

A**ANTIBIOSE DE FUNGOS DO FILOPLANO DE PLANTAS DE ARROZ A *MAGNAPORTHE ORYZAE*****LEILA GARCÊS DE ARAÚJO**

Laboratório de Genética de Micro-organismos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil; e-mail: leilagarcesaraujo@gmail.com

RAQUEL ACÁCIO MENDANHA

Universidade Estadual de Goiás (UEG), Unidade Posse, Posse Goiás, Brasil; e-mail: negalinda_10@hotmail.com

FÁBIO JOSÉ GONÇALVES

Aluno de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás (UFG), Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil; e-mail: biofabiosp@hotmail.com

GISELE BARATA DA SILVA

Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil; e-mail: gisele.barata@ufra.edu.br

MARTA CRISTINA DA CORSI FILIPPI

Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil; e-mail: cristina@cnpaf.embrapa.br

ANNE SITARAMA PRABHU

Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil; e-mail: prabhu@cnpaf.embrapa.br

1

RESUMO: A brusone nas folhas (*Magnaporthe oryzae*) causa perdas indiretas e significativas de produtividade. As folhas de arroz são habitadas por diversos micro-organismos, incluindo fungos não fitopatogênicos importantes para o controle biológico. Objetivando selecionar os fungos do filoplano de plantas de arroz, foi realizado um experimento de campo com a cultivar Aimoré em sistema orgânico implantado sob plantio direto e convencional com quatro coberturas (crotalária, guandu, sorgo e mucuna) e pousio em quatro repetições. Foram coletadas três folhas de arroz por parcela, 70 dias após o plantio, para quantificar os fungos presentes no filoplano. Do terço médio da folha foram retirados fragmentos de 5 cm e a superfície adaxial foi pressionada sobre o meio de cultura BDA. Após 72 h, avaliou-se o número de unidades formadoras de colônia.cm⁻². A antibiose foi avaliada utilizando o método da cultura pareada. Foram identificados 15 fungos, dos quais, os mais frequentes no plantio direto foram *Sporobolomyces* sp., *Phoma* sp. e *Fusarium* sp., e no convencional, *Sporobolomyces* sp., *Phoma* sp., *Penicillium* sp. e *Cephalosporium* sp. O número de unidades formadoras de colônia.cm⁻² foi significativamente maior no sistema plantio direto do que no convencional ($P < 0,037$). Dos 15 fungos identificados, *Epicoccum* sp. e *Sporobolomyces* sp. foram antagonistas a *M. oryzae*.

PALAVRAS-CHAVE: Antagonistas, brusone, controle biológico.

ANTIBIOSIS OF RICE PHYLLOPLANE FUNGI TO *MAGNAPORTHE ORYZAE*

ABSTRACT: Rice leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) causes indirect and significant yield losses. Rice leaves are colonized by several microorganisms, including important non-pathogenic fungi involved in biological control. A field experiment was carried out using variety Aimoré in organic agriculture under no-till and conventional planting systems with four cover crops (crotalaria, pigeon pea, sorghum, green manure

crop 'mucuna'), and four replications aiming at selecting phylloplane fungi from rice leaves. Three rice leaves were collected per plot, 70 days after planting for quantifying phylloplane fungi. From the middle third of the leaves 5-cm parts were cut and the adaxial surface was pressed on the culture medium (PDA). After 72 h the number of colony-forming units.cm⁻² was assessed. Antibiosis was tested using the paired culture method. We identified 15 fungi, among which, the most frequent ones in no-till system were *Sporobolomyces* sp., *Phoma* sp., and *Fusarium* sp. and under conventional planting system, *Sporobolomyces* sp., *Phoma* sp., *Penicillium* sp., and *Cephalosporium* sp. were predominant. The number of colony-forming units.cm⁻² was significantly higher under no-till than conventional planting system ($P < 0.037$). Among the 15 phylloplane fungi identified, *Epicoccum* sp. and *Sporobolomyces* sp. showed antagonism to *M. oryzae*.

KEY WORDS: Antagonists, rice blast, biological control.

INTRODUÇÃO

O arroz [*Oryza sativa* (L.)] é considerado um produto de grande importância socioeconômica, constituindo o alimento básico de metade da população mundial. No Brasil, na safra 2008/2009, as culturas de trigo, soja, feijão e arroz apresentaram crescimento de área em comparação com a safra 2007/2008. A área total cultivada com arroz no Brasil foi de 2,9 milhões ha na safra 2008/2009 e a produção nacional, de 12,63 milhões t (CONAB, 2009).

