentes também é considerado estratégia eficiente, mas possui a desvantagem da resistência não ser durável devido a grande diversidade genética dessa espécie de fitopatógeno (FILIPPI et al., 2011).

Visando alternativas que possibilitem um melhor manejo da brusone em lavouras de arroz, diversas estratégias para o biocontrole da doença vêm sendo estudadas. Silva et al. (2007) observaram, *in vivo* e *in vitro*, o antagonismo entre *M. oryzae* e *Sarocladium oryzae*, porém não identificaram a causa da inibição do desenvolvimento micelial do primeiro fungo pelo segundo. Uma das possibilidades de atuação do controle biológico é a produção de metabólitos pelo antagonista, que afetam o crescimento do patógeno.

A caracterização desse antagonismo pode levar a um potencial biocontrolador da brusone e dessa forma o presente trabalho teve como objetivo a caracterização parcial do agente responsável pelo efeito antagônico entre isolados de *S. oryzae* e de *M. oryzae*, avaliando a ação do metabólito extracelular produzido pelo primeiro sobre o desenvolvimento micelial do segundo.

Material e métodos

Um isolado de *S. oryzae* pertencente à coleção de fungos e microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão (CNPAF So 20G) foi inoculado em 100 mL de meio de cultura líquido (3% de glicerol, 1% de glicose, 0,5% de peptona e 0,2% de NaCl) e incubado por quatro dias sob agitação orbital à 30 °C.

O material foi filtrado e teve seu metabólito extracelular apolar extraído por técnica de fracionamento com clorofórmio (MASUMA et al., 1982). O extrato foi concentrado até originar cristais de coloração amarelada, que foram adicionados em quantidade mínima de etanol 99% para a completa solubilização (volume final de 1,5 mL). A solução obtida sofreu diluição 1:10 (v/v) em água esterilizada e foi adicionada à 20 mL do meio ágar batata dextrose em diferentes proporções, gerando os cinco tratamentos: 0,08, 0,15, 0,35, 0,75, 1,0 (uL de solução / mL de meio BDA), mais a testemunha.

O ensaio foi realizado em triplicata. As placas contendo os tratamentos foram inoculadas com discos *M. oryzae* (CNPAF Py 435) de 5 mm de diâmetro e incubadas a 25 °C por 10 dias (Figura 1). Ao fim desse período os diâmetros das colônias foram medidos com auxílio de paquímetro digital e os resultados foram analisados por regressão simples. O teste de significância do coeficiente de regressão foi efetuado através do teste *F* a 1%.

Resultados e discussão

Foi observada a inibição do desenvolvimento micelial de *M. oryzae* pelo metabólito produzido por *S. oryzae*, comprovando que o antagonismo entre essas espécies, previamente mostrado por Silva et al. (2007), decorre da atividade antifúngica do(s) metabólito(s) produzidos pelo último.

Os dados desse trabalho apresentaram uma relação linear inversa entre a proporção de metabólito extracelular apolar produzido por *S. oryzae* e o desenvolvimento micelial de *M. oryzae* (Figura 2). O tratamento de 1 uL.mL⁻¹ foi o que apresentou maior ação inibitória sobre o desenvolvimento micelial de *M. oryzae*, tendo esse tratamento inibido em aproximadamente 80% o desenvolvimento da colônia em relação à testemunha.

É válido ressaltar que o controle biológico vem sendo estudado para o controle de doenças do arroz, inclusive da brusone (LUDWIG; MOURA, 2009). O tratamento de sementes de arroz com a espécie bacteriana *Pseudomonas fluorescens* mostrou ser mais eficiente em comparação

ao fungicida Tricyclazole e Carbendazim, em condições de casa de vegetação e de campo (CHATTERJEE et al., 1996; VIDHYASEKARAN et al., 1997). Seu efeito parece estar relacionado ao antagonismo e também à indução de resistência de plantas de arroz pelo microrganismo (FILIPPI et al., 2011). A abordagem apresentada no presente trabalho aponta um possível novo caminho para o controle biológico no manejo da brusone, utilizando como meio o antagonismo entre as espécies estudadas.

