

## Influência da idade, número de repicagens e coloração dos micélios na esporulação de isolados de *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone em arroz no estado do Tocantins

*Gil Rodrigues dos Santos<sup>1</sup>, Justino José Dias Neto<sup>3</sup>, Ildon Rodrigues do Nascimento<sup>2</sup>, Henrique Guillhon de Castro<sup>1</sup>, Manoel Delintro de Castro Neto<sup>2</sup>*

### Resumo

O fungo *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone do arroz, apresenta uma série de limitações de cultivo em condições controladas. Algumas características podem ser variáveis até para um mesmo isolado e exigem adaptações ou inovações dos pesquisadores para possibilitar o desenvolvimento de ensaios. Este trabalho teve o objetivo verificar, de isolados monospóricos de *M. oryzae* da raça IA-1 coletados no Projeto Rio Formoso, município de Formoso do Araguaia, a durabilidade das culturas armazenadas em laboratório, a quantidade máxima de repicagens para manter a produção satisfatória de conídios pelas colônias e a relação de diferentes colorações das culturas em meio BDA com a produção de conídios. Para tanto, realizou-se três ensaios em delineamento inteiramente casualizado. No Ensaio I, utilizaram-se culturas com 10, 14, 18, 22, 26 e 30 dias após a repicagem. No Ensaio II, utilizaram-se culturas com 0, 1, 2, 3 e 4 repicagens a partir da cultura original. No Ensaio III, classificaram-se as culturas como Negra, Centro cinza com largas bordas brancas, Cinza, Centro cinza com estreitas bordas brancas e Branca. Maiores esporulações de *M. oryzae* foram obtidas em culturas com 14 dias após a repicagem, na segunda repicagem e de coloração negra.

**Palavras-chave:** *Pyricularia oryzae*; arroz; brusone; conidiogênese; características fenotípicas

### Influencia de la edad, número de repicagens y coloración de lo micelio en la esporulación del aislados de *Magnaporthe oryzae*, causante de lo añublo del arroz en el estado de Tocantins

### Resumen

El hongo *Magnaporthe oryzae*, causante de lo añublo del arroz (Bruzone), presenta una serie de limitaciones a los cultivos bajo condiciones controladas. Algunas características pueden ser variables, incluso para un mismo aislado y requieren innovaciones por los investigadores para permitir el desarrollo de las pruebas. Este estudio tuvo como objetivo verificar, en esporas aisladas *M. oryzae* raza IA-1 recogidas en el Proyecto Río Formoso, municipalidad de Formoso do Araguaia, la durabilidad de los cultivos almacenados en el laboratorio, la cantidad máxima de repicagens para mantener la producción satisfactoria de las conidias por las colonias y la relación de diferentes colores de las culturas en medio BDA con la producción de conidias. Con este fin, se llevó a cabo tres experimentos en el diseño completamente al azar. En el estudio I, se utilizaron las culturas con 10, 14, 18, 22, 26 y 30 días después de la repicagen. En el estudio II, se utilizaron las culturas con 0, 1, 2, 3 y 4 repicagens de la cultura original. En el estudio III, los cultivos fueron clasificados como Negro, centro Gris con bordes anchos, Gris, centro Gris con bordes Blancos estrechos y Blanco. Mayores esporulaciones de *M. oryzae* se obtuvieron a los 14 días después del trasplante, en la segunda repicagen y de la coloración negra.

**Palabras clave:** *Pyricularia oryzae*; añublo del arroz; conidiogénesis; características fenotípicas

Recebido em: 26 nov. 2009. Aceito para publicação em: 27 mar. 2010.

1 Professores do curso de Mestrado em Produção Vegetal.

2 Discente do Curso de Mestrado em Produção Vegetal. UFT - Universidade Federal do Tocantins, Caixa Postal 66, 77410-000, Gurupi, TO, Brasil.

3 Discente do Curso de Doutorado em Fitopatologia - Embrapa Cenargen. Av. W5 norte (final). Parque Estação Biológica - Asa, 70770-917 - Brasília, DF - Brasil.

\*Autor para correspondência: e-mail: ildon@uft.edu.br

## Introdução

A brusone é uma das mais importantes doenças conhecidas para a cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) devido a sua ampla distribuição geográfica e a capacidade de causar danos nas plantas (NUNES et al., 2007), provocando enormes prejuízos na produtividade e na qualidade dos grãos (RANGEL et al., 1992). O agente causal da brusone do arroz é o fungo *Magnaporthe oryzae* (T.T. Hebert) M.E. Barr [anamorfo *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc.]. Mesmo sendo um agente biológico amplamente estudado, *M. oryzae* apresenta uma série de limitações de cultivo em condições controladas.

