Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Mecanismos de patogenicidade do fungo *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo: crescimento e esporulação, pressão de turgor apressorial, enzimas celulolíticas e produção de metabólitos tóxicos

Thiago Anchieta de Melo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2013

Thiago Anchieta de Melo
Engenheiro Agrônomo

Mecanismos de patogenicidade do fungo *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo: crescimento e esporulação, pressão de turgor apressorial, enzimas celulolíticas e produção de metabólitos tóxicos

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Melo, Thiago Anchieta de
Mecanismos de patogenicidade do fungo *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo: crescimento e esporulação, pressão de turgor apressorial, enzimas celulolíticas e produção de metabólitos tóxicos / Thiago Anchieta de Melo. - - Piracicaba, 2013.
85 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. *Pyricuraria oryzae* 2. *Triticum aestivum* 3. Pressão de turgor 4. Apressório 5. Enzimas celulolíticas 6. Fitotoxinas I. Título

CDD 633.11
M528m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus amados pais,
Roger de Melo e Sílvia de Melo,
pelo amor incondicional, pelo apoio desmedido e por estarem tão perto, mesmo estando tão longe. Vocês são a inspiração da minha vida! Os amo muito mais do que consigo expressar. Sou grato a Deus pela vida de vocês.

Ao meu amado avô,
José Raimundo Anchieta (in memorian)
Que falta você me faz! Tenho certeza que estaria com o coração transbordante de alegria se aqui ainda estivesse. Pelo avô maravilhoso que foi para mim.

DEDICO.

Aos meus queridos irmãos,
Alexandre de Melo e Fernanda de Melo.
Por toda a alegria que me proporcionam. Pelas lágrimas e sorrisos dados juntos. Pelo amor que nos une que é maior que tudo.
À minha Babi, alegria da minha vida.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor da vida, que viu em mim, uma composição possível. Pelas oportunidades que Ele me deu, pela proteção que ofereceu, pela mão estendida em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Sérgio F. Pascholati pela oportunidade, ensinamentos precisos, apoio, confiança e amizade.

Aos meus tios que tanto torcem e acreditam em mim, especialmente à Silvana Anchieta, Marcus Anchieta, Marcelo Anchieta e Celiane Anchieta. Aos primos queridos, Adryelle Anchieta, Andrea Anchieta, Felipe Anchieta, Mateus Anchieta e Lucas Anchieta. Vocês são um presente de Deus na minha vida.

À minha avó amada, Rosa Maria Brito, por ser a avó mais espetacular desse mundo.

Às amigas, Simone Brand, Dalilla Rezende, Juliana Baggio, Isabela Primiano e Caroline Rabelo pelo apoio ao longo do curso, pelo riso fácil e momentos inesquecíveis. Meu agradecimento especial.

À amiga mais chegada que uma irmã, Meyriele Camargo, pelos sorrisos, pelas lágrimas, pelos passos dados juntos, pelo suporte, pelas palavras de carinho e por tudo o que representa para mim. Muito obrigado, “Xuxu”.

À querida amiga, Paula Panosso, pelos excelentes momentos que partilhamos, hora de aprendizado, hora de diversão. Momentos incríveis que estarão para sempre gravados no meu coração.

Ao meu querido amigo, Nestor Fonseca, que tantas vezes esteve aqui, fisicamente ou não, dando a mim todo o suporte que lhe era possível e por nunca ter me deixado sentir só. Sem você, a caminhada seria impossível.

Aos amigos da minha querida São Luís do Maranhão, por terem provado que 3.000 Km são facilmente vencidos quando se aperta o botão “ligar” no celular, especialmente à Flávvia Martins, Kely Nayara, Tainah Macieira, Walber Macieira, Carlos Eduardo Barcelar, Fernanda Carolina Araújo, Gustavo Gomes, Beatriz Gomes e Nathália Athan.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, Silvia Blumer, Luiz Rafael Pinto, Nívea Tonucci, Sara Mondoni, Caio Beraquet, Dayson Brandão e Kaira Pauli pelo convívio fácil, prazeroso e por todo conhecimento partilhado.

Um agradecimento especial à querida amiga Rafaela Roma pela imensa generosidade, apoio e prontidão em ajudar. Deus abençoe ricamente a sua vida, Rafa.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ-USP, em especial à Silvia Lourenço, Paulo Cézar Santos e Ticyana Banzato.

Ao Paulo Berni e ao Fábio Lima, amigos especiais que a vida me deu, pelo dia a dia em casa, companheirismo, conversas descontraídas e irmandade.

À querida Fabiana Wolak pela prontidão em ajudar, por toda a sua simpatia e presteza sempre que requerida.

À Dra. Maria Heloísa Moraes pelas vezes em que prontamente me ajudou e pela amizade.

À minha querida professora, amiga, Dra. Ilka Serra, quem deu comigo os primeiros passos dentro da Fitopatologia.

Ao Dr. João Leodato Nunes Maciel da Embrapa Trigo pelo apoio no envio de materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Edson Rodrigues Filho, da UFSCar, pelas dicas importantes que muito enriqueceram este trabalho.

À professora Dra. Patrícia Cia, do IAC, pelo apoio sempre que requerido.

Ao professor Dr. Nelson Massola pelo suporte e prontidão em ajudar.

Ao professor Dr. Alfredo Urashima, da UFSCar, pela contribuição e ajuda com materiais importantes para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP, fundamentais na minha formação.

Aos meus queridos amigos da graduação na Universidade Estadual do Maranhão – UEMA por estarem comigo desde o início desta caminhada, em especial, à Zilda Bianca Souza, Elizabeth Costa, Francisco Valdécio Filho, Rosa Maria Sousa, Cleydiane Pereira e Thiago Ferreira, pela amizade incondicional.

Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia/NBA/UEMA, especialmente à Edilene Gomes, Jennifer Ribeiro, Eltton Gaspar, Marcela Uli e Odenilson Lima.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Muito obrigado.

"If my concept of plant pathology is limited, the results of my work in plant pathology will also be limited; whereas, if my concept of plant pathology is unlimited, the potential of my work becomes unlimited, and more stimulating, significant, and rewarding."

William B. Hewitt

SUMÁRIO

RESUMO…… 11
ABSTRACT…… 13
1 INTRODUÇÃO…… 15
2 DESENVOLVIMENTO…….. 17
2.1 A triticultura…….. 17
2.2 Etiologia da brusone do trigo..... 18
2.3 Ciclo de vida…… 19
2.4 Sintomatologia……. 22
2.5 Parasitismo: como o fungo ataca a planta……..... 22
2.5.1 Estruturas de infecção..... 23
2.5.1.1 Conídio..... 24
2.5.1.2 Mucilagem (*Spore Tip Mucilage - STM*)..... 24
2.5.1.3 O apressório e o papel da melanina no estabelecimento do parasitismo..... 25
2.5.1.4 Ação mecânica na penetração: pressão de turgor do apressório..... 28
2.5.1.5 *Peg* de penetração..... 29
2.5.2 Enzimas extracelulares..... 29
2.5.3 Produção de metabólitos tóxicos: o papel das fitotoxinas..... 31
2.6 Origem da brusone do trigo..... 32
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 35
3.1 Hospedeiro..... 35
3.2 Isolados..... 36
3.2.1 Avaliação das condições ótimas de temperatura e fotoperíodo para o crescimento micelial e esporulação de *Magnaporthe oryzae* em diferentes meios de cultivo..... 36
3.3 Estimativa da pressão de turgor do apressório..... 37
3.4 Teor de proteínas totais do micélio..... 38
3.5 Determinação da atividade celulolítica..... 38
3.5.1 Atividade da enzima exo-β-1,4-glucanase..... 38
3.5.2 Atividade da enzima endo-β-1,4-glucanase..... 39
3.5.3 Atividade da enzima β-glicosidase..... 39

3.6 Metabólitos tóxicos..... 40
3.6.1 Quantificação da liberação de eletrólitos por condutivimetria..... 40
3.6.2 Observação dos sintomas em plântulas de *Triticum aestivum*..... 41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 43
4.1 Avaliação das condições ótimas de temperatura e fotoperíodo para o crescimento micelial e esporulação de *Magnaporthe oryzae* em diferentes meios de cultivo..... 43
4.2 Estimativa da pressão de turgor do apressório..... 50
4.3 Teor de proteínas totais do micélio..... 53
4.4 Determinação da atividade celulolítica..... 53
4.4.1 Atividade da enzima exo-β-1,4-glucanase (avicelase, celobiohidrolase)..... 53
4.4.2 Atividade da enzima endo-β-1,4-glucanase (carboximetilcelulase, CMCase)..... 55
4.4.3 Atividade da β-glicosidase (celobiase)..... 57
4.5 Metabólitos tóxicos..... 58
4.5.1 Quantificação da liberação de eletrólitos por condutivimetria..... 58
4.5.2 Observação dos sintomas em plântulas de *Triticum aestivum*..... 61
5 CONCLUSÕES..... 65
REFERÊNCIAS..... 67
APÊNDICES..... 79

RESUMO

Mecanismos de patogenicidade do fungo *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo: crescimento e esporulação, pressão de turgor apressorial, enzimas celulolíticas e produção de metabólitos tóxicos

O fungo *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo e em várias outras gramíneas, desde o seu primeiro relato no Brasil tem sido alvo de inúmeras pesquisas. O entendimento da morfologia, fisiologia e parâmetros bioquímicos deste ascomiceto é o primeiro passo para a adoção de medidas eficientes de controle da doença. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos relativos à patogenicidade do fungo *M. oryzae* em trigo, além de determinar *in vitro* as condições ótimas de temperatura e fotoperíodo para o crescimento e esporulação dos isolados testados, quantificar a pressão de turgor exercida pelo apressório no momento da penetração do substrato, verificar a presença de enzimas extracelulares produzidas pelo patógeno e o papel de cada uma delas na degradação da parede celular e, também, demonstrar a possível produção e ação de metabólitos tóxicos do fungo em plântulas de trigo. Dois isolados do fungo, Py5003 e Py6017, foram repicados para os meios de cultivo cenoura, milho-cenoura, batata-dextrose-ágar (BDA), aveia e V8, incubados, de maneira independente, sob luz contínua, escuro contínuo e fotoperíodo de 12h, por 20 dias, sendo avaliados periodicamente quanto ao crescimento micelial total e esporulação do patógeno. Em seguida, conídios germinados e com apressórios formados foram submetidos a diferentes concentrações de PEG-8000 para a mensuração da pressão de turgor apressorial. Além disso, o teor de proteínas totais foi mensurado e a atividade celulolítica determinada, por espectrofotometria indireta para os isolados cultivados em meio Merlin-Norkrans Modificado (MNM), a partir das enzimas exo e endo-β-1,4-glucanase e β-glicosidase. A produção de metabólitos tóxicos foi determinada por condutivimetria, após o cultivo dos isolados por 5 e 10 dias em batata-dextrose (BD) e obtenção dos filtrados após esse período, sendo que, a ação destes, foi observada em plântulas de trigo com 25 dias de idade. Os resultados evidenciaram melhor crescimento micelial e esporulação dos isolados em meio de cultivo composto de aveia, incubado a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. A pressão de turgor apressorial, tanto para Py5003 quanto para Py6017, concentrou-se na faixa dos 7,5 MPa. Não houve diferença estatística entre os teores de proteínas totais apresentados pelo isolados. Os dois isolados exibiram alta atividade celulolítica, com diminuição da atividade observada para endo-β-1,4-glucanase e β-glicosidase na presença de glicose e celobiose, respectivamente. A exposição de plântulas de trigo aos filtrados dos isolados do fungo *M. oryzae* provocou alta liberação de eletrólitos, sendo, em termos absolutos, Py5003 maior do que Py6017. Plântulas expostas ao filtrado, autoclavado ou não, e ao extrato bruto obtido a partir da separação dos metabólitos tóxicos em acetato de etila, apresentaram-se cloróticas e/ou necróticas. Os resultados sugerem um mecanismo de parasitismo desenvolvido por *M. oryzae* no desenvolvimento da brusone em trigo, indo desde a fase de pré-penetração, passando pelo estabelecimento das relações parasitárias estáveis e o aparecimento de sintomas e sinais na planta hospedeira.

Palavras-chave: *Pyricuraria oryzae*; *Triticum aestivum*; Pressão de turgor; Apressório; Enzimas celulolíticas; Fitotoxinas

ABSTRACT

Pathogenicity mechanisms of *Magnaporthe oryzae*, the causal agent of wheat blast: growth and sporulation, appressorial turgor pressure, cellulolytic activity and production of toxic metabolites

The fungus *Magnaporthe oryzae*, causal agent of blast in wheat and several other grasses, since its first occurrence in Brazil has been the subject of extensive research. The understanding of the morphology, physiology and biochemical parameters of this ascomycete is the first step for the adoption of efficient measures to control the disease. The objectives of this study were to evaluate the morphological, physiological and biochemical aspects related to the pathogenicity of the fungus *M. oryzae* on wheat. Thus, it were determined *in vitro* the optimal conditions of temperature and photoperiod for growth and sporulation of the isolates tested, quantified the pressure exerted by appressorium at the time of substrate penetration, verified the presence of extracellular enzymes produced by the pathogen and their role in the degradation of cell wall and also demonstrated the possible production and action of toxic metabolites of the fungus in wheat seedlings. Two isolates of the fungus, Py5003 and Py6017, were grown on carrot, maize-carrot, PDA, oat and V8 media and measure periodically for 20 days and after that period, being evaluated the total mycelia growth and sporulation of the pathogen. Then, germinated conidia and appressoria were subjected to different concentrations of PEG-8000 for the measurement of appressorial turgor pressure. In addition, the concentration of total proteins was measured and enzyme activity (exo and endo-β-1,4-glucanase, β-glucosidase) was determined by indirect spectrophotometry, for the isolates grown in Modified Melin-Nokrans (MMN) medium. The production of toxic metabolites was determined after growing the isolates for 5 and 10 days in potato-dextrose medium (PD) and obtaining the filtrate. The toxic action was evaluated in wheat seedlings (25 days old) by measuring electrolyte leakage. The results showed better mycelial growth and sporulation of the isolates in oat medium incubated at 25 °C and under a photoperiod of 12 h. Appressorial turgor pressure for both isolates were at the range of 7.5 MPa.There were no statistical differences between the levels of total protein presented by the isolates. The two isolates showed high cellulolytic activity, with decreased activity observed for endo-β-1,4-glucanase and β-glucosidase in the presence of glucose and celobiose, respectively. The exposure of wheat seedlings to the filtrates of the fungus *M. oryzae* caused high electrolyte release, being, in absolute terms, Py5003 greater than Py6017. Seedlings exposed to the filtrate, autoclaved or not, and the crude extract obtained from the separation of the toxic metabolites in ethyl acetate, exibited clorotic and/or necrotic. These results suggest a mechanism of parasitism developed by *M. oryzae* on wheat, ranging from pre-penetration through the establishment of stable parasitic relationships and the appearance of symptoms and signals in the host plant.

Keywords: *Pyricuraria oryzae*; *Triticum aestivum*; Turgor pressure; Appressorium; Cellular enzymes; Phytotoxins

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) ocupa o primeiro lugar em volume de produção mundial, algo que está em torno de 600 milhões de toneladas/ano e tem como maiores produtores mundiais a China, EUA, Índia, Canadá e Rússia (FAO, 2009). Relatórios publicados pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2012) estimou a produção mundial do cereal para o ano de 2012 de aproximadamente 690 milhões de toneladas, montante 1,4% menor do que o ano de 2011, ano recorde de produção da cultura.

No Brasil, são produzidos cinco a seis milhões de toneladas de trigo a cada ano, metade do total consumido pelo país. A área cultivada com trigo é de 2,480 milhões de hectares, distribuídos em três regiões (Sul, Sudeste e Centro-oeste) e oito estados (RS, SC, PR, MG, SP, MS, GO e DF) (FROUPE, 2010), sendo que, em 2012, a soma da área plantada com trigo no país sofreu redução média de 11,3% devido, entre outros fatores, às dificuldades de comercialização do produto, baixos preços observados na safra anterior, aumento no custo de produção, a alternativa do plantio de milho na segunda safra e os riscos inerentes da cultura, a exemplo das doenças (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012). As doenças na cultura do trigo estão entre os fatores que mais têm contribuído para a baixa produtividade do cereal, sendo favorecidas pelo excesso de chuvas com períodos longos de molhamento foliar, proporcionado também pela irrigação e por temperaturas elevadas (GOULART, 2004).

A brusone, conhecida pelos danos causados na cultura do arroz, também chamada de branqueamento da espiga, é uma das principais doenças fúngicas detectada em trigo no Brasil. Tem por agente etiológico o fungo *Magnaporthe oryzae* Couch, forma teleomórfica do fungo *Pyricularia oryzae* Cavara, sendo, no Brasil, desde o primeiro registro em 1985 no Paraná (IGARASHI et al., 1986), causa das maiores perdas de produtividade quando incide sobre a cultura (URASHIMA et al., 2004).

A sintomatologia da brusone é bastante característica, apresentando lesões elípticas de centro acinzentado em folhas e descoloração prematura da espiga acima do ponto de infecção do patógeno. Tais sintomas sugerem a possibilidade do envolvimento de fitotoxinas no processo de desenvolvimento da doença. As exoenzimas e fitotoxinas em fungos fitopatogênicos desempenham papel importante

na penetração e colonização do hospedeiro, além dos sintomas expressos pela planta decorrentes do parasitismo do patógeno, respectivamente. Sabe-se que, para um fungo infectar uma planta, é necessário que este consiga penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirar os nutrientes necessários para a sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa da planta (PASCHOLATI, 2011). A presença de exoenzimas do fungo, que degradam a superfície intacta da planta, é importante e estas desempenham papel de destaque nesta etapa do processo. Adicionalmente, as toxinas são apontadas como principais agentes causadoras de clorose e necrose em folhas de trigo. Entretanto, trabalhos como o de Aver'yanov, Lapikova e Lebrun (2007) destacam o potencial dessas moléculas como indutoras de resistência em plantas quando aplicadas em baixas concentrações, sendo, portanto, um paradoxo quando se pensa em toxina apenas como um fator relativo à patogenicidade.

Além do aspecto bioquímico, a formação de um apressório melanizado e a grande pressão de turgor exercida pelo *peg* de penetração desta estrutura, parecem ser indispensáveis ao processo de pré-penetração e penetração do hospedeiro no caso de *M. oryzae*. A camada de melanina que recobre o apressório forma uma barreira efetiva ao transporte de solutos, assim, carboidratos e lipídios são mobilizados ao interior da estrutura e ali permanecem, criando um ambiente hipertônico que induz a entrada de água para o seu interior, elevando, em muito, a pressão de turgor do apressório e a força exercida pelo *peg* de penetração, quando da penetração no hospedeiro (EBBOLE, 2007). Todo o aparato bioquímico e estrutural produzido por *M. oryzae* tem se mostrado indispensável ao parasitismo de plantas hospedeiras.

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram avaliar os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos relativos à patogenicidade do fungo *M. oryzae* em trigo, visando determinar *in vitro* as condições ótimas de temperatura e fotoperíodo para o crescimento e esporulação dos isolados testados, quantificar a pressão de turgor exercida pelo apressório no momento da penetração do substrato, verificar a presença de enzimas extracelulares produzidas pelo patógeno e o papel de cada uma delas na degradação celulolítica e demonstrar a possível produção e ação de metabólitos tóxicos do fungo em plântulas de trigo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 A triticultura

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um cereal pertencente à ordem Poales, família *Poaceae* e tribo *Triticeae*. O cultivo dessa gramínea ocorre amplamente em todo o mundo, nas mais variadas condições geográficas e climáticas. A época de plantio e colheita é diferente para cada hemisfério, existindo, portanto, trigo de primavera e inverno. Historicamente, a produção do cereal no mundo tem como destino principal o consumo humano e, também, o preparo de ração animal (MAGGIAN; FELIPE, 2009).

Segundo dados da FAO (2009), atualmente o cereal é cultivado em 124 países e é considerado essencial na dieta por concentrar elevado valor energético e ser rico em carboidratos e proteínas. Por não possuir substituto direto, que contenha ingredientes iguais ou pelo menos semelhantes a ele, a essencialidade do trigo é assegurada. Maia (1996), afirma que, devido à importância da cultura para a alimentação humana, o trigo é chamado de “o mais nobre” dos cereais.

Silva, Ferreira e Nogueira Júnior (2004) apontam a cadeia produtiva do trigo como uma das mais importantes do setor alimentício, suprindo grande percentual da necessidade de alimentos das populações, inclusive a brasileira. Desde o cultivo até o beneficiamento do material colhido – englobando a produção de pães, massas, biscoitos – a cultura é fonte geradora de emprego e renda a inúmeras famílias envolvidas no sistema de produção do cereal.

Conforme Rossi e Neves (2004), a triticultura já ocupou posição de destaque na agricultura brasileira em períodos anteriores. Todavia, problemas fitossanitários, de políticas públicas e de coordenação da cadeia produtiva acabaram por desestimular os agricultores, o que conduziu ao decréscimo gradual do cultivo de trigo e o aumento da dependência externa a partir de 1990.

O consumo anual de trigo no Brasil tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas, o dobro do que é produzido pelo país. Cerca de 90% da produção nacional deste cereal está concentrada na região sul. Contudo, a cultura vem sendo introduzida paulatinamente na região do cerrado, sob irrigação ou sequeiro (EMBRAPA, 2012).