O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo e uma das principais fontes de carboidratos, minerais, como zinco e ferro, e vitaminas, como B1 e B2 para a população mundial (Silva et al., 2002).

O desenvolvimento e a validação de um sistema de produção de arroz orgânico pode contribuir para a conservação dos recursos naturais e a agregação de renda à propriedade, garantindo a sustentabilidade da produção e a qualidade de vida da população (Mattos et al., 2002).

Um dos fatores mais relevantes a considerar nesse sistema é o controle da brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* (Barr) [anamorfo *Pyricularia oryzae* (Cav.)], que é uma das doenças mais difundidas e amplamente disseminadas em todas as regiões do mundo em que o arroz é cultivado (Malavolta et al., 2008). A brusone afeta a produtividade das cultivares de arroz de terras altas, sendo responsável por perdas de aproximadamente 50% na produtividade da cultura (Prabhu et al., 2006).

Embora o cultivo orgânico favoreça a saúde humana e o ambiente, a severidade de

doenças é maior neste sistema quando comparado ao sistema convencional (Haddad et al., 2009). Por isso, o controle biológico da brusone no sistema orgânico é uma opção viável.

O interesse pelo controle biológico tem aumentado recentemente com o intuito de encontrar outras opções além do controle químico de doenças. Os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo em um sistema biológico (Mello, 1998).

Os agentes de biocontrole podem atuar diretamente, indiretamente e também pela indução de mecanismos de defesa das plantas no controle de doenças fúngicas de plantas (Doohan, 2005).

No controle biológico de doenças, diversos micro-organismos, como fungos (El-Katatny et al., 2000), bactérias (Haddad et al., 2009; Halfeld-Vieira et al., 2004; Mizubuti et al., 1995; Romeiro et al., 2000) e leveduras (Elad et al., 1994) têm sido estudados para o controle de patógenos nas mais diferentes culturas.

Fungos antagonistas de fitopatógenos foram obtidos em vários patossistemas de sistemas radiculares, como *Thichoderma harzianum* para *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Armillaria* sp., e também de parte aérea, como para *Venturia* sp. e *Botrytis* sp. Outro fungo antagonista é o *Verticillium lecanii*, um parasita das ferrugens (Grigoletti Júnior et al., 2000).

Para o biocontrole da brusone, faz-se necessário selecionar fungos antagonistas a *M. oryzae*, os quais poderão ser utilizados no sistema orgânico de produção, no qual se permite somente o controle de doenças com base em métodos naturais. Os conhecimentos sobre os

organismos do filoplano de arroz no sistema de cultivo orgânico são escassos, pois este tipo de cultivo é praticado, na maioria das vezes, em assentamentos e pequenas propriedades familiares, que são ambientalmente equilibrados e férteis, contribuindo para a conservação dos recursos naturais e da qualidade de vida (Bettiol, 1997).

Os objetivos deste trabalho foram selecionar e identificar antagonistas fúngicos eficazes para o controle do fungo *M. oryzae* em arroz de terras altas cultivado em sistema orgânico de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTO DE CAMPO E COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Em outubro de 2006, foi realizado um experimento de campo utilizando a cultivar de arroz Aimoré em uma área experimental da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, Goiás. Os tratamentos consistiram de pousio (vegetação espontânea) e quatro coberturas: crotalária (*Crotalaria juncea* L.), guan-du [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e mucuna-preta [*Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Merr.]. O arroz orgânico foi cultivado em sistema plantio direto e em sistema convencional.

Utilizou-se delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema de parcelas subdivididas com quatro repetições. Os tratamentos aplicados nas parcelas foram os sistemas plantio direto e convencional, enquanto nas subparcelas foram as quatro coberturas e o pousio. As parcelas foram constituídas de 12 linhas com 10 m de comprimento cada, espaçadas de 40 cm. Foram coletadas três folhas de arroz por parcela, 70 dias após o plantio, para a seleção, a identificação e a quantificação dos fungos.

ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Para o isolamento dos fungos do filoplano de arroz, utilizou-se o método *imprinting*. Do terço médio das três folhas bandeiras foram retirados fragmentos de 5 cm e a superfície adaxial foi pressionada sobre o meio de

cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acidificado. As placas foram mantidas em câmara climatizada a 22°C em presença de luz para promover o crescimento dos fungos presentes no filoplano. Após 72 h avaliou-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC).cm⁻² por placa de Petri e os resultados foram analisados pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Após quatro dias da realização do *imprinting*, as colônias que se formaram individualizadas e contrastantes em sua morfologia foram transferidas para tubos de ensaio contendo BDA.