Entre os problemas da manutenção *in vitro* de isolados de *M. oryzae*, destaca-se o envelhecimento das culturas, que normalmente acarreta perda de vigor dos conidióforos e diminuição da esporulação provocado pelo empobrecimento do meio de cultura e/ou acúmulo de metabólitos excretados durante o desenvolvimento do microrganismo no substrato (APARECIDO et al., 2007). A necessidade de repicagens periódicas representa um trabalho exaustivo. Essa prática resulta em problemas tais como perda da viabilidade, mudanças morfológicas e fisiológicas (aspecto e coloração das culturas), decréscimo e/ou perda da capacidade de esporulação e, posteriormente, na maioria dos casos na perda da patogenicidade dos isolados (BUENO et al., 2006; MEYER et al., 2006; VECHIATO et al., 2003; IGNOFFO et al., 1982).

Na prática essas alterações que ocorrem nos isolados são decorrentes da constante manipulação exigida devido ao método de conservação que exigem repicagens sucessivas (APARECIDO et al., 2007). Portanto, a necessidade de manutenção e manipulação dos isolados exigem estudos que caracterizem o efeito da preservação *in vitro* sobre as características patogênicas e reprodutivas dos isolados de *M. oryzae*.

Diante desses aspectos, o trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de repicagens sucessivas sobre a viabilidade e características morfológicas de isolados de *M. oryzae* mantidas em laboratório, coletados no Projeto Rio Formoso, município de Formoso do Araguaia, estado do Tocantins.

## Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Tocantins - UFT, Campus de Gurupi, estado do Tocantins. Foram realizados três experimentos - Ensaio I: Efeito da idade do micélio sobre a produção de conídios de *M. oryzae*; Ensaio II: Efeito do número de repicagens sobre a produção de conídios *M. oryzae*; e Ensaio III: Efeito da conservação *in vitro* sobre a coloração dos micélios de *M. oryzae*. Todos os ensaios foram realizados no delineamento inteiramente casualizado (DIC).

### Ensaio I : Efeito da idade do micélio sobre a produção de conídios de *M. oryzae*

O ensaio foi instalado com seis tratamentos e quatro repetições. Foi utilizado um isolado monospórico de *M. oryzae*, pertencente à raça IA-1, repicado para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA (250 g batata, 20 g dextrose, 15 g agar e 250 mg Ampicilina). A raça IA-1 foi utilizada devido estar entre as mais prevalentes no estado (DIAS NETO et al., 2008), ser uma das mais agressivas e ter maior facilidade de esporulação. Após a repicagem as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento (B.O.D.) sob temperatura de 25°C. Cada parcela foi formada por duas placas de petri. Os seis tratamentos consistiram do tempo (em dias) de armazenamento até a indução da conidiogênese, os quais foram: T10 – Colônias com 10 dias de armazenamento; T14 – Colônias com 14 dias de armazenamento; T18 – Colônias com 18 dias de armazenamento; T22 – Colônias com 22 dias de armazenamento; T26 – Colônias com 26 dias de armazenamento; e T30 – Colônias com 30 dias de armazenamento. Em cada tratamento, para a indução da conidiogênese as placas de Petri foram mantidas em sala climatizada com temperatura entre 25 a 28 °C e umidade relativa do ar em torno de 70%, permanecendo por 48 horas sob luz fluorescente contínua, cobertas com pano crepe. Para avaliação, em cada placa foi colocado 20 mL de água destilada estéril e realizada raspagem com o auxílio de um pincel de cerdas macias despreendendo os conídios dos conidióforos. A suspensão foi filtrada em gaze e

os conídios quantificados em Câmara de Neubauer. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p= 0,05$ ) utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2006).