Inúmeros são os desafios da triticultura brasileira. As doenças que incidem sobre a cultura do trigo são apontadas como um dos principais fatores limitantes à sua produção. Devido a enorme variabilidade climática do país com períodos mais quentes e prolongadas estações chuvosas, mesmo nas regiões indicadas ao cultivo do cereal, há grande quantidade de microrganismos patogênicos à cultura que são corresponsáveis pela queda da produtividade nas lavouras. Essas doenças podem ser, de forma bem generalista, classificadas em doenças do sistema radicular e doenças da parte aérea e, dentre as doenças da parte aérea, a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, tem se configurado como uma das mais danosas à cultura.

2.2 Etiologia da brusone do trigo

O agente causal da brusone em trigo é o fungo *Magnaporthe oryzae*, que corresponde ao estádio teleomórfico de *Pyricularia oryzae*. O fungo pertencente ao filo Ascomycota, classe Sordariomicetes, ordem Magnaporthales e família *Magnaporthaceae* (MACIEL, 2011). Apresenta conídios piriformes com ápice estreito e base abaulada. São, geralmente, trisseptados, com ocorrência rara de uno ou bisseptação (TALBOT, 2003). Apresenta conídio hialino com germinação das células da extremidade, sendo de observação praticamente nula a germinação da célula central. Na extremidade da hifa germinativa, forma-se um apressório bem desenvolvido, arredondado e melanizado (HOWARD; VALENT, 1996). O fungo forma colônias diversificadas com colorações que variam do branco ao cinza escuro, com muita ou pouca produção de micélio, sendo essa característica variável em função do meio de cultivo utilizado para o crescimento do patógeno (BEDENDO; PRABHU, 2005).

O entendimento das condições ambientais ideais para o desenvolvimento de um determinado microrganismo é importante quando se pensa na adoção de medidas de controle da doença. A temperatura ótima para a esporulação de *M. oryzae* está em torno dos 28°C, muito embora possa ser observada desde os 10°C até os 35°C (ALVES; FERNANDES, 2006). A liberação de esporos não é muito influenciada pela temperatura, o que normalmente acontece na faixa de 15 a 35°C (DIAS NETO et al., 2010). Os esporos germinam eficientemente em temperaturas compreendidas entre 25 e 28°C e a umidade tem importante papel na produção de

conídios sobre lesões e no desenvolvimento do micélio, sendo requerida na faixa dos 93% (MOSS; TREVATHAN, 1987). A presença de água livre é uma demanda que, se não suprida, desfavorece a germinação do conídio. Alternância luminosa tem grande importância sobre a produção de esporos, pois estes começam a ser liberados assim que escurece (BEDENDO; PRABHU, 2005).

M. oryzae é um patógeno que apresenta enorme variabilidade com relação às características culturais, exigências nutricionais e patogenicidade (BEDENDO; PRABHU, 2005; DIAS NETO et al., 2008; LEUNG et al., 1988). A sobrevivência do fungo pode acontecer na forma de micélio ou conídio, em restos de cultura, sementes, hospedeiras alternativas e plantas de trigo que permanecem no campo. A disseminação do conídio acontece, principalmente, através do vento e, quando depositado na superfície de um novo hospedeiro, o fungo pode iniciar o processo de infecção (BEDENDO; PRABHU, 2005; TALBOT, 2003).

2.3 Ciclo de vida

Durante o seu ciclo de vida, o fungo *M. oryzae* produz conidióforos aéreos e na ponta destes se formam, em arranjo simpodial (crescimento lateral), os conídios, tri ou bicompartimentados (mais raros), hialinos e de formato piriforme. Estes darão origem ao inóculo para os ciclos secundários de infecção (Figura 1) (EBBOLE, 2007). Ao alcançar a superfície do hospedeiro, o conídio permanece firmemente aderido ao substrato graças à mucilagem produzida na ponta mais afilada do esporo (HAMER et al., 1988). Durante a conidiogênese, o material que originará a gota de mucilagem formada pelo conídio, fica em um espaço periplasmático na ponta da estrutura (Figura 2a) (BRAUN; HOWARD, 1994). Assim que o esporo atinge a maturidade, a parede que envolve o septo apical (região mais afilada) do conídio se rompe e a mucilagem pode ser observada na estrutura ainda quando esta se encontra afixada ao conidióforo (HOWARD; VALENT, 1996). Este material serve para a fixação do fungo na superfície do hospedeiro de maneira não específica (HAMER et al., 1988).

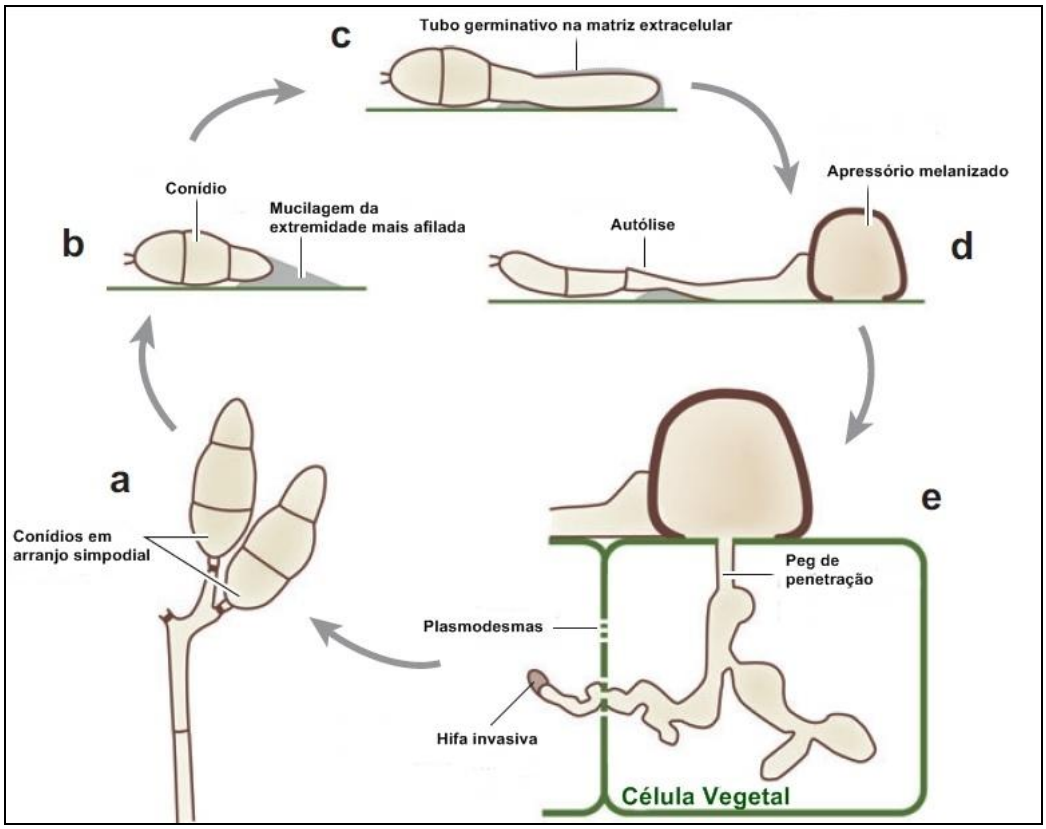


Figura 1 – Ciclo de vida do fungo *Magnaporthe oryzae*. (a) Conídios são organizados de maneira simpodial em conidióforos aéreos; (b) o conídio se adere à superfície do hospedeiro usando a mucilagem presente na ponta da estrutura; (c) germinação do conídio e produção do tubo germinativo na matriz extracelular; (d) o apressório melanizado é formado e este contém os materiais advindos da autólise do tubo germinativo e do conídio; (e) o *peg* de penetração exerce grande pressão de turgor no substrato para penetrar a cutícula da planta e a parede celular do hospedeiro. O *peg* de penetração origina a hifa infectiva que tem a aparência bulbosa, e se ramifica dentro da célula. O movimento para a próxima célula ocorre especificamente por meio dos plasmodesmas. Adaptado de Ebbole (2007)

Após aderido ao substrato, o conídio germina formando um fino tubo germinativo que, em sequência, achata-se e prende-se ao hospedeiro antes da diferenciação do apressório (WILSON; TALBOT, 2009). À medida que o apressório formado amadurece, o conídio entra em colapso e morre em um processo programado de autólise (Figura 2b) (TALBOT, 2003). Com isso, o apressório se torna melanizado e desenvolve substancial pressão de turgor. Devido a grande força exercida pela estrutura, um fino *peg* de penetração é formado na base do apressório e, auxiliado por enzimas extracelulares, perfura a cutícula do hospedeiro e invade a epiderme de plantas de trigo (Figura 2c) (CARACUEL-RIOS; TALBOT, 2007). A

infecção de tecidos da planta ocorre por meio de hifas invasivas de formato bulboso, que invaginam a membrana plasmática das células de trigo e invadem as células da epiderme. O movimento célula a célula pode ocorrer, inicialmente por meio de plasmodesmas (EBBOLE, 2007).

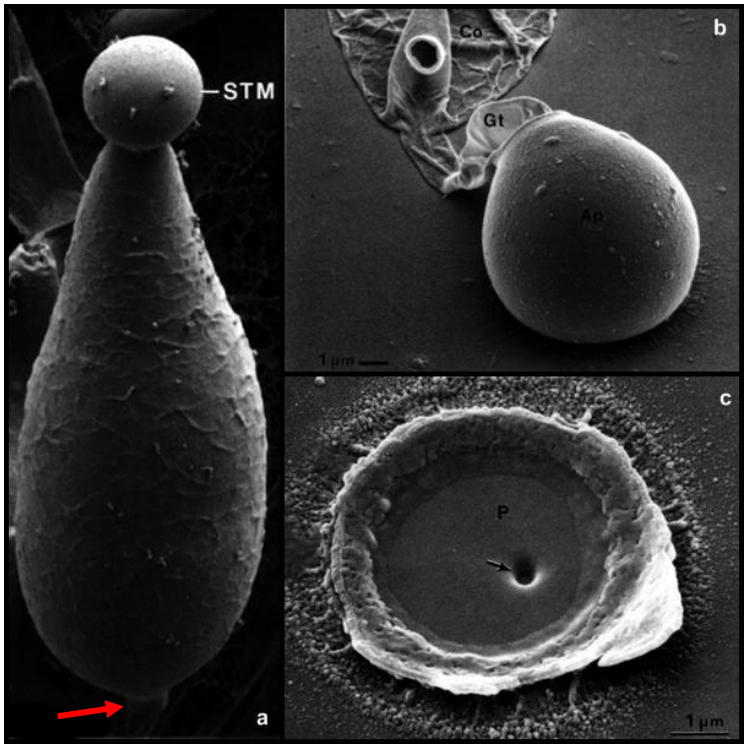


Figura 2 – Micrografia eletrônica de transmissão mostrando (a) o conídio do fungo *Magnaporthe oryzae* com formação de mucilagem na extremidade mais afilada da estrutura (*spore tip mucilage* - STM) e apêndice basal indicado pela seta vermelha; (b) a formação do apressório do fungo com subsequente autólise do conídio (Co) e do tubo germinativo (Gt); (c) poro (p) formado pelo *peg* de penetração em membrana de poliéster, observado após remoção do apressório por sonicação. Adaptado de Howard e Valent (1996)

A formação de lesões acontece entre 72 e 96 horas após a infecção. A esporulação somente acontece sob condições ideais de umidade, que se encontra na faixa dos 93%. Conídios são destacados dos conidióforos aéreos ajudados, principalmente, pelo vento e respingos de chuva, podendo encontrar um novo hospedeiro dando início ao ciclo secundário da doença (WILSON; TALBOT, 2009).

2.4 Sintomatologia

O principal sintoma da brusone em trigo é a ocorrência de espigas esbranquiçadas na sua metade superior, a partir do ponto de penetração do patógeno e, sobre este, na ráquis, ocorre uma lesão preta brilhante com consequente morte da espiga na região localizada acima desse ponto de infecção (REIS; CASA; FORCELINI, 2005).

Ocasionalmente, no limbo foliar, são observadas lesões elípticas de bordos cloróticos e centros acinzentados decorrentes da infecção por *M. oryzae* (Figura 3).

Figura 3 – Sintomatologia expressa por plantas de trigo parasitadas por *Magnaporthe oryzae*. (a) Espiga com morte de espiguetas acima do ponto de infecção e presença de sinais do patógeno evidenciada pela presença de micélio cinza (seta vermelha); (b) lesão foliar de formato elíptico com centro acinzentado característica da brusone em trigo. Fonte: Embrapa Trigo

2.5 Parasitismo: como o fungo ataca a planta

Fungos fitopatogênicos desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, inúmeros mecanismos para alcançarem os tecidos internos da planta. No caso deste grupo de patógenos em especial, a infecção pode ocorrer através de aberturas

naturais, ferimentos e vários mecanismos de penetração direta pela superfície intacta do hospedeiro (AIST, 1981; HARDHAM, 1992; HOWARD, 1996).

O fungo *M. oryzae* executa uma série de estratégias metabólicas a partir do momento em que o conídio entra em contato com a folha cerosa ou com a espiga do trigo. Se bem sucedidas, essas estratégias levam a formação de lesões esporulantes (HOWARD; VALENT, 1996; TALBOT; EBBOLE; HAMER, 1993). Um isolado virulento cresce intracelularmente, invadindo as células da epiderme adjacentes à primeira célula infectada, bem como, as células subjacentes do mesófilo. O patógeno pode comprometer uma área superior a 10% do tecido vegetal suscetível em apenas 3 dias após a infecção. Em seguida, lesões esporulantes aparecem liberando milhares de conídios ao longo do dia, reiniciando um novo ciclo da doença (WILSON; TALBOT, 2009).

Em arroz, o fungo é reconhecido por ser o mais destrutivo da cultura. Em trigo, a brusone apresenta grande ameaça já tendo sido registradas perdas de produtividade maiores do que 70% no Brasil (GOULART; PAIVA, 1992). O sequenciamento gênico do fungo foi, sem dúvida alguma, um passo importante nos estudos que visam o claro entendimento dos passos metabólicos usados pelo patógeno para causar doença (DEAN et al., 2005). Hoje, *M. oryzae* é o principal microrganismo modelo para o entendimento das bases moleculares das doenças fúngicas que acometem as plantas (EBBOLE, 2007; STERGIOPOULUS; WIT, 2009).

2.5.1 Estruturas de infecção

Os fungos usam diferentes estruturas para penetrar diretamente a superfície da planta hospedeira, dentre estas, destacam-se as hifas e tubos germinativos, zoósporos encistados e estruturas elaboradas de fixação (EBBOLE, 2007). Cada uma dessas estruturas pode se utilizar de uma série de estratégias que são definidas pelas características de cada patógeno e do substrato em que se encontram depositadas (HOWARD; VELENT, 1996).

No caso do fungo *M. oryzae*, uma sequência morfogenética específica e, portanto, uma expressão gênica diferencial, parece estar ligada como uma unidade que representa a expressão de todos os eventos iniciais requeridos pelo patógeno para a infecção da planta (BOURETT; HOWARD, 1990; DEAN et al., 2005; HOWARD; BOURETT; FERRARI, 1991; JELITTO; PAGE; READ, 1994). Um

conídio, esporo assexual que dissemina o patógeno no campo, germina formando um ou mais tubos germinativos. Após algumas horas, o ápice do tubo germinativo se achata e dilata formando o apressório que, em seguida, origina o *peg* de penetração (BECHINGER et al., 1999). Este último perfura a superfície do hospedeiro alcançando as células subjacentes da epiderme da planta. Após a penetração, o fungo inicia o desenvolvimento de outra estrutura distinta, a hifa infectiva (TALBOT, 2003). Cada uma dessas estruturas e o seu papel preponderante no parasitismo da planta hospedeira estão descritas a seguir.

2.5.1.1 Conídio

A conidiogênese tem início a partir do momento em que os conidióforos emergem dos estômatos presentes nos tecidos das plantas infectadas ou por erupção direta pela cutícula do hospedeiro advinda de células adjacentes a esta, infectadas pelo patógeno (HOWARD, VELENT, 1996).

A superfície cuticular das gramíneas em geral, normalmente carrega um revestimento de cristais de cera (ZEE, 1981), que rasgam a cutícula nos locais onde se depositam e facilitam a saída de conidióforos a partir do hospedeiro doente. Inicialmente, microconídios holoblásticos e ovalados se formam em arranjo simpodial nas extremidades dos conidióforos sendo que, já nos estágios iniciais do desenvolvimento da estrutura, são facilmente diferenciados das células conidiogênicas devido ao arranjo característico que assumem na ponta do conidióforo (EBOLE, 2007; WILSON; TALBOT, 2009; TALBOT, 2003). Conídios maduros são, normalmente, trisseptados, piriformes e apresentam um apêndice basal no ponto de ligação da estrutura ao conidióforo (Figura 2a).

2.5.1.2 Mucilagem (*Spore tip mucilage - STM*)

A gota de mucilagem é formada no conídio maduro, antes do seu desprendimento do conidióforo. O material que, sob condições de alta umidade, origina uma gotícula de mucilagem na parte mais afilada do conídio de *M. oryzae*, foi visualizado pela primeira vez a partir da utilização de técnicas de criofixação por congelamento e microscopia eletrônica de transmissão (BRAUN; HOWARD, 1994). Posteriormente, foi descoberto que o material responsável pela formação da

mucilagem nos conídios desse fungo está presente na região periplasmática na parte mais afilada do conídio, sendo extravasada momentos antes da liberação do esporo preso ao conidióforo (HOWARD; VALENT, 1996). Esse material mucilaginoso serve de substância adesiva auxiliando, portanto, o conídio a fixar-se a uma superfície cerosa, no momento em que ambos, conídio-substrato, entram em contato, de maneira não específica (HAMER et al., 1988).

A mucilagem forma uma fina e viscosa 'almofada' na superfície do substrato e fixa, firmemente, o conídio pelo ápice. Uma vez aderido, tentativas de desprender o conídio da superfície do hospedeiro são vãs (HAMER et al., 1988). *In vitro*, a produção de mucilagem varia em função da idade da cultura, do isolado e das condições de cultivo.

2.5.1.3 O apressório e o papel da melanina no estabelecimento do parasitismo

A estrutura básica do apressório produzido pelo fungo *M. oryzae*, foi bem detalhada no trabalho publicado por Howard e Ferrari (1989). A estrutura apresenta forma de cúpula e uma complexa e rígida parede celular (EBBOLE, 2007).

O conídio de *M. oryzae* germina em presença de água livre dando origem a um tubo germinativo 30 minutos após o contato com o substrato (BOURETT; HOWARD, 1990; HAMER et al., 1988). Normalmente, o tudo germinativo é originado a partir das células da extremidade do conídio, sendo que, raramente se observa a elongação dessa estrutura a partir da célula central (HOWARD; VALENT, 1996). O desenvolvimento do tubo germinativo sobre a superfície da planta parece estar associado com o material presente na matriz extracelular (JONES; BALEY; O'CONELL, 1995; XIAO et al., 1994), além disso, essa estrutura cresce firmemente aderida ao substrato (HAMER et al., 1988; WILSON; TALBOT, 2009). Um grupo de vesículas citoplasmáticas pode ser encontrado na parte apical do tubo germinativo, próximas ao substrato, no momento da elongação do tubo, denominadas *Spitzenkörper*. Tais vesículas estão relacionadas à síntese da parede da hifa durante o processo de crescimento apical (LÓPES-FRANCO; HOWARD; BRACKER, 1995).

Após a elongação do tubo germinativo, a extremidade da estrutura começa a inchar e dobrar, formado "ganchos" (BOURETT; HOWARD, 1990) marcando, com isso, o início da formação do apressório, que se dá, geralmente, 2 a 4 horas após a

disseminação do conídio e deposição deste no hospedeiro (HOWARD; VALENT, 1996). Na base do apressório que fica em contato com a cutícula da planta, está o poro apressorial, onde a parede celular é mais fina, apresentado um diâmetro que gira em torno de 5-10 μm, diâmetro maior que do *peg* de penetração que penetra diretamente pela cutícula do hospedeiro (HOWARD; VALENT, 1996). O diâmetro do *peg* de penetração está na faixa dos 0,5-0,7 μm, concentrando a pressão de turgor produzida pelo apressório em uma área ínfima da superfície celular da planta, o que aumenta bastante às chances da penetração direta do patógeno no hospedeiro intacto (EBBOLE, 2007).

O apressório completamente formado se apresenta como uma estrutura melanizada. Os microrganismos normalmente sintetizam melaninas através de fenoloxidases como tirosinases, lacases e catecolases, ou através da via das policetídeo-sintases (BUTLER; DAY, 1998; KROKEN et al., 2003). Os dois tipos mais comuns de melaninas em fungos são as DNH-melaninas (denominação devida a um de seus intermediários metabólicos, o 1,8-diidroxinaftaleno) e a dopa-melanina (denominação devida a um de seus precursores, a L-3,4-diidroxifenilalanina) (HOWARD; FERRARI, 1989; SCHIAVE, 2007), sendo que o 1,8-diidroxinaftaleno é o precursor imediato da melanina em *M. oryzae* (BELL; WHEELER, 1986; KUBO; FURUSAWA, 1991; POLAK, 1990). A parede do apressório do agente etiológico da brusone em trigo é de, aproximadamente, 100 nm de espessura, e apresenta, na parte interior, uma camada de melanina em torno de 20 nm, sendo que esta não se estende até a região do poro apressorial em contato com a cutícula do hospedeiro (HAMER et al., 1988, 1991; HOWARD; FERRARI, 1989; HOWARD; VALENT, 1996) (Figura 4).