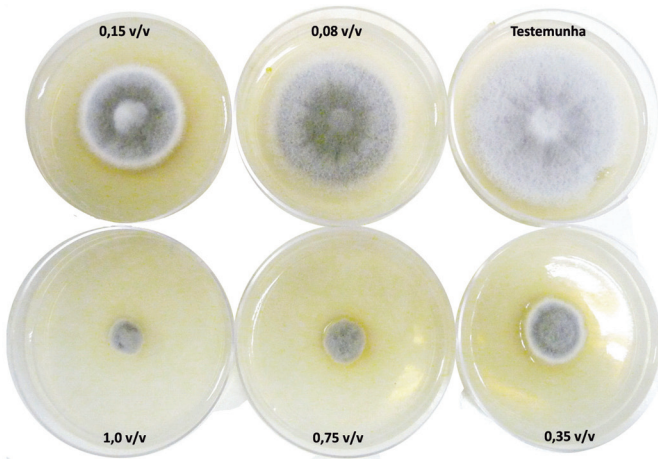


Figura 1. Placas de Petri contendo os cinco tratamentos e a testemunha. Ao centro das placas as colônias de *M. oryzae* com diferentes tamanhos de diâmetro, relacionados aos respectivos tratamentos.

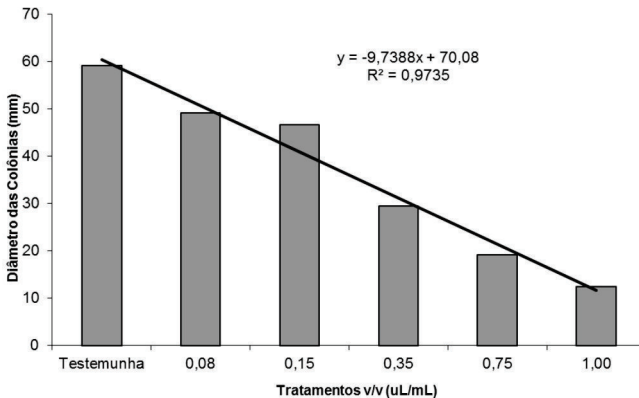


Figura 2. Efeito dos diferentes tratamentos sobre o desenvolvimento micelial de *M. oryzae*. *O coeficiente de regressão foi significativo pelo teste *F* a 1%.

Conclusões

- 1) O agente responsável pelo efeito antagônico entre os isolados de *M. oryzae* e *S. oryzae* é o metabólito extracelular com característica apolar produzido por este último.
- 2) Os dados mostram que a utilização de *S. oryzae* no controle biológico da brusone pode ser uma estratégia promissora, necessitando de maiores estudos.

Referências

CHATTERJEE, A.; VALASUBRAMANIAN, R.; MA, W. L.; VACHHANI, A. K.; GNANAMANICKAM, S.; CHATTERJEE, A. K. Isolation of ant mutants of *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14 altered in antibiotic production, cloning of ant(+) DNA, and evaluation of the role of antibiotic production in the control of blast and sheth blight of rice. **Biological Control**, San Diego, v. 7, n. 2, p. 185-195, Oct. 1996.

FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B. da; SILVA-LOBO, V.; 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**, San Diego, v. 58, n. 2, p. 160-166, Aug. 2011.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B. Controle biológico de *Bipolaris oryzae* no arroz irrigado In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 317-330.

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.

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. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, p. S 258, ago. 2007. Suplemento. Ref. 0747. Edição dos Resumos do XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Maringá, PR, ago. 2007.

VIDHYASEKARAN, P.; RABINDRAN, R.; MUTHAMILAN, M.; NAYAR, K.; RAJAPPAN, K.; SUBRAMANIAN, N.; VASUMATHI, K. Development of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 291-297, June 1997.