### **Ensaio II. Efeito do número de repicagens sobre a produção de conídios *M. oryzae***

O experimento foi constituído por cinco tratamentos e cinco repetições. Cada parcela foi formada por cinco placas de Petri. Foram utilizados os seguintes tratamentos: T0 – Esporulação da cultura original, obtida de conídio coletado da folha; T1 – Esporulação obtida a partir da primeira repicagem da cultura original; T2 – Esporulação obtida da segunda repicagem; T3 – Esporulação obtida da terceira repicagem; T4 – Esporulação obtida da quarta repicagem. Para obtenção de T0, uma amostra de folha foi retirada do refrigerador e recortados apenas os fragmentos de folhas com lesões típicas de brusone. Estes fragmentos, sem assepsia, foram colocados em uma placa de Petri com papel filtro umidificado com água estéril e levada para B.O.D. com temperatura ajustada para 25 °C por 24 horas, visando possibilitar a esporulação do fungo nas lesões. Com o auxílio de uma lupa e uma agulha de ponta fina, realizou-se a transferência dos conídios das lesões esporuladas para cinco placas de Petri contendo meio de cultura autoclavado ágar-água (20 g ágar para 1,0 L água). Em cada placa, foram colocados conídios procedentes de uma única lesão. Após a transferência dos conídios, as placas foram vedadas com plástico PVC, identificadas e colocadas em B.O.D. com temperatura ajustada para 25 °C por 48 horas. A placa que apresentou maior uniformidade entre os conídios germinados foi selecionada para ser utilizada no ensaio. Sob um microscópio estereoscópico e com o auxílio de um bisturi, cinco conídios germinados foram transferidos para placas com meio BDA. As placas foram novamente incubadas em B.O.D. em temperatura de 25 °C e, após doze dias no escuro, se obteve a cultura original (T0). Para obtenção de T1, foi realizada a repicagem de T0, para T2, de T1, e assim sucessivamente em intervalos de 12 dias. A indução da conidiogênese, avaliação da concentração de conídios e análise dos dados foram realizadas com

a mesma metodologia descrita no Ensaio I.

### **Ensaio III. Produção de conídios de isolados de *M. oryzae* agrupados segundo a coloração dos micélios**

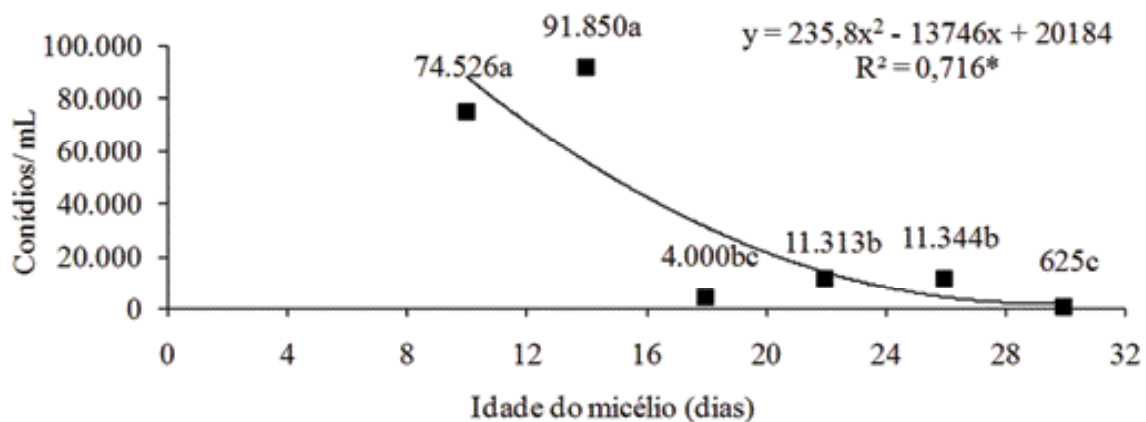
O experimento foi realizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram os padrões de coloração do micélio dos isolados monospóricos cultivados em meio BDA. Foram utilizados vinte e cinco isolados monospóricos agrupados em cinco categorias segundo a coloração dos micélios: Negra (N); Centro cinza com estreitas bordas brancas (Ce); Cinza (C); Centro cinza com largas bordas brancas (Cl); e Branca (B). Após o agrupamento dos isolados monospóricos nas suas respectivas categorias segundo a coloração típica, estes foram incubados em B.O.D. por 14 dias no escuro, sob temperatura de 25°C, quando foi avaliado a coloração dos micélios. Para indução da esporulação, quantificação e análise estatística dos dados, foram empregadas as metodologias descritas anteriormente no ensaio I.