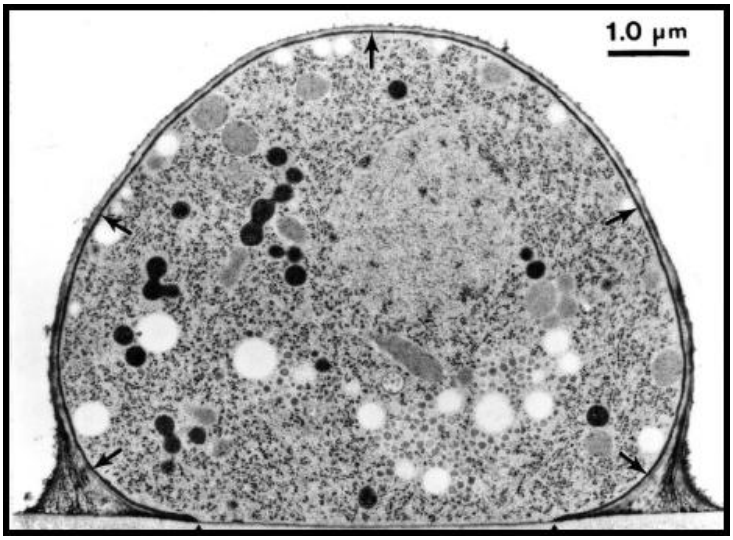


Figura 4 – Micrografia eletrônica representando o corte transversal de um apressório produzido pelo fungo *Magnaporthe oryzae* em contato com o substrato. As setas indicam a camada de melanina na parte interna da estrutura. A ausência da substância pode ser observada na parte inferior da micrografia. Fonte: Howard e Valent, 1996

A presença de melanina no apressório é peça chave do parasitismo de *M. oryzae*, pois ela forma uma barreira efetiva ao movimento de solutos. A água pode difundir-se através da camada de melanina, entretanto, o pigmento serve como uma barreira semipermeável ao movimento de íons e outras moléculas menores em ambos os sentidos (entrada e saída) (MONEY; HOWARD, 1996).

Carboidratos e lipídios são mobilizados do conídio para o apressório e a quebra dessas moléculas no interior da estrutura leva ao aumento da concentração de solutos em seu interior. O glicerol é o principal soluto presente no interior do apressório e pode ser encontrado na concentração de, aproximadamente, 3 M (HOWARD; FERRARI, 1989; HOWARD; VALENT, 1996).

A manutenção dessa alta concentração de polióis em solução requer uma grande quantidade de água, que pode atravessar pela parede do apressório através da camada de melanina. Na medida em que o glicerol não pode ser retirado do interior da estrutura devido à parede melanizada do apressório, uma alta pressão de turgor é gerada quando há água disponível (EBBOLE, 2007). Por isso, a parede do apressório precisa ser bem rígida para suportar tão elevada pressão (EBBOLE, 2007; HOWARD, VALENT, 1996; MONEY; HOWARD, 1996). Se a concentração extracelular de solutos aumenta ao ponto da concentração extra-apressorial ser

maior do que a intra-apressorial, a água se desloca para fora do apressório e como resultado tem-se o colapso da estrutura (HOWARD; FERRARI, 1989).

2.5.1.4 Ação mecânica na penetração: pressão de turgor do apressório

A pressão de turgor exercida por estruturas fúngicas de infecção, quando maior do que a pressão no interior das células do hospedeiro, tem papel importante durante a penetração (HOWARD; VALENT, 1996). Alguns fungos são capazes de causar deformações na superfície do substrato ao qual se depositam, entretanto, os mecanismos de geração e aplicação de forças provenientes da pressão de turgor, e o papel desses mecanismos durante a penetração do hospedeiro, ainda necessitam de estudos (TALBOT, 2003). No caso do fungo *M. oryzae*, pressões mecânicas derivadas da elevada pressão osmótica gerada no interior do apressório melanizado e firmemente aderido ao hospedeiro são essenciais ao processo de infecção (DEAN et al., 2005; HOWARD et al., 1991; MONEY; HOWARD, 1996; WILSON; TALBOT, 2009).

Ao que parece, a pressão de turgor apressorial é um requesito obrigatório para alguns fungos iniciarem o processo de penetração e subsequente colonização através dos tecidos da planta, a não ser que, cutinases e enzimas celulolíticas tenham liquefeito a cutícula, a parede celular e outras barreiras à entrada do patógeno (EBBOLE, 2007; MONEY, 1995). O aspecto enzimático da penetração fúngica é particularmente complexo, uma vez que, o patógeno pode utilizar diversas enzimas, codificadas por múltiplos genes para transpor as barreiras impostas pela planta (DEAN et al., 2005). Experimentos que utilizam superfícies sintéticas resistentes – como as membranas de poliéster, que não são degradadas biologicamente – apontam para a capacidade de determinados patógenos, inclui-se aqui o fungo *M. oryzae*, de transpor barreiras físicas apenas com a pressão de turgor (OKU, 1994; XIAO et al., 1994). Entretanto, esta é apenas uma das armas usadas pelos fungos, tendo em vista que estes se utilizam também de enzimas extracelulares para degradar a superfície do hospedeiro (HOWARD; VALENT, 1996; PASCHOLATI, 2011; WALTON, 1994).

2.5.1.5 *Peg* de penetração

Após os eventos que culminam com o desenvolvimento e melanização do apressório, e um período relativo de quiescência, o poro apressorial é coberto pela deposição de uma nova parede na forma de invólucro da abertura (BOURETT; HOWARD, 1990). O *peg* de penetração, que emerge dessa nova parede, é a estrutura que efetivamente perfura a superfície do hospedeiro e transporta os componentes do apressório para o interior das células epidermais da planta (HOWARD; VALENT, 1996).

O *peg* é cercado por uma parede de camada simples, que se liga a lectinas do tipo concanavalina A e aglutininas do gérmen de trigo presentes na célula do hospedeiro (BOURETT; HOWARD, 1990), entretanto, a presença e função da parede na extremidade do *peg* ainda é algo que carece de pesquisas (EBBOLE, 2007; KOGA, 1994).

O *peg* de penetração é uma estrutura que apresenta um diâmetro médio de 0,7 μm, sendo considerada uma protuberância celular de crescimento apical (HOWARDO, VALENT, 1996), completamente diferente morfologicamente de uma hifa somática e um tubo germinativo (TALBOT, 2003).

Após a penetração da cutícula e da parede celular da planta, o fino *peg* robustece para dar origem à hifa primária de infecção que, em sequência, diferencia-se formando a hifa secundária de aspecto bulboso, que possibilita a colonização do patógeno no tecido da planta hospedeira (HEATH et al., 1990, 1992; KOGA, 1994).

2.5.2 Enzimas extracelulares

Enzimas são proteínas de alto peso molecular, constituídas de longas cadeias de aminoácidos, responsáveis pela catálise das reações anabólicas e catabólicas nas células dos seres vivos (PASCHOLATI, 2011).

Neste contexto, cutinases são esterases, com resíduo de serina no sítio catalítico, que rompem as ligações ésteres entre as moléculas presentes na cutina, substrato natural da enzima, liberando, como produto da ação enzimática, monômeros e oligômeros derivados de ácidos graxos. De maneira geral, apresentam especificidade por ésteres de álcool primário, os quais se mostram abundantes no polímero (PASCHOLATI, 2011). Trabalhos como o de Dickman e Patil (1986)

demonstraram a importância da cutinase para a patogenicidade, quando se observa que isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz e Sacc, deficientes em cutinase, não produziam doença sobre a superfície intacta de frutos de mamoeiro. O inverso era observado em mamões que apresentavam injúrias na superfície de contato com o patógeno.

Os fungos durante a penetração e colonização encontram e atravessam as paredes celulares dos hospedeiros. A maioria deles produz enzimas celulolíticas que auxiliam no processo de degradação da parede celular. Os polissacarídeos constituintes das paredes celulares têm sido tradicionalmente divididos em substâncias pécticas, hemicelulose e celulose, com base na solubilidade e não na composição química (PASCHOLATI, 2011).

A celulose é um polissacarídeo de cadeia longa (1-3 µm), formada por moléculas de glicose em ligações β-1,4 e se constitui no principal componente estrutural das paredes celulares dos vegetais (até 30% nas paredes primárias e acima de 40% em plantas lenhosas). O processo de degradação deste polímero por um fungo fitopatogênico passa por três etapas principais, na primeira, uma enzima denominada β-1,4 D-glucanase, agindo ao acaso, rompe as ligações glicosídicas da cadeia de glucana. Em seguida, as extremidades não redutoras expostas tornam-se substratos para a β-1,4-D-glucana-celobiohidrolase, a qual libera moléculas de celobiose. Por fim, a hidrólise da celobiose em glicose é catalizada pela β-glicosidase facilitando a passagem do fungo fitoparasita (PASCHOLATI, 1995).

Os ensaios pioneiros sobre os mecanismos de ação das celulases foram realizados por Reese, Siu e Levinson (1950), onde foi proposto o conceito C_1-C_x para a degradação da celulose. Os autores afirmaram que, a fração C_1, seria responsável pela degradação da celulose na forma cristalina, resultando em cadeias lineares mais curtas, enquanto que a fração C_x seria responsável pela degradação das formas amorfas (SCHWAN-ESTRADA, 1997). Posteriormente, este conceito foi substituído por um complexo constituído de três enzimas: endo-β-1,4-glucanases, exo-β-1,4-glucanases e β-glicosidases.

As endo-β-1,4-glucanases ou β-1,4-glucan-glucohidrolases são também conhecidas como carboximetilcelulases, C_x ou endocelulases. Essas enzimas atuam internamente sobre o polímero de celulose, hidrolisando-o ao acaso e formando oligossacarídeos. Tal processo torna a celulose predisposta à ação de

exoglucanases, devido à criação de novos sítios reativos para esta enzima (SCHWAN-ESTRADA, 1997).

As exo-β-1,4-glucanases ou β-1,4-glucan-celobiohidrolases são também conhecidas como avicelases, celulases C_1 ou exocelulases. Essas enzimas atuam sobre a celulose cristalina solubilizando-a (celulose suscetível), através da remoção de unidades de celobiose da cadeia, mecanismo este conhecido como exo-eliminação (SCHWAN-ESTRADA, 1997).

Diversos autores destacam a ocorrência de um mecanismo sinergístico entre as endo e exoglucanases, no qual a atividade de um componente enzimático é favorecida pela ação hidrolítica do outro (ENARI, 1983; ISAAC, 1992; RYU; MANDELS; 1980). A atividade de tais enzimas tem sido relatada para inúmeros microrganismos como *Sporotrichum pulverulentum* Novobr (STREAMER; ERIKSSON; PETTERSSON, 1975), *Talaromyces emersonii* Stolk (MCHALE; COUGHLAN, 1980), *Sclerotium rolfsii* Sacc. (SADANA; PATIL, 1985) e *Penicillium decumbens* Thom (LIU et al., 2013).

A β-glicosidase é comum em plantas, fungos, bactérias e tecidos animais, sendo a última enzima a atuar no processo de degradação da celulose (HIRAYAMA; NAGAYAMA; MATSUDA, 1978). Também conhecida como celobiase, esta enzima atua sobre a hidrólise da celobiose, originada da ação das endo e exoglucanases sobre a celulose, resultando em monômeros de glicose. As β-glicosidases fúngicas apresentam massas moleculares na faixa de 32 kDa a 440 kDa (BODENMANN; HEINIGER; HOHL, 1985; CAO; CRAWFORD, 1993; SHWAN-ESTRADA, 1997).

Hirayama, Nagayama e Matsuda (1978) conseguiram purificar e demonstrar as propriedades da β-glicosidase GB-1 obtida de um isolado do fungo *Pyricularia grisea* Sacc. crescido em meio rico em celulose, o que evidenciou a importância e ação da enzima para o estabelecimento das relações parasitárias estáveis no caso da brusone dos cereais.

2.5.3 Produção de metabólitos tóxicos: o papel das fitotoxinas

As fitotoxinas são compostos secundários de baixa massa molecular, produzidos por fitopatógenos com a capacidade de afetar o metabolismo da célula hospedeira e sua estrutura, a ponto de causar a sua morte. Essas moléculas podem ser vistas como fatores de patogenicidade ou estarem relacionadas à agressividade

dos patógenos. Agem em diferentes sítios em nível celular, alterando a permeabilidade e/ou potencial das membranas, acarretando mudanças no equilíbrio iônico, perda de eletrólitos e aumento na respiração. Várias toxinas são reconhecidamente relacionadas à patogênese, sendo as mais estudadas as toxinas HV (victorina), HS (helminthosporosídeo), faseolotoxina e tabtoxina (PASCHOLATI et al., 2008; PASCHOLATI, 2011).

Trabalhos realizados por Tsurushima et al. (2010) demonstraram que a toxina produzida pelo anamorfo do agente etiológico da brusone, *P. grisea* (sin. *P. oryzae*), induzia clorose em folhas de aveia quando estas eram incubadas sob luz constante caracterizando a importância dessas substâncias na manifestação dos sintomas da doença. Em contrapartida, Aver'yanov, Lapikova e Lebrun (2007) avaliaram o efeito do ácido tenuazônico, toxina produzida por *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (sin. *Magnaporthe oryzae*), aplicado em mistura com esporos do mesmo fungo e verificaram que a substância induziu resistência local contra a doença reduzindo o número de lesões compatíveis. A participação de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo hospedeiro parece integrar o processo, contudo, os efeitos destes agentes eliciados pela presença do ácido tenuazônico ainda não foram estudados.

2.6 Origem da brusone do trigo

A brusone do trigo é uma doença surgida recentemente no Brasil, tendo a sua primeira observação sido efetuada no estado do Paraná em 1985 (IGARASHI et al., 1986), sendo, logo em seguida, relatada em outras regiões produtoras de trigo no país (GOULART; PAIVA; MESQUITA, 1990; GOULART, PAIVA, 1993; PRABHU; FILIPPI; CASTRO, 1992; PICININI; FERNANDES, 1990; URASHIMA; KATO, 1994). Devido a importância da brusone em arroz, a relação entre esta e a brusone do trigo sempre foi foco de vários questionamentos sobre qual foi o hospedeiro responsável pela origem da doença, entretanto, o completo entendimento da interação patógeno-hospedeiro, para ambas as culturas, é de ocorrência recente (DEAN et al., 2005; IGARASHI et al., 1986). Inicialmente, a brusone do arroz foi indicada como a fonte da brusone do trigo (MEHTA et al., 1992). Entretanto, estudos envolvendo comparações genéticas mostraram que existiam enormes diferenças entre isolados obtidos de espécies vegetais diferentes (BRUNO; URASHIMA, 2001; VALENT,

1990). Ceresini et al. (2011) compararam geneticamente populações simpátricas de *M. oryzae* adaptadas ao trigo e ao arroz no Brasil, por meio de marcadores do tipo microssatélites. Os pesquisadores descobriram que existia baixíssima migração histórica entre as duas populações de *M. oryzae*. Considerando as populações separadamente, a descoberta sugere que a população brasileira de *M. oryzae* adaptada ao trigo veio, provavelmente, de uma população desconhecida do fungo infestante de outras poáceas e, dentre estas, não se encontra o arroz.

Tem sido verificado que isolados de arroz são patogênicos ao trigo, contudo, o inverso não é verdadeiro (MACIEL, 2011). Prabhu, Filippi e Castro (1992) relataram que nenhuma infecção foi observada a partir da inoculação de oito isolados do fungo obtidos de trigo em 30 genótipos de arroz, incluindo as cultivares de arroz que compõem a lista internacional para a diferenciação de raças de *M. oryzae* (ATKINS et al., 1967). Urashima, Igarashi e Kato (1993) verificaram que nenhum dos 11 isolados de *M. oryzae* patogênicos ao trigo foram virulentos a 20 cultivares de arroz, incluindo os genótipos pertencentes ao grupo de cultivares proposto por Yamada (1976), no Japão, para a identificação de raças.

Existem algumas características do patógeno que ajudam a explicar esses tipos de respostas dos genótipos de arroz em contato com isolados de *M. oryzae* do trigo. O gene de avirulência *AVR-CO39*, originalmente presente em interações arroz-*M. oryzae*, e associado com a ausência de infecção em genótipos de arroz que carregam o gene de resistência *Pi-CO39*, foi encontrado em todos os 150 isolados do fungo obtido de trigo (CERESINE, 2011). Portanto, os dados indicam que a presença do gene *Pi-CO39* em genótipos de trigo pode ser um importante avanço no controle genético da doença no futuro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica e no campo experimental pertencente ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, integrante da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP, localizada na cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil. Os ensaios consistiram de várias etapas, conforme descrito a seguir.

3.1 Hospedeiro

Sementes de trigo, cultivares BRS 254 e BRS 264, foram fornecidas por pesquisadores da EMBRAPA Trigo. Estas passaram por um processo de assepsia em solução de hipoclorito de sódio 5% por 5 min e água destilada para retirada do excesso da solução anterior, sendo, logo em seguida, dispostas em rolo de germinação umedecido para a verificação da viabilidade do material de propagação por meio da taxa de germinação de cada cultivar. Além disso, as sementes das cultivares foram semeadas em vasos plásticos de 0,5 Kg contendo solo autoclavado + Plantmax HT® e mantidas em condição de casa-de-vegetação. A cultivar que apresentou maior taxa de germinação e se mostrou mais vigorosa, foi utilizada nos testes subsequentes, sendo esta, a cultivar BRS 264. Após a formação das espigas, 30 dias após a semeadura, tais plantas serviram para testes preliminares de patogenicidade dos isolados recebidos (Figura 5).

Figura 5 – Plantas de trigo em casa-de-vegetação 25 dias após a semeadura

3.2 Isolados

Os isolados do fungo *Magnaporthe oryzae* foram fornecidos por pesquisadores da EMBRAPA Trigo, após autorização da secretaria da chefia adjunta de transferência de tecnologia, representada pela senhora Rosana de Fátima Vieira Lopes. Os isolados recebidos, Py5003 e Py6017, foram transferidos para meio de aveia e meio batata-dextrose-ágar (BDA), incubados em câmara tipo BOD equipadas com lâmpadas fluorescentes a 25°C, fotoperíodo 12 horas, por 20 dias (URASHIMA et al., 2004). Após esse período, os fungos recebidos foram transferidos para sementes de cevada sendo, assim, preservados.

3.2.1 Avaliação das condições ótimas de temperatura e fotoperíodo para o crescimento micelial e esporulação de *Magnaporthe oryzae* em diferentes meios de cultivo

Os isolados foram multiplicados de acordo com a metodologia descrita em 3.2 e utilizados nesta etapa dos ensaios. Discos de micélio (5 mm), contendo o fungo, foram transferidos para o centro de placas de Petri com os meios de cultura cenoura, milho-cenoura, BDA, aveia e V8 (meio natural composto de 8 vegetais – tomate, beterraba, aipo, cenoura, alface, espinafre, salsa e agrião) (ZAUZA; ALFENAS; MAFIA, 2007). As placas foram incubadas em câmaras tipo BOD, em luz contínua (lâmpada fluorescente), escuro contínuo e fotoperíodo de 12 horas, nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C, sendo, portanto, o experimento realizado para cada uma dessas faixas de temperatura e fotoperíodo de maneira independente.

As placas foram observadas diariamente e as colônias fúngicas foram medidas, em sentidos diametralmente opostos, a intervalos de 2 dias por 20 dias. Para avaliação da esporulação, ao final das observações de crescimento micelial do fungo, as placas foram inundadas com água destilada e autoclavada (ADA), sendo o micélio delicadamente raspado com auxílio de alça de Drigalski. Em seguida, a suspensão foi exposta a luz florescente por 3 dias para a indução da esporulação. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x4x5 (isolado x temperatura x meio de cultura). As médias obtidas foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância

de 5% com o auxílio do programa ASSISTAT. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.3 Estimativa da pressão de turgor do apressório

A pressão de turgor do apressório formado pelos isolados Py5003 e Py6017 do fungo *M. grisea* foi mensurada pela metodologia proposta por Chen et al. (2004), que se baseia na capacidade do apressório, quando na presença de diferentes concentrações da solução de PEG-8000, de se manter íntegro. A pressão de turgor foi calculada pela concentração de PEG-8000 capaz de causar a lise de 50% dos apressórios imersos em diferentes concentrações da solução, 30 minutos após a interação.

Os isolados Py5003 e Py6017 foram crescidos em meio de cultivo aveia e, após 20 dias, tiveram o micélio delicadamente raspado e posto em condição de luz fluorescente contínua, por 3 dias, para a indução da esporulação. Após esse período, uma suspensão de conídios foi preparada e calibrada a uma concentração de 10^5 conídios/mL com auxílio de hemacitômetro tipo Neubauer. Em seguida, 20 mL da suspensão foram depositados em placas de poliestireno que, após serem lacradas com parafilme, foram incubadas em câmara tipo BOD, 25°C, fotoperíodo de 12h. Após germinação dos conídios e fixação dos apressórios (aproximadamente 18h), eliminou-se a água presente no interior das placas, sendo esta substituída por diferentes concentrações da solução de PEG-8000 (25, 30, 35, 40, 45 e 50%). Finalmente, as placas foram incubadas por mais 30 minutos em BOD, a 20 °C e, após esse período, o número percentual de apressórios rompidos foi estimado (Figura 9).