Para a identificação dos fungos, foram preparadas lâminas com parte do micélio e água. Para os fungos que não esporularam no tubo, também foram utilizados dois métodos de esporulação, o de microcultura de micélio (Sutton, 1980) e o da folha de arroz autoclavada.

Com a utilização do primeiro método, obteve-se bloco de BDA fino, que foi colocado sobre uma lâmina esterilizada; a seguir, colocou-se parte do micélio em cada lado do bloco e uma lamínula esterilizada sobre o bloco. As microculturas foram incubadas para crescimento em câmara climatizada a 22°C em presença de luz. Após 5 a 8 dias da realização da microcultura, o bloco de BDA foi descartado e a lamínula da microcultura foi utilizada para o preparo de uma lâmina em água. A lâmina da microcultura foi usada para preparar outra lâmina em 10 µL de lactofenol (20 mL de ácido láctico, 20 mL de fenol e 40 mL de glicerina).

Para a execução do segundo método, foram utilizados pedaços de 5 cm de folha de arroz autoclavada em meio ágar-água (AS) e, em seguida, foi colocado um pedaço da colônia na parte superior destes fragmentos de folha de arroz. Após 10 a 13 dias da indução da esporulação em folha de arroz autoclavada, foram feitas lâminas com água a partir das colônias. A identificação, em nível de gênero, foi feita com o uso de microscópio ótico de acordo com Barnett & Hunter (2003).

ANTIBIOSE

Como desafiante no teste da antibiose foi utilizado o isolado Py-307 de *M. oryzae*, obtido da coleção de micologia do laboratório

de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão. Este isolado, assim como os 15 outros isolados obtidos do filoplano de arroz foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA acidificado, as quais foram mantidas em câmara climatizada a 22°C por 4 dias em presença de luz para obtenção dos discos de micélio para a antibiose.

O experimento foi realizado utilizando-se o método da cultura pareada (Romeiro, 2007). Discos de micélio de 5 mm do patógeno e dos prováveis antagonistas fúngicos foram colocados no centro de placas de Petri contendo BDA acidificado, em lados opostos, distanciados aproximadamente de 3 cm, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições para cada fungo. Foram utilizadas também três placas do isolado de *M. oryzae* para crescimento em ausência do provável antagonista, como testemunha. Após 7 dias em câmara climatizada a 22°C, foi avaliada a antibiose sobre os fungos identificados do filoplano de arroz observando-se a presença ou não de halo em comparação com a testemunha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 15 fungos no filoplano (Figura 1), dos quais, os mais frequentes no plantio direto foram *Sporobolomyces* sp., *Phoma* sp. e *Fusarium* sp., e no convencional, *Sporobolomyces* sp., *Phoma* sp., *Penicillium* sp. e *Cephalosporium* sp. A análise de variância para as UFC.cm⁻² dos fungos isolados do filoplano foi significativa para tipo de sistema, tendo sido maior no sistema plantio direto do que no convencional ($F = 2,21$; $P < 0,037$).

Dos 15 fungos identificados, *Epicoccum* sp. (Figura 2) e *Sporobolomyces* sp. mostraram antagonismo *in vitro* para *M. oryzae* apresentando halo de inibição. Em trabalho de Gonçalves (2006) com arroz, o *Epicoccum* sp. também já havia mostrado antagonismo para *M. oryzae* em sistema de plantio convencional.

Larena et al. (2005) também demonstraram a eficiência de *Epicoccum nigrum* no controle da podridão parda do pessegueiro ocasionada por *Monilinia* spp. Em trigo, que também é infectado por *M. oryzae*, foi constatada a eficiência *in vitro* do fungo *Sporobolomyces* sp. (Luz, 1990; Santos, 1993).