## **Resultados e discussão**

### **Ensaio I. : Efeito da idade do micélio sobre a produção de conídios de *M. oryzae***

Os dados obtidos mostram que a idade do micélio exerceu influência significativa sobre a produção de conídios em culturas de *M. oryzae* (Figura 1). As melhores épocas para esporulação ocorreram aos 10 e 14 dias após a repicagem, apresentando, respectivamente,  $74,526 \times 10^3$  e  $91,850 \times 10^3$  conídios/mL. O período mais favorável à produção de conídios ocorreu aos catorze dias após a repicagem. CRUZ e PRESTES (2007), avaliando a esporulação de *M. oryzae* em meio BDA, obtiveram quantidade similar aos 10 dias de idade do micélio. PRABHU e FILIPPI (2006) determinaram que a melhor idade para esporulação das culturas de *M. oryzae*, em meio aveia, foi de oito a dez dias.

Após os 14 dias, a produção de conídios caiu significativamente, sendo que aos 18 dias, a capacidade de esporular diminuiu 95%. Este fato pode estar relacionado ao envelhecimento das culturas, que



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. CV= 13,87%. \* R2 significativo ao nível de 1%, com 22 graus de liberdade, de acordo com LITTLE e HILLS (1978).

**Figura 1.** Efeito da idade do micélio sobre a produção de conídios de *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone do arroz mantidas em placas de Petri em BDA.

acarreta perda de vigor dos conidióforos e diminuição da esporulação devido ao consumo do meio de cultura e/ou ao acúmulo de metabólitos excretados durante o desenvolvimento do microrganismo no substrato (APARECIDO et al., 2007).

Houve pequeno aumento na produção de conídios no período compreendido entre 18 e 26 dias, o que pode estar relacionado com a formação de novos setores nas culturas. CASTRO et al. (2006), trabalhando com *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*, causador de antracnose em feijoeiro comum, observaram formação de setores após 30 dias de desenvolvimento das culturas, havendo formação espontânea de ascósporos nestes locais. Segundo PRABHU e FILIPPI (2006), estes setores ou saltações ocorrem comumente e são formados durante o estabelecimento de isolados monospóricos de *M. oryzae*. Os mesmos autores comentam ainda que, as formações destes setores não estão bem esclarecidas, porém, têm sido atribuídas em parte à dissociação de heterocarióticos.

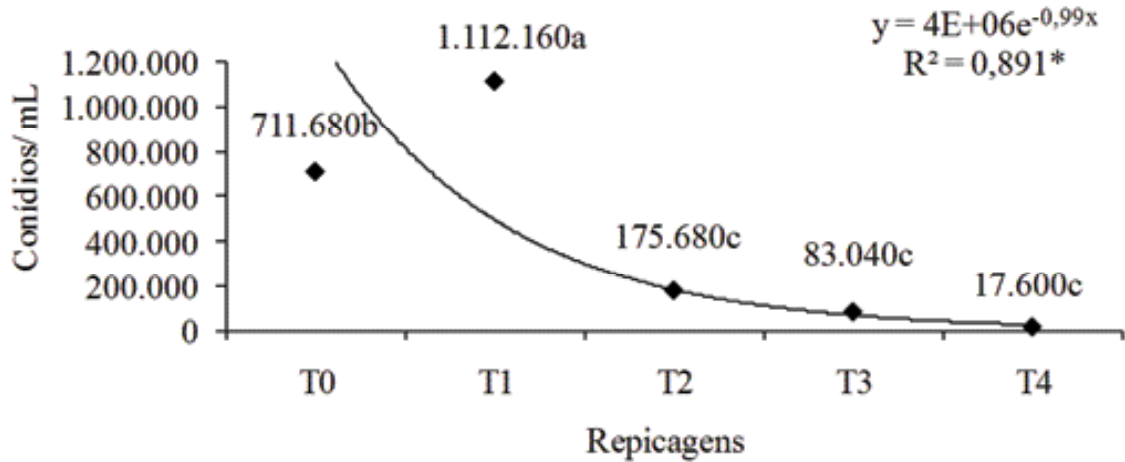
Outro fato curioso é que os setores formados de um isolado monospórico, ao serem inoculados em plantas de arroz, causam reações de resistência e de suscetibilidade diferentes da colônia principal.

## Ensaio II. Efeito do número de repicagens sobre a produção de conídios *M. oryzae*

Repicagens sucessivas em colônias de *M.*

*oryzae* podem causar alterações na quantidade de conídios produzidos (Figura 2). As melhores conidiogêneses foram produzidas na cultura original (T0) e na primeira repicagem (T1) da cultura, sendo T1 superior à T0 em  $400 \times 10^3$  conídios/mL, havendo diferença estatística significativa entre as duas. A grande esporulação ocorrida em T1 pode estar relacionada com a adaptação da colônia do fungo ao meio de cultura.