A pressão osmótica de soluções de PEG-8000 nas concentrações citadas, a 20 °C, situa-se em torno de 1,21; 2,01; 3,16; 4,86; 7,32 e 10,70 MPa, respectivamente (http://lpsb.nichd.nih.gov/peg8000temp.htm). O experimento consistiu de dez repetições para cada concentração de PEG-8000 utilizada, totalizando 60 parcelas. A estimativa do número de apressórios rompidos foi feita com auxílio de microscopia de luz, onde, para cada parcela, era calculado o percentual de apressórios em colapso/100 apressórios contados. Ao final da conferência, todas as parcelas de uma mesma concentração foram somadas e divididas pelo número de parcelas do tratamento, gerando, assim, 6 médias, uma

para cada concentração de PEG-8000 avaliada. Este ensaio foi realizado em triplicata.

3.4 Teor de proteínas totais do micélio

Para a quantificação de proteínas totais do micélio dos isolados Py5003 e Py6017, as mesmas foram extraídas através da maceração na presença de nitrogênio líquido, seguido pela adição de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH=7,5) contendo 1 mM de EDTA e 3 mM de diotreitol, na proporção de 5mM/g de micélio fresco. O material foi centrifugado a 4 °C durante 45 minutos a 15000 *g*. O sobrenadante constituiu o extrato proteico e teve a concentração de proteínas determinada segundo Bradford (1976). A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de albumina de soro bovino expressa em μg de proteína/mL (APÊNDICE A).

3.5 Determinação da atividade celulolítica

3.5.1 Atividade da enzima exo-β-1,4-glucanase

Inicialmente, o fungo *M. grisea* foi repicado para 100 mL de meio de Melin Norkrans Modificado (MNM) líquido (MARX, 1969). Para induzir a produção da enzima, a glicose foi substituída por celulose microcristalina a 1%. Cinco discos de micélio, com 20 dias de crescimento em MNM, foram colocados em erlenmeyers, os quais permaneceram a 28 °C ± 2 °C no escuro, sob agitação constante (150 rpm), durante 30 dias. Para a obtenção das fontes enzimáticas, com auxílio de pipeta automática, foram coletadas alíquotas de 5 mL do meio de cultivo a cada 6 dias, e conservadas a -20 °C para posteriormente serem utilizadas em ensaios de atividade celulolítica.

Para se determinar a atividade da exo-β-1,4-glucanase, foi utilizado o método espectrofotométrico indireto, tendo como base a liberação de moléculas de glicose a partir do substrato celulose microcristalina (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003). O método baseia-se na reação de 50 µL da fonte enzimática e 450 µL de celulose microcristalina a 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH = 5,0). A mistura foi, então, incubada por 30 min a 50 °C e a reação interrompida com adição

de 1,5 mL de hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico 1% (HAPHB) em álcali (0,5 g de HAPHB dissolvido em 10 mL de HCl 0,5 M, acrescido de 40 mL de NaOH 0,5 M). Após incubação, a mistura foi mantida a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriada em gelo (LEVER, 1972). A leitura de absorbância foi realizada a 410 nm. Foram utilizadas três repetições por amostra. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para a glicose e a atividade enzimática específica foi expressa em mg de glicose/min/mg de proteína (APÊNDICE B).

3.5.2 Atividade da enzima endo-β-1,4-glucanase

Para a produção de endo-β-1,4-glucanase, foi utilizado como indutor a carboximetilcelulose (CMC) a 1%, com ou sem glicose (0,1%), adicionado em meio líquido MNM. As condições de cultivo foram as mesmas descritas para a exo-β-1,4-glucanase. A atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria indireta, utilizando-se hidrazida do ácido β-hidroxibenzoico 1% (HAPHB) para dosagem de glicose liberada pela ação da enzima sobre CMC (LEVER, 1972). A reação consistiu em 50 µL da fonte enzimática (obtida da mesma forma que exo-β-1,4-glucanase) e 450 µL de CMC 1% em tampão de acetato de sódio 0,05 M (pH = 5,0). Após 30 minutos de incubação, a 50 °C, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de HAPHB. Em seguida, aquecida a 100 °C por 5 min e resfriada em gelo. A absorbância da mistura foi determinada a 410 nm (SCHWAN-ESTRADA, 1997; SCHWAN-ESTRADA et al., 2003). Foram utilizadas três repetições por amostra. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para a glicose e a atividade enzimática específica foi expressa mg de glicose/min/mg de proteína (APÊNDICE B).

3.5.3 Atividade da enzima β-glicosidase

Para esta enzima, foram utilizados celobiose 1% e carboximetilcelulose 1%, tanto como indutores para a produção da enzima bem como fontes de carbono no meio de cultivo MNM, mantendo-se, como descrito anteriormente, as mesmas condições de incubação para *M. oryzae* e para a coleta das amostras. A determinação da atividade enzimática foi feita através do *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo como substrato. A mistura da reação, incubada a 50 °C por 30

minutos, consistiu de 300 mL de *ρ*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo 0,02 M em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH = 5,0) e 200 µL da fonte enzimática. Após a incubação, com o objetivo de paralisar a reação, foram adicionados 500 µL de solução Na_2CO_3 a 1 M. O *ρ*-nitrofenol (*ρ*-NP) liberado, como resultado da reação enzimática, foi determinado espectrofotometricamente a 405 nm (DEASHPANDE; ERIKSSON, 1988; SCHWAN-ESTRADA, 2003). As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para ρ-nitrofenol e os resultados da atividade específica expressos em mg de *ρ*-NP/min/ mg de proteína.

3.6 Metabólitos Tóxicos

Inicialmente, para a obtenção dos metabólitos tóxicos, cinco discos de micélio do fungo (5 mm de diâmetro) foram colocados em Erlenmeyers com 100 mL de meio batata-dextrose (BD). Os frascos foram mantidos a 28 ± 2 °C, no escuro e sob agitação constante (250 rpm). Aos 5 e 10 dias de incubação, os meios de cultivo foram filtrados através de papel de filtro Whatman n°41, sendo os filtrados utilizados em dois bioensaios descritos a seguir.

3.6.1 Quantificação da liberação de eletrólitos por condutivimetria

Raízes e folhas de plântulas de trigo, obtidas pelo método do papel sanduíche (CHILVERS et al., 1986), foram seccionadas em fragmentos de aproximadamente 3 mm de comprimento e colocadas imediatamente em contato com cada tipo de filtrado, na presença de uma sonda de condutivímetro (1 g de raiz ou folha/100 mL do filtrado). Foram tomadas leituras de condutividade (expressas em micro-Siemens – µS) a cada 20 s, até a estabilização dos valores. O tratamento controle foi constituído de filtrado de BD, sem a presença do fungo.

Fragmentos das plântulas de trigo (raiz e folha) foram também expostos ao filtrado autoclavado. A submissão do filtrado ao processo de autoclavagem (121 °C/1 atm/20 min) visou a observação da termoestabilidade deste.

Além disso, os filtrados obtidos do cultivo dos isolados sob agitação constante, como já descrito anteriormente, foram transferidos para um funil de separação na proporção de 15 mL do filtrado por 25 mL de acetato de etila, objetivando a separação dos metabólitos tóxicos (LORIA et al., 2001). Em seguida,

foi coletada a fração referente ao acetato de etila e o filtrado foi novamente submetido à extração em mais 25 mL do solvente. As duas fases do acetato de etila foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio anidro, e o solvente evaporado sob vácuo. O pó resultante foi ressuspenso em 2 mL de metanol (extrato bruto) e utilizado nos ensaios de condutivimetria (GARCIA, 2008). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.6.2 Observação dos sintomas em plântulas de *Triticum aestivum*

Plântulas obtidas pelo método do papel sanduíche (CHILVERS et al., 1986), foram colocadas em tubos de ensaio com o sistema radicular imerso em 3 mL de cada tipo de filtrado. O conjunto foi mantido a 28 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h de luz fluorescente até o aparecimento de sintomas em raízes e na parte aérea. Foram também realizados bioensaios para a observação dos sintomas nas plântulas colocadas na presença de suspensão de conídios do fungo (10^4 esporos/mL). O tratamento controle consistiu de filtrado obtido em meio BD, sem a presença do fungo (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (filtrado do isolado Py5003, filtrado do isolado Py6017, suspensão de conídios do isolado 5003 (SC5003), suspensão de conídios do isolado Py6017 (SC6017) e controle BD) e seis repetições, configurando arranjo fatorial 5x2 (tratamentos x período de incubação). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias do peso fresco total das plântulas foram comparadas pelo Teste de Tukey (p=0,05).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação das condições ótimas de temperatura e fotoperíodo para o crescimento micelial e esporulação de *Magnaporthe oryzae* em diferentes meios de cultivo

Os resultados evidenciaram a incapacidade de crescimento do fungo *M. oryzae*, quando submetido à incubação em condições de luz contínua, independente do isolado, temperatura de incubação e meio de cultivo utilizado (Figuras 6 e 7, linha A).

Em condições de escuro contínuo, os isolados apresentaram crescimento progressivo, à medida que eram submetidos a uma temperatura maior (Tabela 1; APÊNDICE D). Dentro de uma mesma faixa de temperatura, independente do isolado avaliado, o desenvolvimento do fungo em meio de cultivo aveia apresentou os maiores valores médios de crescimento micelial, diferindo significativamente dos demais tratamentos, exceto quando incubado na temperatura de 30°C onde não houve diferença significativa do isolado Py6017 crescido em aveia ou em BDA e V8 (Tabela 1). Portanto, de maneira geral, pode-se dizer que, para os dois isolados, observaram-se os maiores valores de crescimento micelial quando ambos foram incubados à temperatura de 30°C, sendo estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Não foi constatada nenhuma diferença estatística quanto ao crescimento micelial dos isolados Py5003 e Py6017 quando comparados entre si, em tratamentos independentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Influência da temperatura e meio de cultivo sobre o crescimento micelial (mm) de dois isolados do fungo *Magnaporthe oryzae* em condições de escuro contínuo

Temperatura	Meio de Cultivo	Isolados*	
		Py5003	Py6017
15°C	Milho-Cenoura	12,93 eA	11,35 eA
	Cenoura	8,79 eA	7,44 eA
	BDA	11,93 eA	12,64 eA
	Aveia	22,26 dA	24,7 dA
	V8	10,51 eA	11,39 eA
20°C	Milho-Cenoura	17,07 dA	17,53 dA
	Cenoura	19,91 dA	18,52 dA
	BDA	18,49 dA	18,75 dA
	Aveia	30,35 cA	29,64 cA
	V8	20,03 dA	20,91 dA
25°C	Milho-Cenoura	33,92 cA	32,24 cA
	Cenoura	35,72 cA	34,06 cA
	BDA	36,24 cA	34,39 cA
	Aveia	44,76 bA	42,51 bA
	V8	35,05 cA	34,51 cA
30°C	Milho-Cenoura	44,07 bA	44,26 bA
	Cenoura	46,01 bA	44,14 bA
	BDA	46,01 bA	46,39 aA
	Aveia	53,69 aA	54,57 aA
	V8	47,51 bA	46,59 aA
CV%		17,89	

*Médias de cinco repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p = 0,05)

Adicionalmente, foi observado que as colônias dos dois isolados, crescidas em escuro contínuo, apresentaram colorações que variaram do branco, como as crescidas em meio V8, ao cinza escuro, a exemplo das colônias crescidas em milho-cenoura, cenoura e aveia. Além disso, os isolados crescidos nos meios de cultivo BDA, aveia e V8 apresentaram colônias de micélio mais denso e volumoso (Figuras 6 e 7, linha B), contudo, nenhum dos tratamentos havia alcançado os bordos da placa de Petri após 20 dias de avaliação. A raspagem do micélio e a exposição deste à luz fluorescente contínua por três dias, não induziu a esporulação do patógeno.

Em fotoperíodo de 12 h, os isolados Py5003 e Py6017 apresentaram crescimento micelial maior, quanto maior foi a temperatura a que foram expostos (Tabela 2; APÊNDICE E). Em todas as faixas de temperatura testadas, o meio de

cultivo aveia se apresentou como o ideal para o crescimento do fungo *M. oryzae*, apresentando valores estatisticamente superiores à maioria dos tratamentos (Tabela 2). Em alguns casos, houve diferenças entre os isolados cultivados em um mesmo meio de cultivo e em uma mesma faixa de temperatura. Por exemplo, no cultivo em meio milho-cenoura, cenoura e BDA/ 15°C e em cenoura, aveia e V8/ 25°C, observou-se maior crescimento micelial do isolado Py5003 quando comparado ao isolado Py6017. O inverso foi observado para o cultivo em milho-cenoura, BDA e V8/ 20°C e milho-cenoura/ 30°C, onde o isolado Py6017 apresentou crescimento micelial significativamente superior ao isolado Py5003 (Tabela 2). Tanto o isolado Py5003 quanto o isolado Py6017 apresentaram as maiores médias significativas de crescimento micelial quando submetidos à temperatura de 30°C (Tabela 2).

Tabela 2 – Influência da temperatura e meio de cultivo sobre o crescimento micelial (mm) de dois isolados do fungo *Magnaporthe oryzae* em condições de alternância luminosa (fotoperíodo de 12h)

Temperatura	**Meio de Cultivo**	**Isolados***	
		Py5003	**Py6017**
15°C	Milho-Cenoura	43,78 eA	33,35 fB
	Cenoura	45,90 eA	34,25 fB
	BDA	43,71 eA	36,35 fB
	Aveia	53,21 dA	51,50 eA
	V8	47,74 eA	49,12 eA
20°C	Milho-Cenoura	51,77 dB	62,20 cA
	Cenoura	54,59 dA	57,78 dA
	BDA	45,57 eB	57,13 dA
	Aveia	65,95 cA	67,52 cA
	V8	53,66 dB	62,87 cA
25°C	Milho-Cenoura	71,28 bA	68,66 bA
	Cenoura	73,06 bA	66,00 cB
	BDA	67,60 cA	62,47 cA
	Aveia	71,00 bA	63,27 cB
	V8	70,77 bA	62,99 cB
30°C	Milho-Cenoura	64,36 cB	76,03 aA
	Cenoura	69,19 cA	71,21 bA
	BDA	67,69 cA	70,20 bA
	Aveia	79,60 aA	79,84 aA
	V8	72,32 bA	75,68 aA
CV%		21,28	

*Médias de cinco repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p = 0,05)

As colônias crescidas em condição de alternância luminosa apresentaram aspectos distintos em função do isolado e meio de cultivo testado. Os dois isolados crescidos em meio BDA, aveia e V8 apresentaram colônias mais densas e volumosas do que as colônias produzidas pelo cultivo do fungo nos meios milho-cenoura e cenoura (Figuras 6 e 7, linha C). O cultivo do isolado Py5003 em meio aveia produziu colônias branco-acinzentadas, lisas e cotonosas, enquanto que, o cultivo do isolado Py6017, também em aveia, produziu colônias cinza-escuras de bordos esbranquiçados, micélio abundante e de crescimento com formação de halos concêntricos, indicando variabilidade de respostas morfológicas em função dos isolados testados mesmo quando crescidos em um mesmo meio de cultivo (Figuras 6-4C e 7-4C). A temperatura pareceu não ter efeito sobre o perfil cromático das colônias.

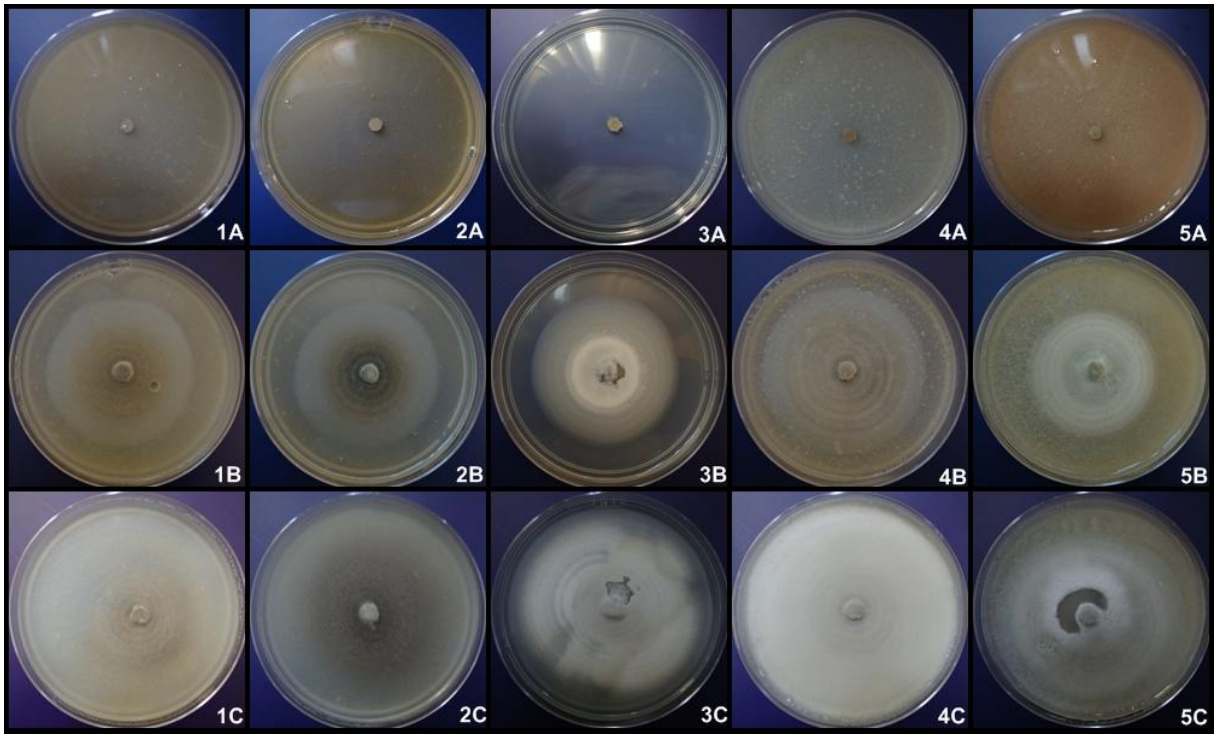


Figura 6 – Crescimento micelial do isolado Py5003 do fungo *Magnaporthe oryzae* obtido de trigo, em diferentes condições de luminosidade – luz contínua (A), escuro contínuo (B) e alternância luminosa (fotoperíodo de 12h) (C) – e meio de cultivo – milho-cenoura (1), cenoura (2), BDA (3), aveia (4) e V8 (5) – após 20 dias de incubação a 25°C

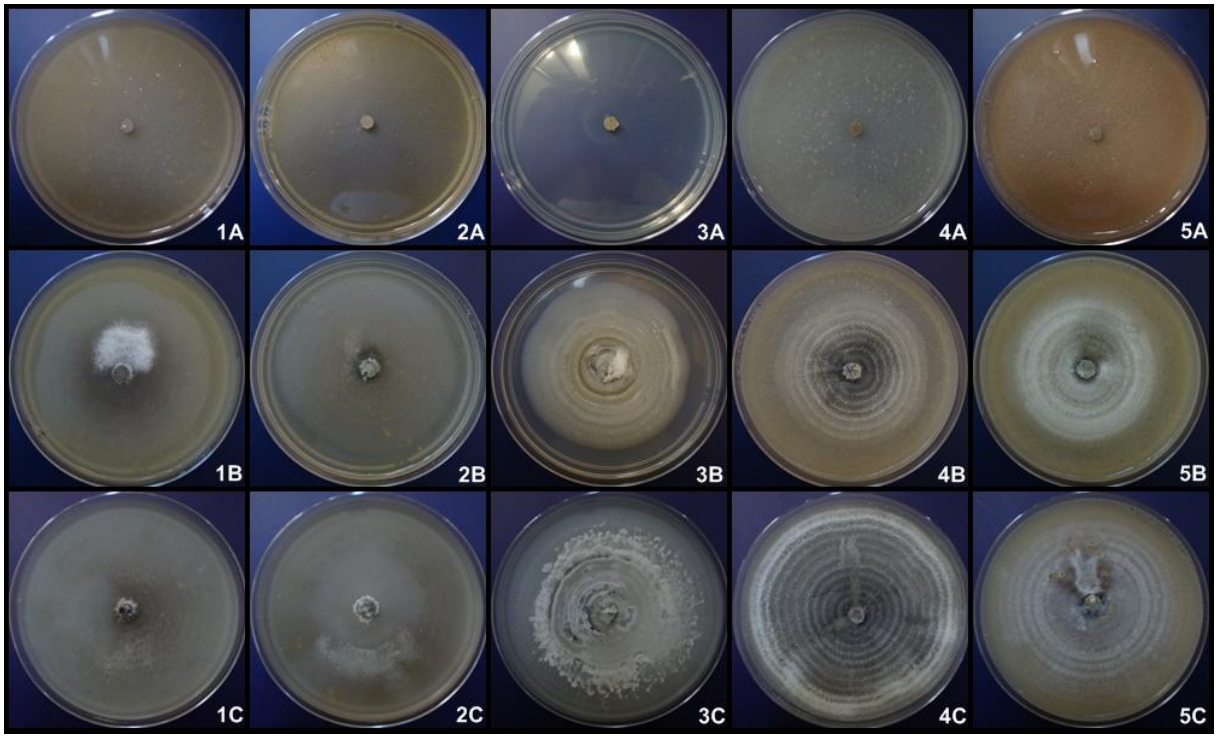


Figura 7 – Crescimento micelial do isolado Py6017 do fungo *Magnaporthe oryzae* obtido de trigo, em diferentes condições de luminosidade – luz contínua (A), escuro contínuo (B) e alternância luminosa (fotoperíodo de 12h) (C) – e meio de cultivo – milho-cenoura (1), cenoura (2), BDA (3), aveia (4) e V8 (5) – após 20 dias de incubação a 25°C

Em fotoperiodicidade, os isolados apresentaram alta esporulação, atingindo o seu máximo quando crescidos em meio de cultivo aveia, incubados a 25°C, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Além disso, o isolado Py5003 mostrou esporulação estatisticamente maior do que o isolado Py6017 quando os dois foram submetidos às temperaturas de 20, 25 e 30°C. Assim sendo, o cultivo de Py5003, a 25°C, apresentou-se como o tratamento de maior esporulação do fungo neste ensaio (Tabela 3; APÊNDICE F).