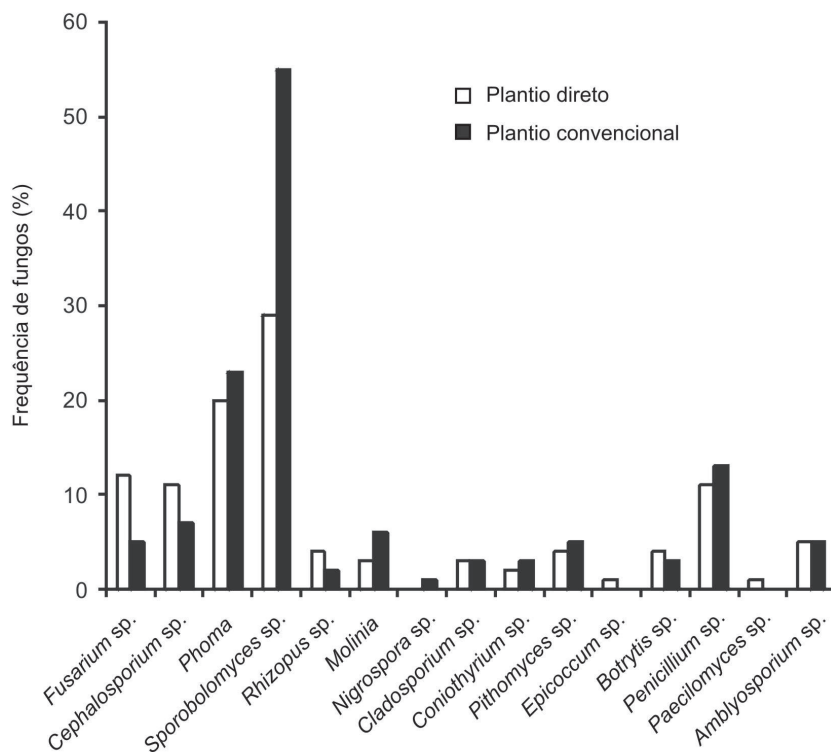


Figura 1 – Frequência de fungos do filoplano de plantas de arroz, em plantio direto e convencional, em sistema orgânico de produção.

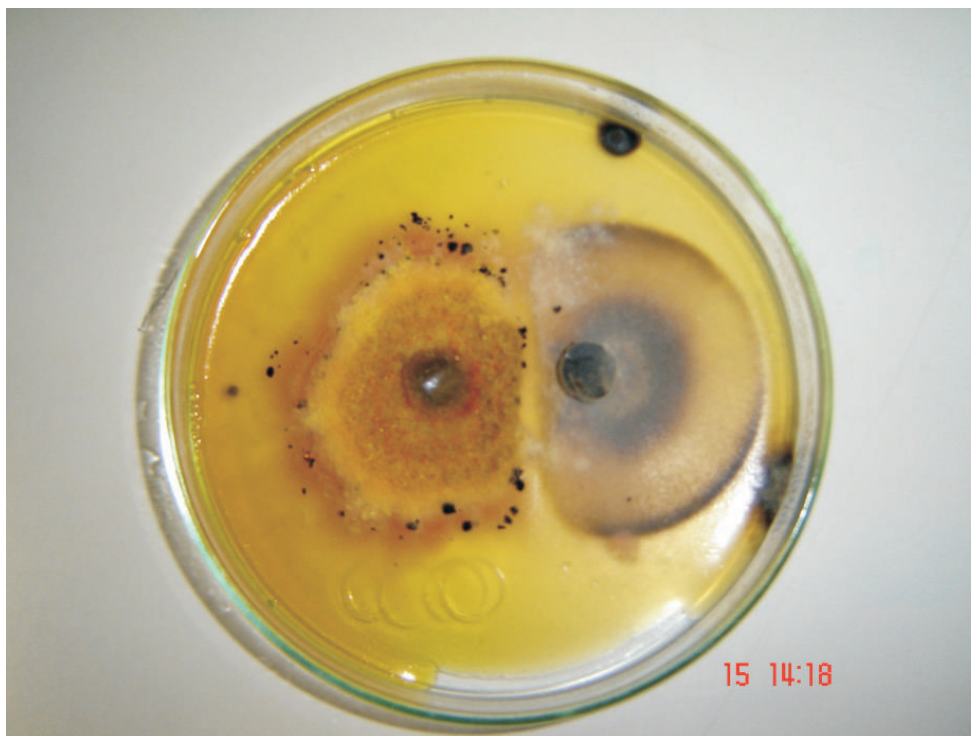


Figura 2. Antibiose de *Epicoccum* sp. (esquerda), obtido do filoplano da cultivar de arroz Aimoré, a *Magnaporthe oryzae* (direita).

Os isolados de *Epicoccum* sp. e *Sporobolomyces* sp. identificados no presente trabalho devem ser testados *in vivo* em de casa de vegetação, no campo e também deve ser verificado se podem ser indutores de resistência.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro para esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

Barnett, H. L. & B. B. Hunter. 2003. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed., The American Phytopathological Society, St. Paul, 218 p.