A partir da segunda repicagem (T2), houve uma grande redução na capacidade de esporulação *in vitro* das culturas. Perdas da capacidade de esporulação e de infecção de alguns patógenos são relatadas por diversos autores. CAMARGO JUNIOR (2004), trabalhando com *Glomerella cingulata*, causador da antracnose em feijoeiro comum, verificou que a produção exuberante de peritécios em grandes aglomerados só aconteceu nas primeiras placas isoladas, e que repicagens sucessivas do isolamento inicial foram perdendo a capacidade de formação de estruturas reprodutivas tanto para os parentais como para as culturas monospóricas. VECHIATO et al. (2003), trabalhando com *Diaporthe* spp. e *Diaporthe phaseolorum* causador de queima da haste e da vagem e do cancro da haste da soja, atribuíram a baixa virulência à perda de patogenicidade devido ao procedimento de repicagens sucessivas durante o período de manutenção do fungo em tubos contendo meio BDA.



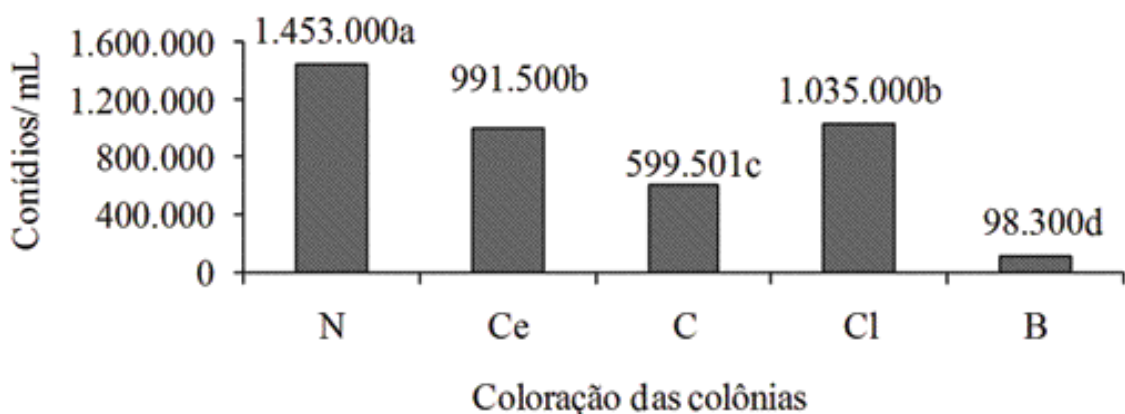
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. CV= 27,6%. \* R<sup>2</sup> significativo ao nível de 1%, com 22 graus de liberdade, de acordo com LITTLE e HILLS (1978).

**Figura 2.** Efeito do número de repicagens sobre a produção de conídios *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone do arroz em placas de petri com meio de cultura BDA.

Deve-se ressaltar também que, normalmente, as amostras mantidas por repicagens periódicas são armazenadas à temperatura ambiente, estando expostas às alterações que possam vir a ocorrer. Tais alterações elevam a frequência de mutações e, como resultado, a cultura pode vir a ser perdida (APARECIDO e FIGUEIREDO, 1997).

### Ensaio III. Produção de conídios de isolados de *M. oryzae* agrupados segundo a coloração dos micélios

A produção de conídios de *M. oryzae* foi significativamente diferente entre os distintos padrões de coloração do micélio dos isolados monospóricos (Figura 3). A maior produção de conídios foi



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. CV = 16,39%

**Figura 3.** Produção de conídios de isolados de *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone do arroz agrupados segundo a coloração dos micélios mantidos em placa de Petri em meio BDA (N - Negra; Ce - Centro cinza com estreitas bordas brancas; C - Cinza; Cl - Centro cinza com largas bordas brancas; e B - Branca).

obtida nas culturas de coloração negra (N), seguida conjuntamente pelas culturas de Centro cinza com largas bordas brancas (Cl) e Centro cinza com estreitas bordas brancas (Ce). As culturas agrupadas em Cinza (C), mesmo produzindo estatisticamente menos conídios que as anteriores, apresentaram esporulação satisfatória. A menor esporulação foi obtida na coloração Branca (B). ANDRADE et al. (2007), estudando a caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*,

causador da antracnose no mamoeiro, agruparam as culturas em diferentes colorações e verificaram que todos os isolados foram patogênicos, independente da coloração, apresentando diferenças quanto à intensidade da virulência.

## Referências

Apresentadas no final da [versão em inglês](#)