Tabela 3 – Influência da temperatura e do meio de cultivo sobre a esporulação de dois isolados do fungo *Magnaporthe oryzae* em condições de alternância luminosa (fotoperíodo de 12h)

Temperatura	Meio de Cultivo	Isolados*	
		Py5003**	Py6017**
15°C	Milho-Cenoura	12,0 cA	11,0 bA
	Cenoura	12,5 cA	10,5 bA
	BDA	13,5 cA	13,5 bA
	Aveia	20,5 bA	15,5 bA
	V8	14,0 cA	13,0 bA
20°C	Milho-Cenoura	10,5 cA	10,0 bA
	Cenoura	11,5 cA	11,0 bA
	BDA	13,0 cA	11,5 bA
	Aveia	23,0 bA	14,5 bB
	V8	12,0 cA	11,0 bA
25°C	Milho-Cenoura	13,0 cA	11,5 bA
	Cenoura	13,0 cA	15,0 bA
	BDA	12,5 cA	16,5 bA
	Aveia	33,0 aA	26,5 aB
	V8	14,0 cA	14,0 bA
30°C	Milho-Cenoura	12,0 cA	12,5 bA
	Cenoura	13,0 cA	14,5 bA
	BDA	15,5 cA	12,5 bA
	Aveia	25,0 bA	18,5 bB
	V8	13,5 cA	16,0 bA
CV%		34,26	

*Médias de cinco repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p = 0,05)

**Média x 10^5 esporos/mL

A composição e concentração de nutrientes no substrato, o requerimento nutricional e a variabilidade fisiológica do isolado, além das condições ambientais, podem influenciar a multiplicação de conídios de fungos fitopatogênios. Cruz, Prestes e Maciel (2009), avaliando a esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultivo e regimes de luz, verificaram que, o isolado utilizado, obtido a partir da cultivar de trigo ‘BRS-194’, apresentou crescimento em todas as condições de luminosidade oferecidas ao fungo (escuro, luz contínua e fotoperíodo de 12h), entretanto, a esporulação variou tanto em função das condições de luminosidade quanto do meio de cultivo usado para o crescimento do patógeno, sendo que, os maiores valores significativos foram observados no meio de farinha de trigo, aveia, arroz e BSA, em fotoperíodo de 12h.

A baixa ou ausência de esporulação de *Pyricularia grisea* (sin. *P. oryzae*) em escuro contínuo já havia sido relatada por Kato e Dimond (1966). De acordo com esses autores, a produção de conidióforos na ausência de luz é mais lenta quando comparada à presença de luz e dificilmente gera conídios. Além disso, Namai e Yamanaka (1985) observaram que a esporulação de *M. oryzae* está relacionada à idade da hifa conidiogênica, sendo ausente nas margens das colônias, onde as hifas são mais novas, abundante na área localizada após 10-15 mm, internamente ao bordo da cultura e decrescente à medida que se aproxima do centro da placa de Petri.

Netam et al. (2013) avaliando a influência de diferentes meios de cultivo, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, temperatura e pH sobre o crescimento micelial e esporulação de *P. grisea*, isolado de milheto, constataram que o cultivo do patógeno na faixa de temperatura que variou dos 25 aos 30°C favoreceu o crescimento e esporulação do fungo, assim como observado neste trabalho. Maior crescimento vegetativo *in vitro* para *M. oryzae* foi observado por Partridge-Metz e Chandra (2011) quando o fungo foi incubado a 26°C nos meios de cultivo BDA, V8 e aveia. Além disso, os autores destacaram maior ocorrência de pigmentação do patógeno quando cultivado nos meios V8 e aveia.

Dias Neto et al. (2010), também avaliando a influência do meio de cultivo na esporulação de *M. oryzae*, além da relação da concentração de conídios com a severidade da brusone em arroz, verificaram que quando cultivado em aveia, o fungo apresentou esporulação significativamente superior aos demais tratamentos, assim como observado para os isolados Py5003 e Py6017. Além disso, os autores citam que a maior concentração de esporos proporcionou maior severidade da doença em plantas inoculadas com suspensão de conídios preparadas a partir do cultivo de *M. oryzae* em aveia, quando comparadas às plantas inoculadas com suspensão de conídios preparadas a partir do crescimento do fungo em outros meios de cultivo. Andrade et al. (2007), trabalhando com *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de antracnose no mamoeiro e em diversas outras fruteiras tropicais, verificou que diferentes meios de cultivo, além de ocasionarem diferenças quanto ao crescimento e desenvolvimento das colônias do fungo, podem influenciar na severidade do patógeno na cultura. Tais resultados apontam para a necessidade da escolha correta do meio de cultivo para o preparo e padronização

de inóculo, sendo esta uma das principais dificuldades enfrentadas por grupos de pesquisa que visam à identificação de plantas resistentes às doenças.

As diferenças de respostas morfológicas observadas entre os diferentes isolados de *M. oryzae* para crescimento micelial e esporulação, independente do regime luminoso e meio de cultivo utilizado, são variáveis devido à enorme variabilidade genética que a espécie apresenta (DEAN et al., 2005; URASHIMA et al., 2004).

4.2 Estimativa da pressão de turgor do apressório

Os resultados demonstraram que os dois isolados do fungo apresentaram elevada pressão de turgor no interior de seus apressórios, importante para a formação do *peg* de penetração e início da infecção. O isolado Py6017 apresentou maior pressão de turgor do que o isolado Py5003 e ambas situam-se na faixa dos 7,5 MPa (Figura 8).

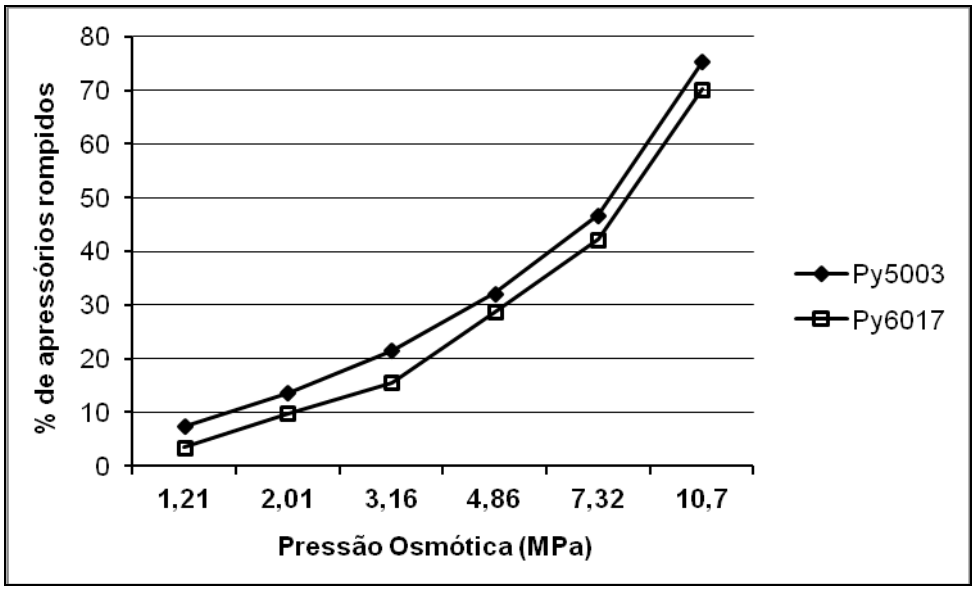


Figura 8 – Pressão de turgor dos apressórios de dois isolados do fungo *Magnaporthe oryzae*, Py5003 e Py6017

Quanto mais se aumentou a concentração de solutos na solução extra-austorial, maior foi a quantidade de apressórios rompidos, caracterizados morfologicamente por uma fissura de cor escura sobre a estrutura de fixação (Figuras 9C, D e E). A cor escura da área apressorial em colapso demonstra a

presença do pigmento melanina no interior da parede do apressório que, depois de rompida, fica exposto.

Figura 9 – Representação dos conídios de *Magnaporthe oryzae* antes (A) e após (B) a germinação. As setas em vermelho (C, D e E) apontam para o ponto de lise apressorial, após a substituição da água pela solução de PEG-8000

Esta técnica tem sido amplamente utilizada para a determinação da pressão de turgor apressorial de isolados fúngicos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, onde para a espécie de *C. acutatum* Simmonds, valores na faixa de 6,0 MPa já foram descritos (CHEN et al., 2004; LIAO et al., 2012).

Tentativas anteriores de medição direta da pressão de turgor do apressório de *M. oryzae* com o auxílio de sonda de pressão foram inúteis devido ao tamanho reduzido da estrutura (HÜSKEN; STEUDLE; ZIMMERMMAN, 1978; MONEY, 1990). Howard et al. (1991), aplicando técnica semelhante a utilizada neste trabalho, aferiram que a pressão de turgor de diferentes isolados de *M. oryzae*, obtidos de arroz, estava na faixa de 8,0 MPa, valor próximo ao encontrado para os isolados Py5003 e Py6017. Ebolle (2007) afirma que a pressão de turgor apressorial do agente causal da brusone em gramíneas chega a 80 atmosferas ou 800 metros de coluna d'água, valores equivalentes a 8,08 MPa.

Money e Howard (1996) confirmaram em seus experimentos que existe correlação entre a pigmentação do apressório, a pressão de turgor e a patogenicidade de isolados selvagens, produtores de melanina, e mutantes, deficientes quanto à produção do pigmento. Enquanto que os isolados mutantes geravam apressórios capazes de suportar pressão de turgor máxima de 1,92 MPa, isolados selvagens suportavam valores na faixa de 6,18 MPa, valor 3,2 vezes maior do que o observado em isolados mutantes. Os primeiros eram incapazes de penetrar eficientemente membranas de poliéster, enquanto que os selvagens eram altamente eficientes, formando os chamados "appressorial footprint", observados a partir da remoção do conídio por sonicação, como proposto por Howard e Ferrari (1989).

A reprodução do fungo, desenvolvimento e demais eventos que culminam na patogenicidade são mediados por fatores genotípicos de cada espécie de microrganismo. Liu et al. (2007) apontam para a necessidade da expressão do gene *MgATG1*, codificador da enzima serina-treonina quinase, importante no processo de autólise do conídio e geração do apressório de *M. oryzae*. Em patógenos mutantes, Δ*Mgatg1*, nos quais o gene codificador da enzima foi deletado e, portanto, a autólise do conídio foi bloqueada, não foi verificada a formação de mucilagem na parte mais afilada da estrutura, importante nas etapas iniciais de fixação do patógeno ao substrato. Além disso, tais modificações geraram baixa pressão de turgor do apressório formado e, também, atraso no início da germinação do conídio. Consequentemente, o isolado mutante foi incapaz de causar doença em arroz e cevada. O inverso foi observado para os isolados portadores do gene *MgATG1*, codificador da enzima, mostrando o relevante papel da pressão de turgor apressorial como primeiro passo à patogenicidade (VENEAULT-FOURREY et al., 2006).

4.3 Teor de proteínas totais do micélio

Em valores absolutos, foi verificado maior teor de proteínas totais, expressas em mg de proteína/g de micélio, no isolado Py5003 do que no isolado Py6017 (Figura 10). Entretanto, a análise de variância demonstrou que não há diferenças significativas quanto à produção de proteínas totais entre os isolados.

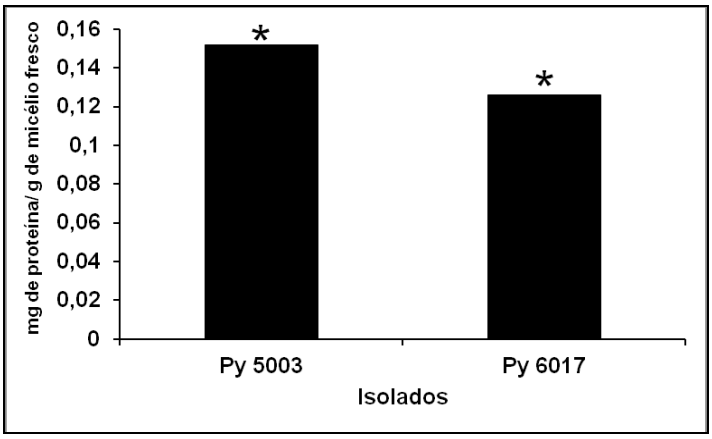


Figura 10 – Teor de proteínas totais do micélio fresco produzido pelos isolados Py5003 e Py6017 do fungo *M. oryzae*. (*) Não há diferenças significativas entre os tratamentos

4.4 Determinação da atividade celulolítica

4.4.1 Atividade da enzima exo-β-1,4-glucanase (avicelase, celobiohidrolase)

A Figura 11 apresenta os dados da atividade enzimática *in vitro* de exo-β-1,4-glucanase. O patógeno foi capaz de produzir a enzima no meio MNM acrescido de celulose microcristalina (Avicel, 1%), com pico de produção aos seis dias de cultivo, apresentado sucessivo decréscimo após esse período, tanto para Py5003 quanto para Py6017 (Figuras 11A e B). Sabe-se que a exo-β-1,4-glucanase atua sobre a celulose microcristalina solubilizando-a através da remoção de unidades de celobiose da cadeia de celulose. Porém, esta enzima também está sujeita à repressão catabólica através da celobiose ou glicose. Neste caso, é possível que *M. oryzae* tenha produzido a enzima até por volta do 6° dia de cultivo, período suficiente para a hidrólise parcial do substrato e produção de celobiose em quantidade capaz de inibir a enzima, determinando assim um decréscimo na atividade após esse período (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

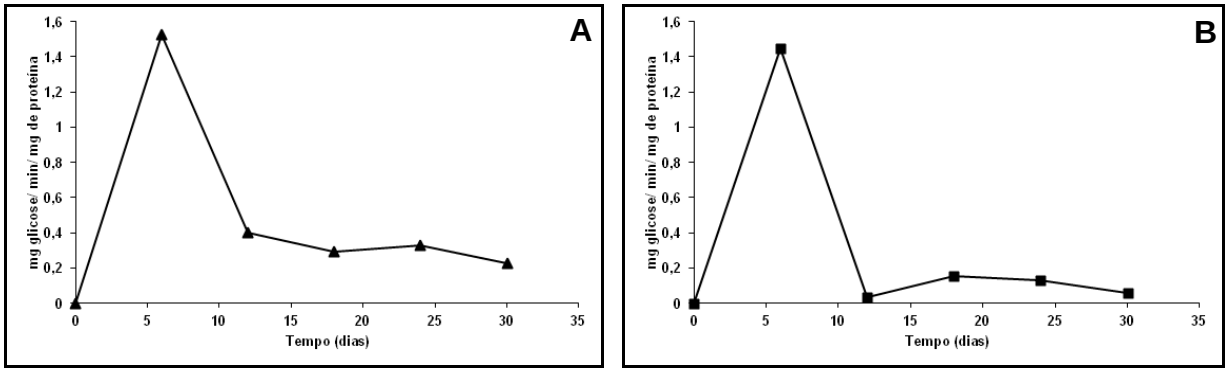


Figura 11 – Produção de exo β-1,4 gucanase por dois isolados do fungo *Magnaporthe oryzae*, Py5003 (A) e Py6017 (B), cultivados em meio MNM acrescido de celulose microcristalina 1% (Avicel), como fonte de carbono. Atividade enzimática determinada pelo método espectrofotométrico indireto, tendo Avicel como substrato

Endoglucanases de um sistema típico de enzima celulase são inibidas pela presença de celobiose (CHAVES, 1982) o que, possivelmente, pode ter ocorrido também com as celobiohidrolases produzidas pelos isolados de *M. oryzae*. O acúmulo de celobiose enquanto inibidor da atividade de avicelases, produzidas por fungos fitopatogênicos, já foi confirmado por inúmeros pesquisadores (GARDNER; DOERMER; WHITE, 1987; GRUNO et al., 2004; LAHJOUJI et al., 2007; MORAG et al., 1991; SCHMIDHALTER; CANEVASCINI, 1993). Esses autores verificaram que muitos microrganismos possuem celulossomas, complexos enzimáticos capazes de degradar a celulose, sendo que a celobiohidrolase já foi relatada como componente de celulossomas em *Clostridium thermocellum* e, o acúmulo de celobiose apontado como inibidor de avicelases produzidas pela bactéria (BAYER et al., 2008; MORAG et al., 1991).

Exoglucanases fúngicas pertencem às famílias glicosil-hidrolase 6 e 7 (GH-6 e GH-7) e, baseado no sequenciamento genômico completo do gênero *Magnaporthe* (DEAN et al., 2005), hoje é aceito que o fungo apresenta três representantes de celobiohidrolases na família GH-6 e quatro representantes na família GH-7 (TAKAHASHI et al., 2010). A caracterização de uma dessas celobiohidrolases (MoCel6A), produzida por *M. oryzae*, demonstrou alta atividade da enzima nos estágios iniciais de produção (6-10 dias), assim como observado para Py5003 e Py6017, com progressivo decréscimo nos dias subsequentes (TAKAHASHI et al., 2010). Além disso, os autores observaram que a adição de celobiose aos meios de

cultivo utilizados para a indução da produção enzimática, inibiu consideravelmente a produção de exo-β-1,4-gucanase.

Ainda referente ao complexo de enzimas celulolíticas, aqui representado pelo efeito sinergístico de endo e exoglucanase e β-glicosidase, em termos absolutos, foi verificada maior produção de exoglucanase do que das demais enzimas celulolíticas estudadas, assim como observado por Pettipher e Letham (1979) na purificação e caracterização de uma exo-β-1,4-glucanase produzida por *Ruminococcus flavefaciens*, bactéria fitopatogênica com alto potencial celulolítico.

Em fungos celulolíticos, a exemplo de *Humicola* sp. e *Trichoderma* sp., já foi relatada por Chaves (1982) a produção de exo-β-1,4-glucanase quando cultivados em meio contendo celulose microcristalina como substrato e indutor. O autor verificou que *Humicola* sp. apresentou maior atividade de avicelase ligada à massa celular, correspondente ao precipitado obtido após a centrifugação em meio mineral e meio mineral + celulose microcristalina. Para *T. reesei* a maior atividade da enzima foi observada no sobrenadante de ambos os meios testados.

4.4.2 Atividade da enzima endo-β-1,4-glucanase (carboximetilcelulase, CMCase)

Para endo-β-1,4-glucanase, verificou-se que os isolados Py5003 e Py6017 do fungo *M. oryzae* cultivados em CMC apresentaram atividade enzimática relativamente menor quando o meio foi suplementado com uma pequena quantidade de glicose (0,1%) como fonte de carbono, embora o perfil da atividade enzimática para ambos os meios tenha sido praticamente o mesmo. A maior atividade enzimática ocorreu 6 dias após o cultivo, para os dois isolados, com redução nos dias subsequentes, apresentando-se praticamente constante até o final do experimento.

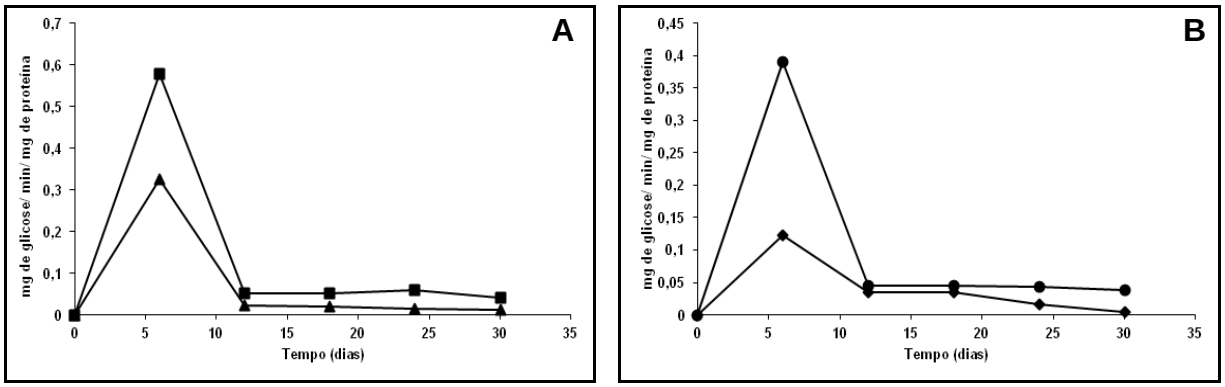


Figura 12 – Produção de endo-β-1,4-glucanase por dois isolados do fungo *Magnaporthe oryzae*, Py5003 (A) e Py6017 (B), cultivados em meio MNM acrescido de carboximetilcelulose 0,5% (CMC) ou CMC + glicose (0,1%), como fontes de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo carboximetilcelulose (CMC) como substrato. (■ ; ●) CMC; (▲ ; ♦) CMC + glicose

Linkins e Antibus (1981) verificaram que a presença de glicose no meio reprimia a atividade de endoglucanase em *Cenococcum geophilum* e *Hebeloma pusillum*. O mesmo foi verificado por Schwan-Estrada et al. (2003), avaliando a atividade da enzima produzida por *Cylindrocladium clavatum* em MNM com e sem adição de glicose.