Bettiol, W. 1997. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. Rev. An. Patol. Plantas 5: 59-97.

CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. 2009. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos: safra 2008/2009. Décimo segundo levantamento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>

download/safra/12graos_08.09.pdf>. Acesso em: 15 dez.2009.

Doohan, F. 2005. Fungal pathogens of plants. p. 232-263. In: K. Kavanagh (Ed), Fungi biology and applications. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.

Elad, Y., J. Köhl & N. J. Fokkema. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. Phytopathology 84: 1193.

El-Katatny, M. H., W. Somitch, K. H. Robra & G. M. Gubitz. 2000. Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of phytopatogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technol. Biotechnol. 38: 173-180.

Gonçalves, J. F. 2006. Efeito da aplicação de fungicidas nos fungos do filoplano em arroz de terras altas. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização. Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO.

Grigoletti Júnior, A., A. F. Santos & C. G. Auer. 2000. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. Floresta 30: 155-165.

- Haddad, F., L. A. Maffia, E. S. G. Mizubuti & H. Teixeira.** 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biol. Control* 49: 114–119.
- Halfeld-Vieira, B. A., R. S. Romeiro & E. S. G. Mizubuti.** 2004. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. *Fitopatol. Bras.* 29: 638–643.
- Larena, I., R. Torres, A. D. Cal, M. Liñán, P. Melgarejo, P. Domenichini, A. Bellini, J. F. Mandrin, J. Lichou, X. O. Eribe & J. Usall.** 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by wet applications of *Epicoccum nigrum*. *Biol. Contr.* 32: 305–310.
- Luz, W. C.** 1990. Controle microbiano de *Pyricularia oryzae* em sementes de trigo. *Fitopatol. Bras.* 5: 134.
- Malavolta, V. M. A., L. E. Azzini, C. R. Bastos, M. V. Salomon & J. L. Castro.** 2008. Progresso da brusone nas folhas e panículas de genótipos de arroz de terras altas. *Summa Phytopathol.* 34: 186–188.
- Mattos, M. L. T., J. F. S. Martins, W. B. Savittaro, J. L. Vendrusculo, A. Andres, N. G. Cunha, D. F. Franco, J. C. Madail, M. Melo, C. D. M. Nunes & C. Silva.** 2002. Diagnóstico ambiental e socioeconômico em área de validação de sistema de produção de arroz orgânico no Rio grande do Sul. *In: 1º Congresso da Cadeia produtiva de Arroz/ 7ª Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz, Florianópolis, SC. Anais.*
- Mello, I. S.** 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos, p. 17- 67. *In: I. S. Mello & J. L. Azevedo (Eds), Controle biológico. Jaguariúna, Embrapa.*
- Mizubuti, E. S. G., L. A. Maffia, J. J. Muchovej, R. S. Romeiro & U. G. Batista.** 1995. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. *Fitopatol. Bras.* 20: 540–544.
- Prabhu, A. S., M. C. Filippi & A. S. Ribeiro.** 2006. Doenças e seu controle, p. 561-632. *In: A. B. Santos, L. F. Stone & N. R. Almeida (Eds), A cultura do arroz no Brasil. Santo Antonio de Goiás, Embrapa.*
- Romeiro, R. S.** 2007. Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos. UFV, Viçosa.
- Romeiro, R. S., D. M. S. Neves, B. A. Halfeld-Vieira, E. S. G. Mizubuti & C. C. Deuner.** 2000. Inadequação de apenas um patógeno desafiante na seleção massal de residentes de filoplano para fins de controle biológico - um caso. *Summa Phytopathol.* 26: 142.
- Santos, I.** 1993. Ação antagônica de bactérias e leveduras epífitas a diferentes isolados de *Bipolaris sorokiniana* em trigo. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Silva, M. P., A. M. Magalhães Júnior, A. Andres, D. F. Franco, F. A. Vilela, L. B. Dode & A. M. L. Schwanke.** 2002. Avaliação preliminar do rendimento industrial de híbridos de arroz irrigado em função da época de semeadura e da umidade na colheita. *In: 1º Congresso da Cadeia produtiva de Arroz/ 7ª Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz, Florianópolis, SC. Anais.*
- Sutton, B. C.** 1980. *The Coelomycetes.* Commonwealth Mycological Institute, London, 696 p.

Recebido em 10/VII/2010

Aceito em 4/V/2010