Fungos e bactérias produzem endoclucanases pertencentes à família GH-12 com importante função na hidrólise de β-1,4-glucanas, tais como carboximetilcelulose (CMC) (GOEDEGEBUUR et al., 2002; OKADA et al., 1998; OOI et al., 1990) e, após o sequenciamento genômico de *M. oryzae* (DEAN et al., 2005), três endoglucanases pertencentes à família GH-12 já foram descritas para a espécie (TAKEDA et al., 2010). A caracterização enzimática de endo-1,3-1,4-β-glucanases, pertentencentes à família GH-12, de diferentes isolados de *M. oryzae*, demonstrou alta especificidade de determinada endoglucanase (MoCel12B), programada para superexpressão nos isolados, por substrato contendo carboximetilcelulose. Os autores apontaram ainda para a diminuição drástica da enzima na presença de glicose, assim como foi verificado para os isolados Py5003 e Py6017 (TAKEDA et al., 2010).

4.4.3 Atividade da β-glicosidase (celobiase)

O fungo *M. oryzae* apresentou incremento na atividade de β-glicosidase com o tempo de cultivo. O isolado Py5003, apresentou picos de produção da enzima aos 6 e 30 dias de cultivo em MNM com substituição da glicose por carboximetilcelulose (1%), e baixa produção enzimática no intervalo entre os picos máximos de produção (Figura 13A). Já o isolado Py6017 apresentou aumentos progressivos de produção enzimática no transcorrer dos dias, com picos máximos de produção observados aos 18 e 30 dias de cultivo do patógeno (Figura 13B). Para os dois isolados, os valores de produção da enzima em MNM acrescido de carboximetilcelulose (1%) foram maiores, em termos absolutos, que aqueles observados para a atividade enzimática obtidos no meio com celobiose (1%). O pico de produção com celobiose ocorreu aos 6 dias, com diminuição progressiva nos dias subsequentes, tanto em Py5003 quanto em Py6017.

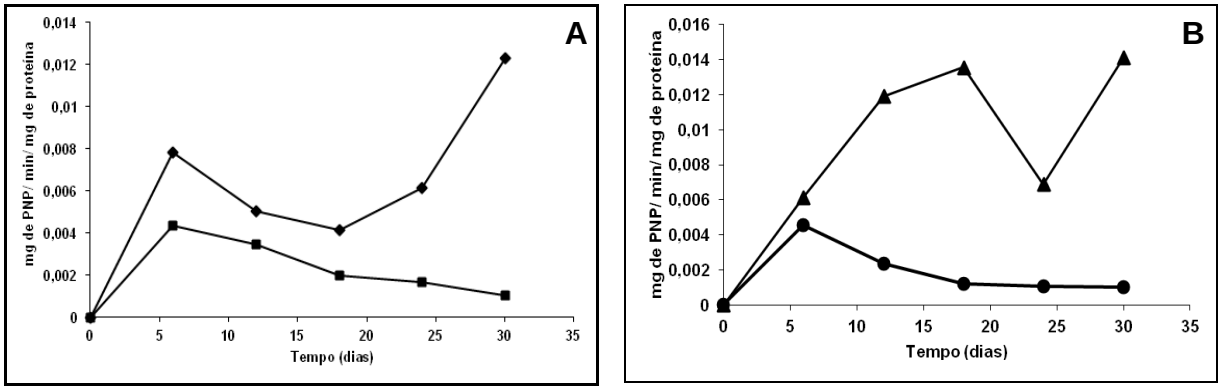


Figura 13 – Produção de β-glicosidase por dois isolados do fungo *Magnaporthe oryzae*, Py5003 (A) e Py6017 (B), cultivado em meio MNM acrescido de celobiose 1% (■ ; ●) e carboximetilcelulose 1% (♦ ; ▲). Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo *ρ*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo como substrato

A baixa atividade apresentada pode indicar que a celobiose, na concentração utilizada, teria reprimido a ação enzimática extracelular, sendo esse substrato hidrolisado pela enzima celobiase intracelular, levando ao acúmulo de glicose que age como repressor enzimático (MANDELS; REESE, 1960).

A produção de β-glicosidase *in vitro* já foi relatada por Peres et al. (2000) para *Fusarium*, *Ascochyta* e *Colletotrichum*, e por Kader e Omar (1998), que observaram a produção da enzima por três espécies de *Aspergillus* e duas de

Trichoderma, quando cultivadas em meio de cultivo suplementados com caboximetilcelulose. A atividade celulolítica de β-glicosidase em *C. clavatum* também já foi descrita por essa técnica por outros autores onde, também em presença de celobiose, o fungo mostrou baixa atividade enzimática (SHWAN-ESTRADA et al., 2003).

Takahashi, Konish e Takeda (2011), estudando a caracterização bioquímica de β-glicosidases produzidas por *M. oryzae* e a eficiência dessas enzimas na hidrólise da β-glucana, verificaram que a ação da enzima resulta na liberação de glicose e celobiose, com subsequente supressão enzimática. Além disso, os autores destacam que os eventos que culminam na completa hidrólise da celulose presente na parede celular, são integrados, e a presença de celobiohidrolases maximizam a ação da β-glicosidase.

4.5 Metabólitos tóxicos

Os resultados contidos nos itens 4.5.1 e 4.5.2 são referentes à quantificação da liberação de eletrólitos por condutivimetria de fragmentos de raízes e folhas de plântulas de trigo, expostas aos filtrados dos isolados Py5003 e Py6017, após 5 e 10 dias de cultivo em BD e o efeito desses filtrados e suspensão de conídios de *M. oryzae* sobre o desenvolvimento de plântulas, respectivamente.

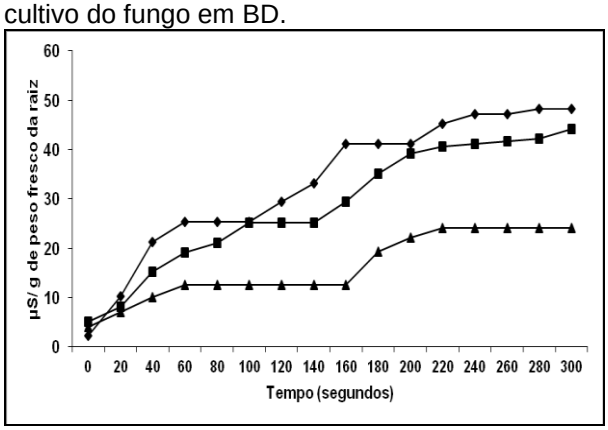
4.5.1 Quantificação da liberação de eletrólitos por condutivimetria

A Figura 14 apresenta o resultado da liberação de eletrólitos determinada pela exposição de fragmentos de raízes e folhas de plântulas de trigo, cultivar BRS 264, ao filtrado obtido a partir do cultivo dos isolados Py5003 e Py6017 por 5 e 10 dias em BD (batata-dextrose). Os resultados sugerem a presença de metabólitos tóxicos produzidos por *M. grisea*.

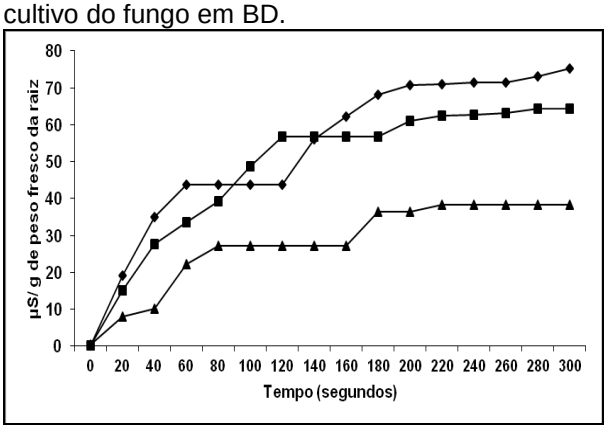
Os fragmentos de raízes e folhas expostos ao filtrado obtido no 10° dia de cultivo do fungo, para os dois isolados, exibiram maior liberação de eletrólitos, indicando que, provavelmente, deve haver um pico de produção desses metabólitos neste ou em um período superior a este. Dentre os isolados, observou-se, também, maior condutividade, ao longo do tempo, da exposição de fragmentos de plântulas ao filtrado proveniente do cultivo de Py5003, indicando maior atividade das

substâncias liberadas por esse isolado. Maior atividade dos filtrados foi observada quando do contato destes com folhas de trigo do que com raízes da plântula, nas duas épocas de observação (Figura 14).

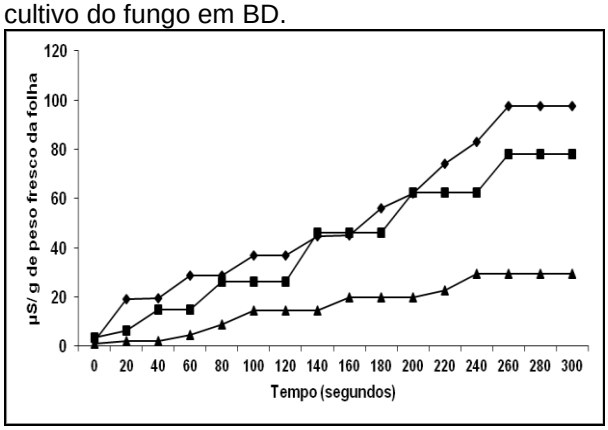
A. Raiz exposta ao filtrado obtido no 5º dia de cultivo do fungo em BD.



B. Raiz exposta ao filtrado obtido no 10º dia de cultivo do fungo em BD.



C. Folha exposta ao filtrado obtido no 5º dia de cultivo do fungo em BD.



D. Folha exposta ao filtrado obtido no 10º dia de cultivo do fungo em BD.

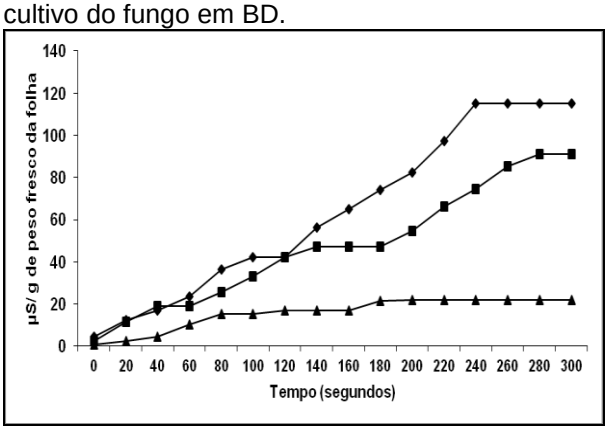


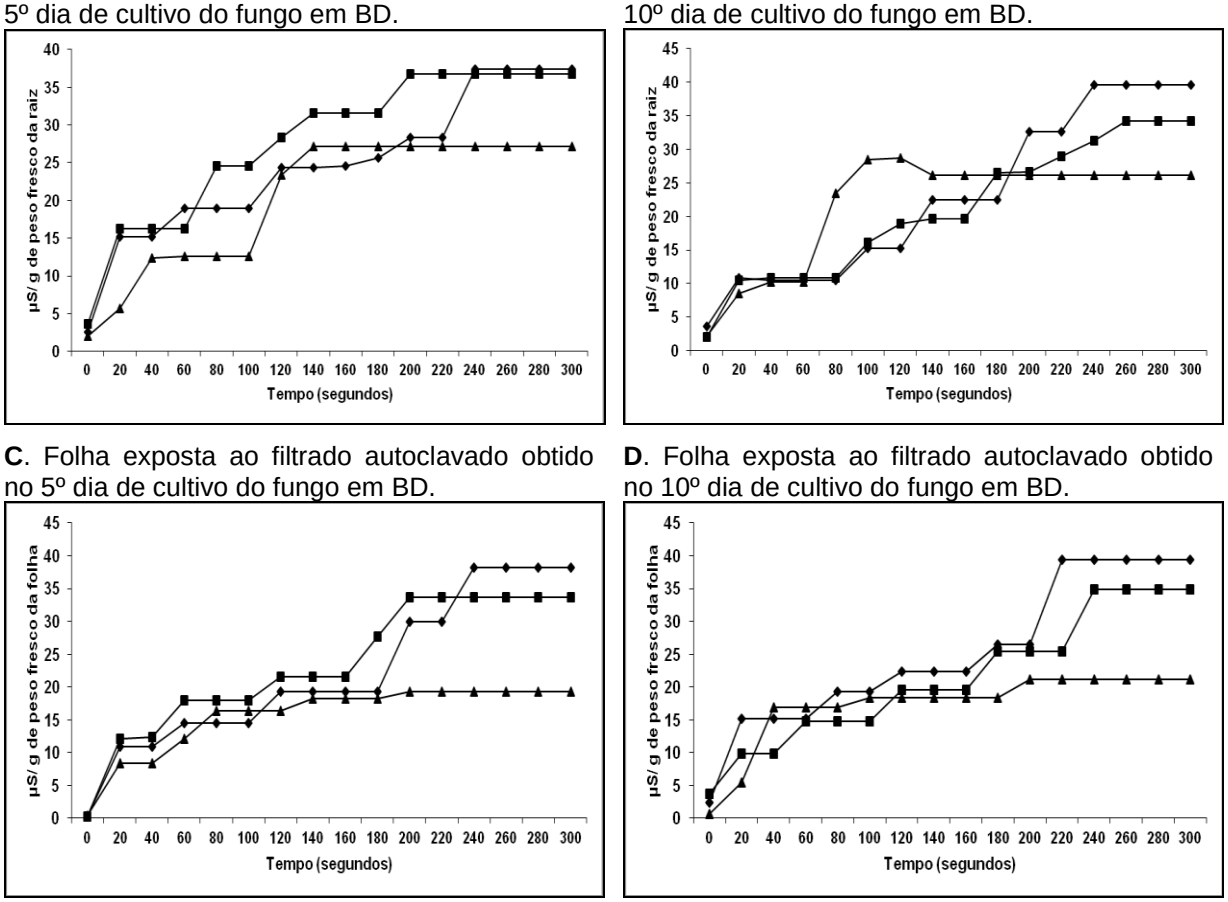
Figura 14 – Quantificação da liberação de eletrólitos em raiz e folha de trigo expostas ao filtrado de dois isolados do fungo *M. oryzae* cultivado em meio BD por 5 e 10 dias. Isolado Py5003 (-♦-); Isolado Py6017 (-■-); controle BD (-▲-)

A Figura 15 representa a atividade dos filtrados, após autoclavagem (121 °C/1 atm/20 min). Os resultados obtidos demonstraram pronunciada redução da liberação de eletrólitos no filtrado obtido a partir do cultivo dos isolados Py5003 e Py6017 de *M. oryzae* em BD, por 5 e 10 dias, sendo que, quando comparado ao filtrado não autoclavado, na segunda época de coleta, essa redução foi ainda mais pronunciada. Contudo, o perfil observado no ensaio em que se utilizou o filtrado não autoclavado, foi mantido neste ensaio e o isolado Py5003 apresentou maior atividade do que Py6017, quando em contato com fragmentos de raiz e folha de plântulas de trigo, em todas as épocas observadas.

As diferenças quanto à atividade do filtrado, em relação aos valores absolutos expressos em µS/g de peso fresco, nas diferentes épocas testadas, foram mínimas para o filtrado autoclavado. Também com relação à parte da planta exposta aos metabólitos, raiz ou folha, não se observou diferenças quanto à capacidade do filtrado de degradar as membranas celulares das plântulas (Figura 15).

A. Raiz exposta ao filtrado autoclavado obtido no 5º dia de cultivo do fungo em BD.

B. Raiz exposta ao filtrado autocavado obtido no 10º dia de cultivo do fungo em BD.



C. Folha exposta ao filtrado autoclavado obtido no 5º dia de cultivo do fungo em BD.

D. Folha exposta ao filtrado autoclavado obtido no 10º dia de cultivo do fungo em BD.

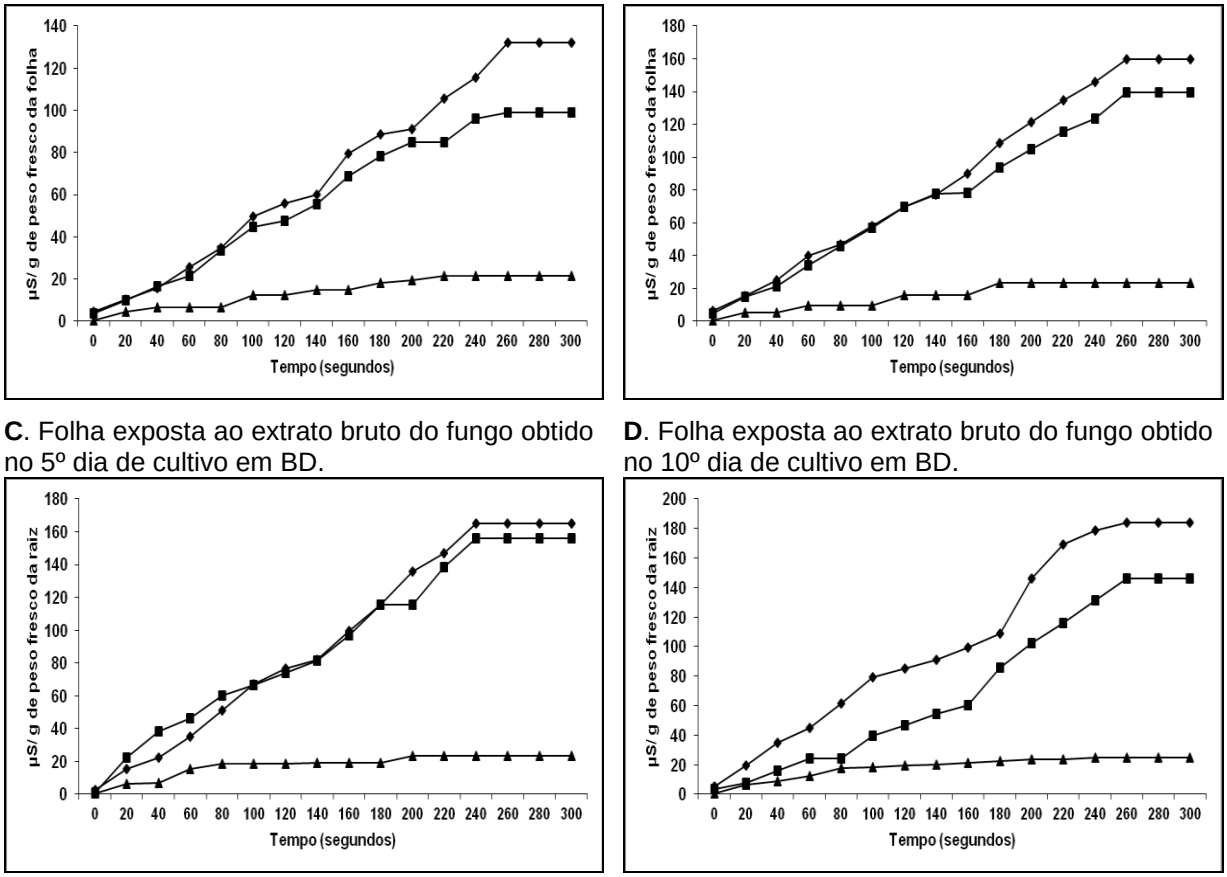
Figura 15 – Quantificação da liberação de eletrólitos em raiz e folha de trigo expostas ao filtrado autoclavado de dois isolados do fungo *M. oryzae* cultivado em meio BD por 5 e 10 dias. Isolado Py5003 (-♦-); Isolado Py6017 (-■-); controle BD (-▲-)

Os resultados obtidos a partir da liberação dos eletrólitos de fragmentos de raízes e folhas de trigo expostos ao extrato bruto obtido da separação com acetato de etila estão representados na Figura 16. Os dados demonstraram aumento, em valores absolutos, da atividade metabólica do filtrado, quando usado na forma de extrato bruto, em comparação com o filtrado autoclavado ou não. Maior atividade foi observada para o extrato bruto obtido da filtragem dos isolados aos 10 dias de cultivo em BD. O extrato do isolado Py5003 apresentou maior atividade para as duas

épocas testadas, independentemente da parte vegetal exposta. Também neste caso, assim como para o filtrado não autoclavado, observou-se maior liberação de eletrólitos quando se expôs fragmentos de folha quando comparada à exposição de fragmentos de raiz ao extrato bruto obtido do filtrado dos isolados, para as duas épocas de coleta dos filtrados (Figura 16).

A. Raiz exposta ao extrato metanólico do fungo obtido no 5º dia de cultivo em BD.

B. Raiz exposta ao extrato metanólico do fungo obtido no 10º dia de cultivo em BD.



C. Folha exposta ao extrato bruto do fungo obtido no 5º dia de cultivo em BD.

D. Folha exposta ao extrato bruto do fungo obtido no 10º dia de cultivo em BD.

Figura 16 – Quantificação da liberação de eletrólitos em raiz e folha de trigo expostas ao filtrado, na forma de extrato bruto, de dois isolados do fungo *M. oryzae* cultivado em meio BD por 5 e 10 dias. Isolado Py5003 (-♦-); Isolado Py6017 (-■-); controle BD (-▲-)

4.5.2 Observação dos sintomas em plântulas de *Triticum aestivum*

A exposição de plântulas de trigo ao filtrado não autoclavado, obtido a partir do cultivo dos isolados Py5003 e Py6017 de *M. oryzae*, coletado aos 5 e 10 dias de incubação, implicou em mau desenvolvimento das raízes, amarelecimento, murcha e necrose da parte aérea da plântula, o que afetou diretamente o peso fresco total das parcelas. Contudo, em presença de suspensão de conídios (SC) dos isolados, as

plantas apresentaram maiores valores para o peso fresco total, não diferindo significativamente do tratamento controle, mas sendo estatisticamente superiores às parcelas tratadas com os filtrados (Figura 17 e Tabela 4).

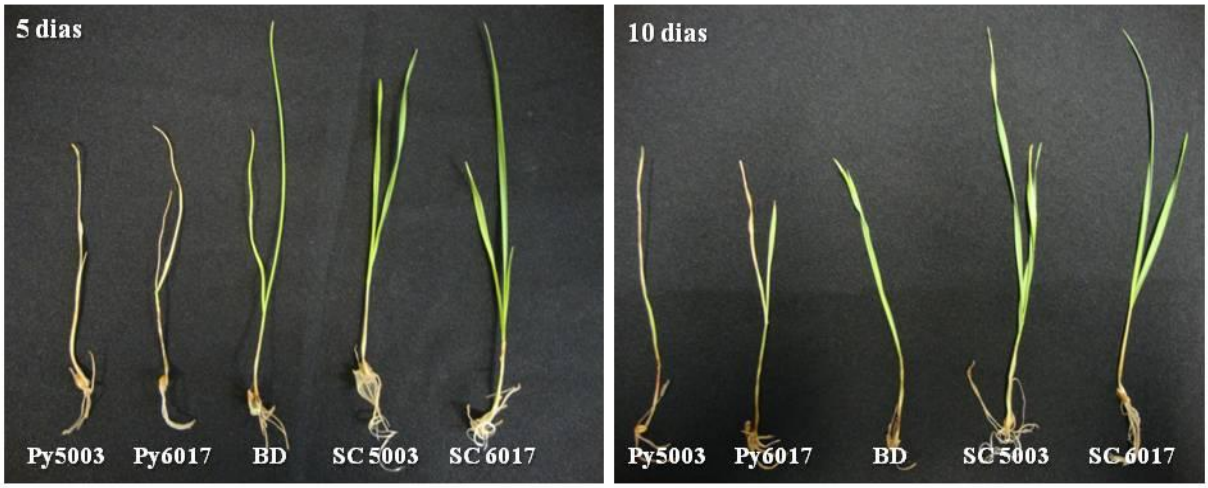


Figura 17 – Sintomas e aspecto das plântulas de trigo, com 25 dias de idade, expostas ao filtrado do meio de cultivo BD, obtido após 5 e 10 dias de crescimento fúngico dos isolados Py5003 e Py6017, ao controle BD e às suspensões de conídios dos isolados Py5003 (SC 5003) e Py6017 (SC 6017)

Adicionalmente, plântulas com o sistema radicular imerso em suspensão de conídios do isolado Py5003 (SC 5003) foram as únicas que diferiram significativamente daquelas submetidas à ação dos filtrados obtidos aos 5 dias de incubação de *M. oryzae*, apresentando indivíduos com peso fresco maior (Tabela 4). Para as plântulas colocadas em contato com os filtrados de 10 dias de crescimento fúngico, tanto o isolado Py5003 quanto o isolado Py6017, apresentaram pesos frescos totais significativamente inferiores aos demais tratamentos e plântulas com sistema radicular submerso na suspensão de conídios dos dois isolados foram estatisticamente iguais ao controle. Não houve diferença estatística quanto ao peso fresco total de plântulas entre os períodos de incubação dos filtrados, com exceção da suspensão de conídios do isolado Py6017 (SC 6017), incubada por 5 dias (Tabela 4).

Tabela 4 – Peso fresco total (g) de plântulas de trigo, com 25 dias de idade, expostas a filtrados e suspensão de conídios (SC) de *M. oryzae*

Tratamentos*	**Período de Incubação**	
	5 dias	**10 dias**
Filtrado Py5003	0,19 bA	0,15 bA
Filtrado Py6017	0,21 bA	0,16 bA
BD (CONTROLE)	0,23 abA	0,25 aA
SC 5003	0,30 aA	0,31 aA
SC 5017	0,27 abB	0,32 aA
CV%	18,93	

*Médias de seis repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p=0,05)

Schwan-Estrada et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes ao aplicarem esta metodologia para a verificação de metabólitos tóxicos produzidos por *Cylindrocladium clavatum* em plântulas de eucalipto, contudo, estas apresentaram sintomas da doença também sob a ação de suspensão de conídios do fungo.

Bousquet e Kollmann (1998), em estudos sobre a produção de metabólitos tóxicos produzidos por isolados de *Septoria nodorum*, verificaram que várias toxinas estavam envolvidas no desenvolvimento de sintomas em trigo e em cevada. Tsurushima et al. (2010) verificaram a presença de *Mag-toxina* e evidenciaram que ela está relacionada com a ocorrência de clorose, espécies reativas de oxigênio (ROS) e morte celular em plantas parasitadas por *P. oryzae.*

Trabalhos como o de Fugita et al. (1994) demonstraram a importância dos metabólitos tóxicos para a patogenicidade. Fluidos obtidos a partir da germinação de conídios de *P. oryzae* foram capazes de induzir suscetibilidade em plantas de arroz inoculadas com uma estirpe não patogênica de *Alternaria alternata*, independente da variedade de arroz utilizada no ensaio ou das raças do fungo causador da brusone utilizadas para a extração dos compostos. Em contrapartida, Aver'yanov, Lapikova e Lebrun (2007) sugerem que o ácido tenuazônico, fitotoxina isolada de *M. grisea* (sin. *M. oryzae*), apesar de causar pequenas manchas necróticas e de coloração marrom em folhas de arroz, pode estar relacionada à resistência local dessa gramínea à brusone.

Ando et al. (2010), estudando a 2'-deoxiuridina, coletada do sobrenadante obtido a partir de suspensão de conídios de *M. oryzae*, verificaram que a molécula está relacionada à promoção de crescimento de plantas de arroz, suscetíveis à

brusone. Quando inoculada em plantas resistentes à doença, a molécula não produzia qualquer efeito sobre as mesmas. Os autores afirmaram também que 2'-deoxiuridina não inibia as demais respostas de defesa da planta, como a expressão de genes relacionados à patogênese, PR-proteínas, acúmulo de peróxido de hidrogênio e produção de fitoalexinas. De forma semelhante aos resultados obtidos por esses autores, foi observado que a suspensão de conídios dos isolados Py5003 e Py6017 induziu crescimento em plântulas e estudos posteriores devem ser conduzidos no intuito de entender como se dá esse processo de indução.

Metabólitos tóxicos produzidos por fitopatógenos, normalmente, desempenham um papel importante no estabelecimento de interações compatíveis entre o patógeno e o hospedeiro (WALTON, 1996). Contudo, inúmeros mecanismos ainda são desconhecidos e precisam do empenho de pesquisadores interessados em elucidar tais processos o que facilitará, assim, o entendimento de passos metabólicos importantes na intricada relação patógeno-hospedeiro e que levarão ao cumprimento do objetivo prático da fitopatologia que é o controle de doenças de plantas.

5 CONCLUSÕES

A partir dos experimentos conduzidos, pode-se concluir que o fungo *M. oryzae* apresenta ponto ótimo para crescimento a temperatura de 30°C e esporulação a temperatura de 25 °C em fotoperíodo de 12 h, sendo o meio de cultivo composto de aveia o indicado para o seu melhor desempenho *in vitro*.

A pressão de turgor do apressório desenvolvido pelo patógeno, após a germinação do esporo, indispensável ao processo de infecção, situa-se na faixa dos 7,5 a 8,0 MPa, valores recorrentes entre diferentes isolados da espécie.

O fungo apresenta sistema enzimático com elevado potencial de degradação da celulose. Os picos mais altos de produção enzimática para exoglucanases e endoglucanases situam-se aos 6 dias de cultivo do patógeno em meio MNM, e β-glicosidase, a partir do 6° dia de cultivo no mesmo meio com aumento crescente nos dias subsequentes.

M. oryzae, quando em cultivo em meio BD por 5 e 10 dias, apresenta produção de metabólitos tóxicos capazes de causar sintomas cloróticos e necróticos em plântulas de trigo postas em contato com os filtrados do fungo obtidos nas duas épocas de coleta. A autoclavagem dos filtrados diminui, mas não elimina a atividade tóxica do material. A separação desses metabólitos tóxicos em acetato de etila e a obtenção de extrato bruto após ressuspensão em metanol aumenta a atividade eletrolítica sobre as plântulas.

As exposições de plântulas às suspensões de conídios produzidas a partir de isolados de *M. oryzae* induzem maior crescimento radicular e desenvolvimento do vegetal.

O fungo *M. oryzae* aparentemente apresenta um sistema integrado e bastante evoluído de parasitismo, onde a ação mecânica, representada pela pressão de turgor apressorial, o aparato enzimático e a produção de metabólitos tóxicos são mecanismos presentes e importantes para a infecção e, portanto, para o estabelecimento das relações parasitárias estáveis e subsequente colonização do hospedeiro, eventos evidenciados pelo aparecimento dos primeiros sintomas em plantas.

REFERÊNCIAS

AIST, J.R. Development of parasitic conidial fungi in plants. In: COLE, G.T.; KENDRICK, B. (Ed.). **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981. chap. 17, p. 77-103.

ALVES, K.J.P.; FERNANDES, J.M.C. Influência da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulação de *Magnaporthe grisea* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 579-584, 2006.

ANDO, S.; SATO, Y.; SHIGEMORI, H.; SHIMIZU, T.; OKADA, K.; YAMANE, H.; JIKUMARU, Y.; KAMIYA, Y.; AKIMOTO-TOMIYAMA, C.; TANABE, S.; NISHIZAWA, Y.; MINAMI, E. Identification and characterization of 2'-deoxyuridine from supernatant of conidial suspensions of rice blast fungus as an infection-promotion factor of rice plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, n. 5, p. 519-532, 2011.

ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfocultural e molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.

ATKINS, J.G.; ROBERT, A.L.; ADAIR, C.R.; GOTO, K.; KOZAKA, T.; YANAGIDA, R.; YAMADA, M.; MATSUMOTO, S. International set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, p. 297-301, 1967.

AVER'YANOV, A.A.; LAPIKOVA, V.P.; LEBRUN, M.H. Tenuazonic acid, toxin of rice blast fungus, induces disease resistance and reactive oxygen production in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 54, n. 6, p. 749-754, 2007.

BAYER, E.A.; LAMED, R.; WHITE, B.A.; FLINT, H.J. From cellulosomes to cellulosomics. **Chemical Record**, Tokyo, v. 8, p. 364-377, 2008.

BECHINGER, C.; GIEBEL, K.F.; SCHNELL, M.; LEIDERER, P.; DEISING, H.B.; BASTMEYER, M. Optical measurements of invasive forces exerted by appressorium of a plant pathogenic fungus. **Science**, Washington, v. 285, p. 1896-1899, 1999.

BEDENDO, I.P.; PRABHU, A.S. Doenças do arroz. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, 2005. cap. 12, p. 79-90.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 411-451, 1986.

BODENMANN, J.; HENIGER, U.; HOHL, H.R. Extracellular enzymes of *Phytophthora infestans*: endoglucanases, β-glucosidases, and 1,3-β-glucanases. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p. 75-82, 1985.

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

BOUSQUET, J.F.; KOLLMANN, A. Variation on metabolite production by *Septoria nodorum* isolates adapted to wheat or to barley. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, p. 273-277, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitication of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-257, 1976.

BRAUN, E.J.; HOWARD, R.J. Adhesion of fungal spores and germlings to host surfaces. **Protoplasma**, New York, v. 181, p. 202-212, 1994.

BRUNO, A.C.; URASHIMA, A.S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo e outros hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 21-26, 2001.

BUTLER, N.J.; DAY, A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 1115-1136, 1998.

CAO, W.G.; CRAWFORD, D.L. Purification and some properties of β-glicosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 125-129, 1993.

CARACUEL-RIOS, Z.; TALBOT, N.J. Cellular differentiation and host invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 339-345, 2007.

CERERINI, P.C.; MACIEL, J.L.; KHON, L.; LEVY, M.; MCDONALD, B.A. A '*de novo*' origin for the wheat adapted populations of *Magnaporthe oryzae* in Southern Brazil in levels of gene flow 20 years after the first epidemics. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, p. 221, 2011. Supplement.

CHAVES, V.M.G. **Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase**. 1982. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1982.

CHEN, Z.J.; NUNES, M.A.; SILVA, M.C.; RODRIGUES, C.J. Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 1199-1208, 2004.

CHILVERS, G.A.; DOUGLAS, P.A.; LAPEYRIE, F.F. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. **The New Phytologist**, New York, v. 103, p. 397-402, 1986.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, nono levantamento, julho 2012. Brasília, 2012. 34 p.

CRUZ, M.F.A. da; PRESTES, A.M.; MACIEL, J.L.N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1562-1564, 2009.

DASHPANDE, V.; ERIKSSON, K.E. 1,4-β-glucosidases of *Sporotrichum pulverulentum*. In: WOOD, W.A.; KELLOGG, S.T. (Ed.). **Methods in enzimology**. San Diego: Academic Press, 1988. v. 160, chap. 15, p. 415-424.

DEAN, R.A.; TALBOT, N.J.; EBBOLE, D.J.; FARMAN, M.L.; MITCHELL, T.K.; ORBACH, M.J.; THON, M.; KULKARNI, R.; XU, J-H; PAN, H.; READ, N.D.; LEE, Y-H, CARBONE, I.; BROWN, D.; OH, Y.Y.; DONOFRIO, N.; JEONG, J.S.; SOANES, D.M.; DJONOVIC, S.; KOLOMIETS, E.; REHMEYER, C.; LI, W.; HARDING, M.; KIM, S.; LEBRUM, M-H; BOHNERT, H.; COUGHLAN, S.; BUTLER, J.; CALVO, S.; MA, L-J.; NICOL, R.; PURCELL, S.; NUSBAUM, C.; GALAGAN, J.E.; BIRREN, B.W. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, London, v. 434, p. 980-986, 2005.

DIAS NETO, J.J.; SANTOS, G.R. dos; CASTRO NETO, M.D. de; CUNHA, A.C.F.; IGNÁCIO, M. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.

DIAS NETO, J.J.; SANTOS, G.R.; SILVA, L.M.A.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E.; CUNHA, A.C.F.; CANJÃO, E.R.; CASTRO NETO, M.D. Identificação de raças fisiológicas de *Pyricularia grisea* em arroz no Estado do Tocantins. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 186, 2008. Suplemento.

DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are non-pathogenic to papaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 235-242, 1986.

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

EMBRAPA. **Trigo**. 2012. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso em: 25 jul. 2012.

ENARI, T.M. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W.M. **Microbial enzyme and biotecnology applied sciences**. London: Applied Society, 1983. chap. 4, p. 183-223.

FAO. **FAOSTAT**. 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default. apsx>. Acesso em: 02 ago. 2012.

_____. **Crop prospects and food situation**. Rome, 2012. 40 p. (Series Global Overview, 2).

FROUPE, C. **Área total plantada em grãos (Conab)**. 2010. Disponível em: <http://www.clicrbs.com.br/canalrural/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&action=notitias&id=2804297&section=noticias>. Acesso em: 09 ago. 2012.

FUGITA, K.; ARASE, S.; HIRATSUKA, H.; HONDA, Y.; NOZU, M. The role of toxin(s) produced by germinating spores of *Pyricularia oryzae* in pathogenesis. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 142, p. 245-252, 1994.

GARCIA, E.O. **Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e o mecanismo de ação da taxtomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*):** aspectos bioquímicos e ultraestruturais. 2008. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

GARDNER, R.M.; DOERNER, K.C.; WHITE, B.A. Purification and characterization of an exo-β-glucanase from *Ruminoccocus flavefasciens* FD-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 169, p. 4581-4588, 1987.

GOEDEGEBUUR, F.; FOWLER, T.; PHILLIPS, J.; van der KLAY, P.; SOLINGEN, P.; DANKMEYER, L.; POWER, S.D. Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. **Current Genetics**, New York, v. 41, p. 89-98, 2002.

GOULART, A.C.P. Perdas em trigo causadas pela brusone. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., 2004, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2004. p. 123-130.

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F.A. Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 167-173, 1993.

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F.A.; MESQUITA, A.N. Ocorrência de brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*Triticum aestivum*) em Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 112-114, 1990.

GRUNO, M.; VALJAMAE, G.; PETTERSSON, G.; JOHANSSEN, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by celobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 86, p. 503-511, 2004.

HAMER, J.E.; HOWARD, R.J.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. A mechanism for surface attachment in spores of plant pathogenic fungus. **Science**, Washington, v. 229, p. 288-290, 1988.

HARDHAM, A.R. Cell biology of pathogenesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 491-526, 1992.

HEATH, M.C.; HOWARD, R.J.; VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. Ultrastructural interactions of one strain of *Magnaporthe grisea* with rice, goosegrass and weeping lovegrass. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, p. 779-787, 1992.

HEATH, M.C.; VALENT, B.; HOWARD, R.J.; CHUMLEY, F.G. Interactions of two strains of *Magnaporthe grisea* with rice, goosegrass and weeping lovegrass. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 1627-1637, 1990.

HIRAYAMA, T.; HORIE, S.; NAGAYAMA, H. Studies on cellulases of phytopathogenic fungus. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 84, p. 27-37, 1978.

HOWARD, R.J. Breaching the outer barriers: cuticle and cell wall penetration. In: CARROLL, G.C.; TUDZYNSKI, P. (Ed.). **The Mycota**: plant relationships. Berlin: Springer-Verlag, 1996. v. 6, p. 43-60.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in appressorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 13, p. 403-418, 1989.

HOWARD, R.J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 491-512, 1996.

HOWARD, R.J.; BOURETT, T.M.; FERRARI, M.A. Infection by *Magnaporthe*: an *in vitro* analysis. In: MENDGEN, K.; LESEMANN, D.E. (Ed.). **Electron microscopy of plant pathogens**. New York: Springer-Verlag, 1991. chap. 19, p. 251-264.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A.; ROACH, D.H.; MONEY, N.P. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 11281-11284, 1991.

HÜSKEN, D.; STEUDLE, E.; ZIMMERMANN, U. Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 61, p. 158-163, 1978.

IGARASHI, S.; UTIAMADA, C.M.; IGARASHI, L.C.; KAZUMA, A.H.; LOPES, R.S. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 351-352, 1986.

ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. London: Chapman & Hall, 1992. 418 p.

JELITTO, T.C.; PAGE, H.A.; READ, N.D. Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Planta**, Berlin, v. 194, p. 471-477, 1994.

JONES, G.L.; BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J. Sensitive staining of fungal extracellular matrices using colloidal gold. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 567-573, 1995.

KADER, A.J.; OMAR, O. **Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah**. 1998. Disponível em: <http://arbec.com.my/pdf/july-2.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2013.

KATO, H.; DIMOND, A.E.; Factors affecting sporulation of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, p. 864-865, 1966.

KOGA, H. Hypersensititive death, autofluorescence, and ultrastructural changes in cells of leaf sheaths of susceptible and resistant near-isogenic lines of rice (*Pi-z*) in relation to penetration and growth of *Pyricularia oryzae*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 72, p. 1463-1477, 1994.

KROKEN, S.; GLASS, N.L.; TAYLOR, J.W.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomicetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 15670-15675, 2003.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I. Melanin biosynthesis: prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In: COLE, G.T.; HOCK, H.C. (Ed.). **The fungal spore and disease initiation in plants**. New York: Plenum, 1991. chap. 10, p. 205-218.

LAHJOUJI, K.; STORMS, R.; XIAO, Z.; JOUNG, K.; ZHENG, Y.; POWLOWSKI, A.; TSANG, A.; VARIN, L. Biochemical and molecular characterization of cellobiohydrolase from *Trametes vesicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 75, p. 337-346, 2007.

LEUNG, H.; BORROMEO, E.S.; BERNARDO, M.A.; NOTTEGHEM, J.L. Genetic analysis of virulence in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 99, p. 1227-1233, 1988.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 47, p. 281-292, 1972.

LIAO, C.Y.; CHEN, M.Y.; CHEN, Y.K.; WANG, T.C.; SHEU, Z.M.; KUO, K.C.; CHANG, P.F.L.; CHUNG, K.R.; LEE, M.H. Characterization of three *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 133, p. 599-608, 2012.

LINKINS, A.E.; ANTIBUS, R.K. Mycorrhiza of *Salix rotundifolia*. In: LAURSERN, G.A.; AMMIRATI, F.F. (Ed.). **Arctic and alpine mycology**. Seatle: University of Washington Press, 1981. chap. 21, p. 509-531.

LIU, G.; QIN, Y.; HU, Y.; GAO, M.; PENG, S.; QU, Y. An endo-β-1,4-glucanase PdCel5C from cellulolytic fungus *Penicillium decumbens* with distinctive domain composition and hydrolysis product profile. **Enzyme and Micribial Technology**, New York, v. 52, p. 190-195, 2013.

LIU, X.H.; LU, J.P.; ZHANG, L.; DONG, B.; MIN, H.; LIN, F.C. Involvement of a *Magnaporthe grisea* Serine/Treonine Kinase gene, MgATG1, in appressorium turgor and pathogenesis. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 6, n. 6, p. 997-1005, 2007.

LÓPES-FRANCO, R.; HOWARD, R.J.; BRACKER, C.E. Satellite Spitzenkörper in growing hyphal tips. **Protoplasma**, New York, v. 188, p. 85-103, 1995.

LORIA, R.; CLARK, C.A.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A. Gram-positive bacteria: *Streptomyces*. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2001. chap. 3, p. 236-249.

MACIEL, J.L.N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources,** Washington, n. 50, p. 1-7, 2011.

MAGGIAN, R.C.; FELIPE, F.I. Aspectos da competitividade da cadeia tritícola no Brasil e Argentina. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Resumos...** Brasília: SOBER, 2009. p. 1-15.

MAIA, S.F. **Competitividade da produção de trigo no Paraná**. 1996. 109 p. Dissertação (Mestrado em Economia Rural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 79, p. 816-826, 1960.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi in the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.

MCHALE, A.; COUGHLAN, M.P. Synergistic hydrolisis of cellulose by components of the extracellular cellulase system of *Talaromyces emersonii*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 117, p. 319-322, 1980.

MEHTA, Y.R.; RIEDE, C.R.; CAMPOS, L.A.C.; KHOLI, M.M. Integrated management of major wheat diseases in Brazil: an example of the Southern Cone region of Latin America. **Crop Protection**, Guildford, v. 11, p. 517-524, 1992.

MONEY, N.P. Measurement of pore size in the hyphal cell wall of *Achlya bisexualis*. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 14, p. 234-242, 1990.

_____. Turgor pressure and mechanics of fungal penetration. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 96-103, 1995. Supplement.

MONEY, N.P.; HOWARD, R.J. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, p. 217-227, 1996.

MORAG, E.; HALEVY, I.; BAYER, E.A.; LAMED, R. Isolation and properties of a major cellobiohydrolase from cellulosome of *Clostridium thermocellum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 4155-4162, 1991.

MOSS, M.A.; TREVATHAN, L.E. Environmental conditions conductive to infection of ryegrass by *Pyricularia grisea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 6, p. 863-866, 1987.

NAMAI, T.; YAMANAKA, S. Studies on the sporulation of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Tokyo, v. 35, p. 69-79, 1985.

NETAM, R.S.; BEHADUR, A.N.; TIWARI, R.K.S.; TIWARI, U. Effect of different culture media, carbon source, nitrogen source, temperature and pH, level on the growth and sporulation of *Pyricularia grisea* isolate from finger millet. **Research Journal of Agricultural Sciences**, Timişoara, v. 4, p. 83-86, 2013.

OKADA, H.; TADA, K.; SERIYA, T.; YOKOYAMA, K.; TAKAHASHI, A.; TOHDA, H.; KUMAGAI, H.; MORIKAWA, Y. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 555-563, 1998.

OKU, H. **Plant pathogenesis and disease control**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 193 p.

OOI, T.; SHINMYO, A.; OKADA, H.; HARA, S.; IKENAKA, T.; MURAO, S.; ARAI, M. Cloning and sequence analysis of a cDNA for cellulose (FI-CMase) from *Aspergillus aculeatus*. **Current Genetics**, Washington, v. 18, p. 217-222, 1990.

PARTRIDGE-METZ, S.; CHANDRA, A. Culture media influence on vegetative growth and *in vitro* conidia production of *Magnaporthe oryzae*. **Journal of Cell and Plant Sciences**, Champaign, v. 2, n. 3, p. 9-11, 2011.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, 1995. cap. 20, p. 365-392.

_____. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, 2011. cap. 34, p. 545-591.

PASCHOLATI, S.F.; GARCIA, E.O.; DALIO, R.J.D.; OSSWALD, W. Elicitinas (*Phytophthora* sp. e *Pythium* sp.) e taxtominas (*Streptomyces* sp.): papel nas interações planta-patógeno. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAAP, 2008. cap. 7, p. 365-400.

PERES, A.P.; MACHADO, J.C.; CHITARRA, A.B.; LIMA, L.C.O. Perfil enzimático de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 295-299, 2000.

PETTIPHER, G.L.; LETAHAM, M.J. Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus albus*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 110, p. 21-27, 1979.

PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C. Ocorrência de brusone (*Pyricularia oryzae*) em lavouras comerciais de trigo (*Triticum aestivum*) no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 83-84, 1990.

POLAK, A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. **Mycoses**, Berlin, v. 33, p. 215-224, 1990.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; CASTRO, N. Pathogenic variation among isolates of *Pyricularia grisea* affecting rice, wheat and grass in Brazil. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v. 38, p. 367-371, 1992.

REESE, E.T.; SIU, R.G.H.; LEVINSON, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivates and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 59, p. 485-497, 1950.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; FORCELINI, C.A. Doenças do trigo. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, 2005. cap. 65, p. 675-685.

ROSSI, R.M.; NEVES, M.F. **Estratégias para o trigo no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2004. 228 p.

RYU, D.D.Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 2, p. 91-102, 1980.

SADANA, J.C.; PATIL, R.V. Synergism between enzymes of *Sclerotium rolfsii* involved in the solubilizaion of crystalline cellulose. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 140, p. 111-120, 1985.

SCHIAVE, L.A. **Variabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas e não melanizadas entre linhagens de *Cryptococcus neoformans* e entre linhagens de *Cryptococcus laurentii***. 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SCHIMIDHALTER, D.R.; CANEVASCINI, G. Purification and characterization of two exocellobiohydrolises from the brown rot fungus *Coniophora puteana* (Schum Ex-Fr) Karst. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 300, p. 5591-5598, 1993.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. **Caracterização enzimática de fungos ectomicorrízicos e o envolvimento de enzimas celulolíticas na simbiose *Eucalyptus urophylla – Pisolithus tinctorius***. 1997. 135 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FIORI, A.C.G.; PASCHOLATI, S.F. Atividade celulolítica *in vitro* de *Cylindrocladium clavatum* e o efeito de filtrados no cultivo do fitopatógeno sobre plântulas de eucalipto. **Acta Scientiarum**: Agronomy, Maringá, v. 25, p. 155-160, 2003.

SILVA, J.R.; FERREIRA, C.R.R.P.T.; NOGUEIRA JÚNIOR, S. Padrão sazonal de preços do trigo: São Paulo, Paraná, Estados Unidos e Argentina. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 155-160, 2003.

STERGIOPOULOS, I.; WIT, P.J.G.M. Fungal effector proteins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 233-263, 2009.

STREAMER, M.; ERIKSON, K.E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. IV. Functional characterization of five endo-β-1,4-glucanases and one exo-1,4-β-glucanase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 59, p. 607-613, 1975.

TAKAHASHI, M.; KONISHI, T.; TAKEDA, T. Biochemical characterization of *Magnaporthe oryzae* β-glucosidases for efficient β-glucan hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, p. 1073-1082, 2011.

TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, H.; NAKAMO, Y.; KONISHI, T.; TERAUCHI, R.; TAKEDA, T. Characterization of cellobiohydrolase (MoCel6A) produced by *Magnaporthe oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 19, p. 6583-6590, 2010.

TAKEDA, T.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI-MASUNO, T.; NAKANO, Y.; SAITOH, H.; HIRABUCHI, A.; FUJISAWA, S.; TERAUCHI, R. Characterization of endo-1,3-1,4-β-glucanases in GH family 12 from *Magnaporthe oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 88, p. 1113-1123, 2010.

TALBOT, N.J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 177-202, 2003.

TALBOT, N.J.; EBBOLE, D.J.; HAMER, J.E. Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1575-1590, 1993.

TSURASHIMA, T.; MINAMI, Y.; MIYAGAWA, H.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Induction of chlorosis, ROS generation and cell death by a toxin isolated from *Pyricularia oryzae.* **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, p. 2220-2225, 2010.

URASHIMA, A.S.; KATO, H. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 20, p. 107-112, 1994.

URASHIMA, A.S.; IGARASHI, S.; KATO, H. Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 7, p. 1211-1216, 1993.

URASHIMA, A.S.; LAVORENT, N.A., GOULART, A.C.P.; MEHTA, Y.R. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 511-518, 2004.

VALENT, B. Rice blast as a model system for plant pathology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 33-36, 1990.

VEANEAULT-FOURREY, C.; BAROOAH, M.; EGAN, M.; WAKLEY, G.; TALBOT, N.J. Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. **Science**, Washington, v. 312, p. 580-583, 2006.

WALTON, J.D. Deconstructing the cell wall. **Plant Physiology**, Washington, v. 104, p. 1113-1118, 1994.

_____. Host-selective toxins: agents of compatibility. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 375-391, 1996.

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

XIAO, J.Z.; OHSHIMI, A.; KAMAKURA, T.; ISHIYAMA, T.; YAMAGUSHI, I. Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 7, p. 639-944, 1994.

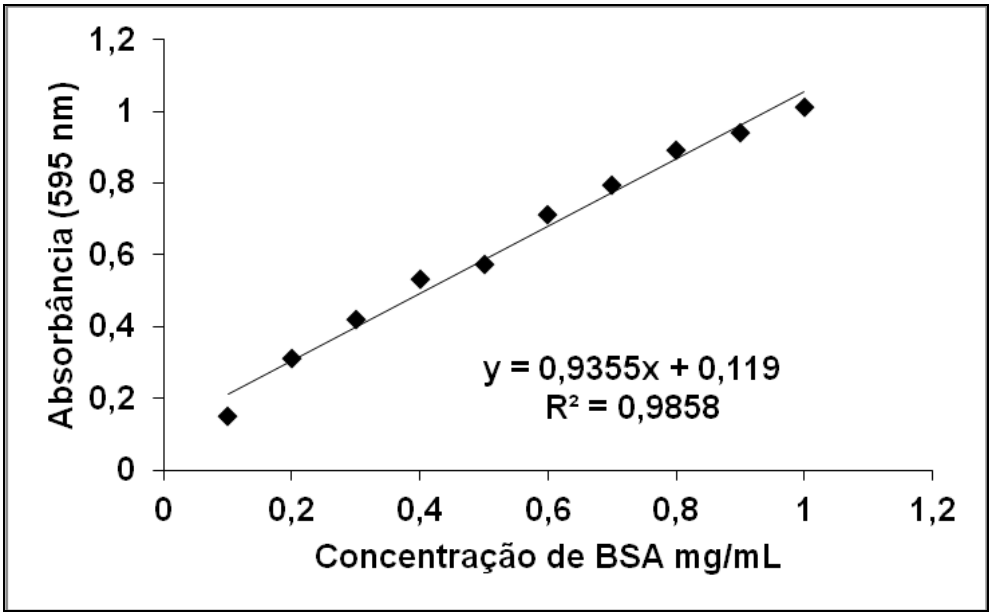
YAMADA, M. Distribution and population change in races of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, in Japan. **Review of Plant Protection Research**, Tokyo, v. 12, p. 64-79, 1976.

ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. cap. 1, p. 23-116.

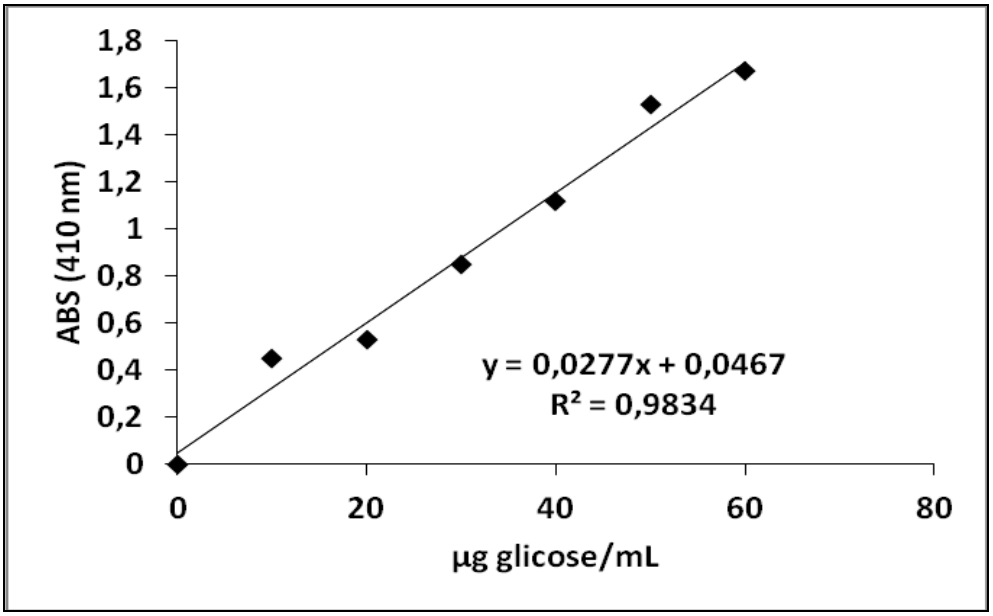
ZEE, S.Y. **Wheat and rice plants**: a scanning electron microscopy survey. Hong Kong: Cosmos Books, 1981. 58 p.

APÊNDICES

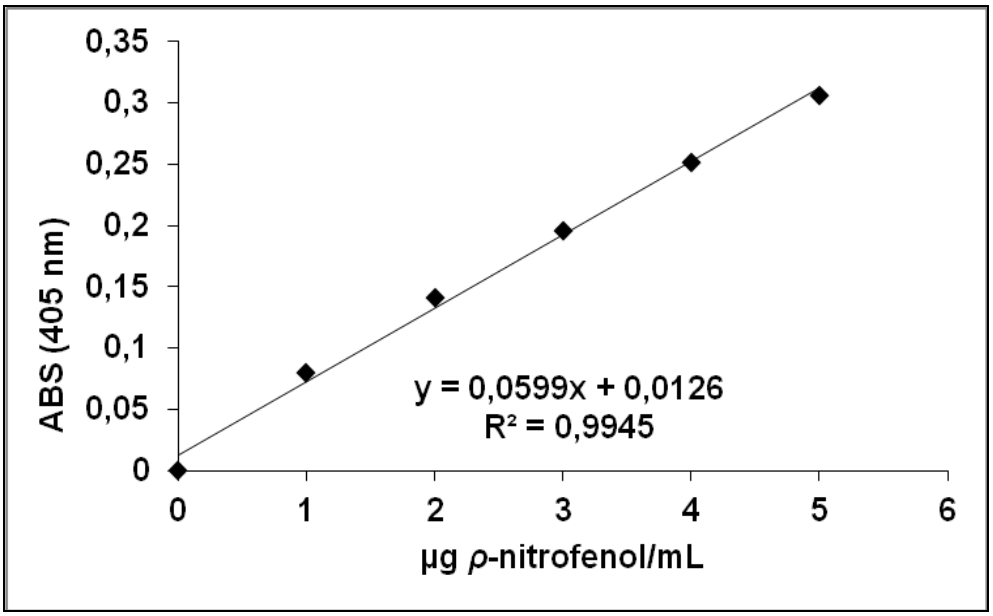
APÊNDICE A – Curva padrão para a determinação do teor de proteínas totais, segundo Bradford (1976)



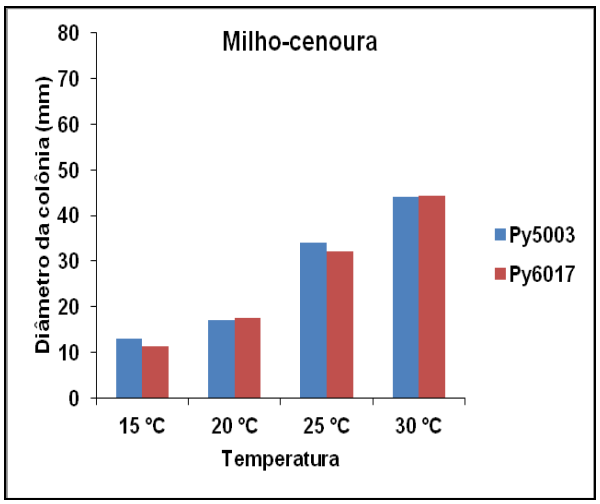
APÊNDICE B – Curva padrão para a dosagem de glicose, segundo Lever (1972)

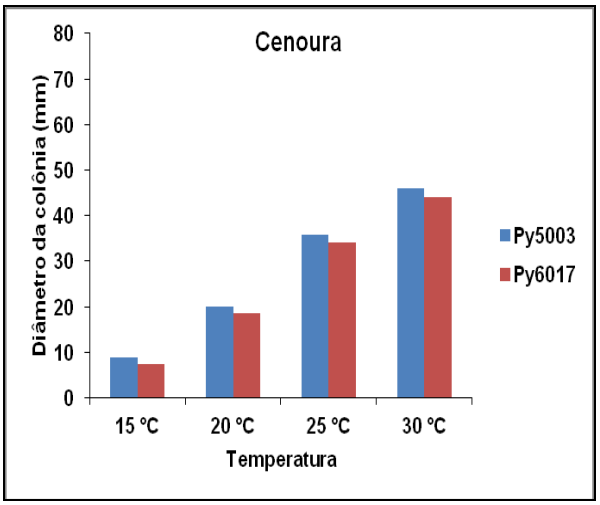


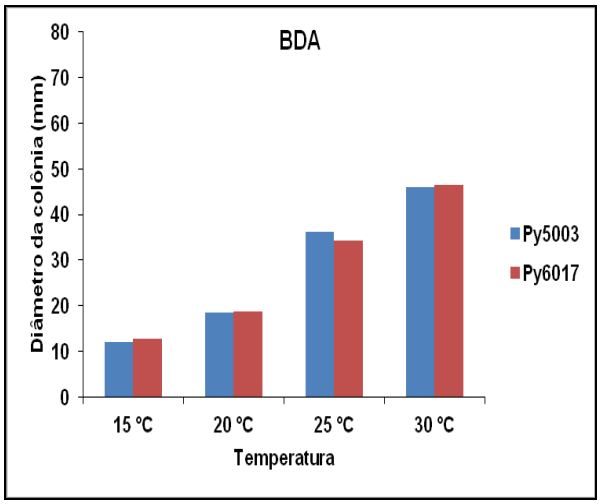
APÊNDICE C – Curva pardão para a determinação de *ρ*-nitrofenol

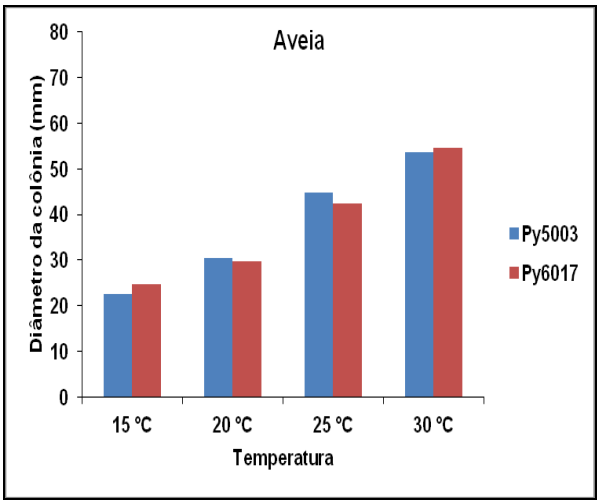


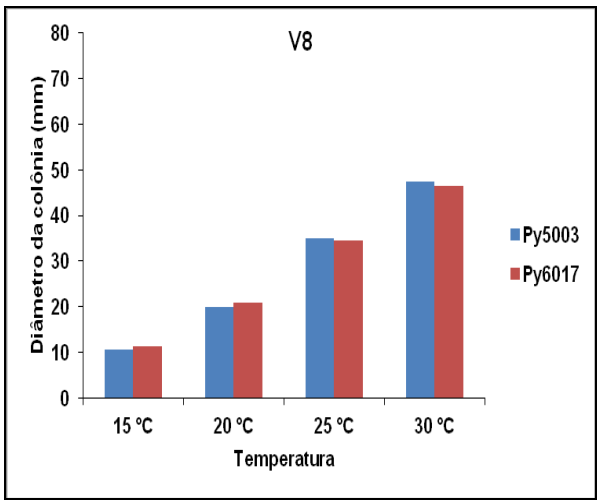
APÊNDICE D – Crescimento micelial total (mm) do fungo *M. oryzae*, mantido em escuro contínuo, 20 dias após o crescimento em diferentes meios de cultivo e faixas de temperatura



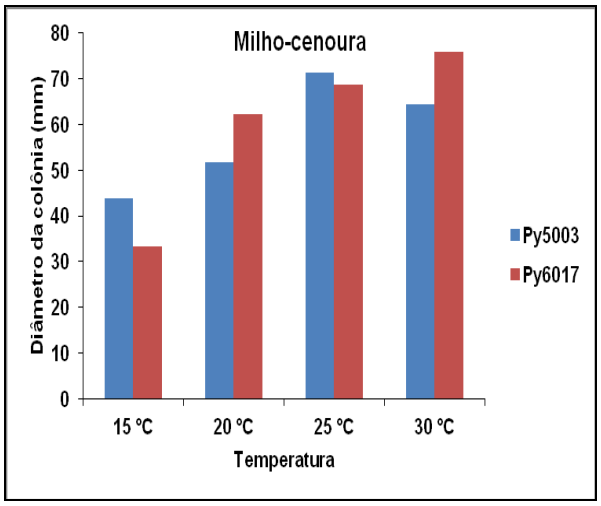


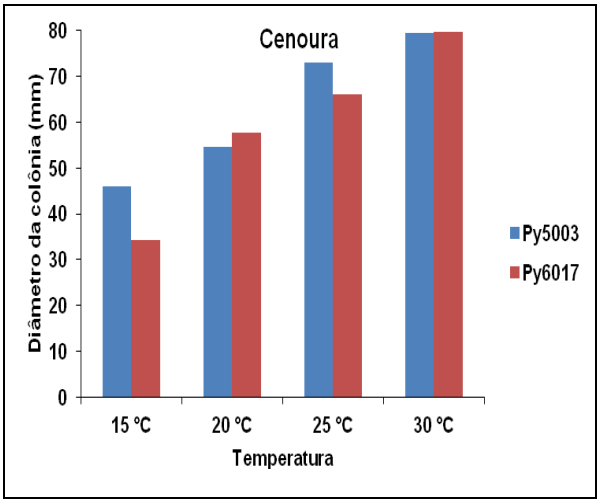


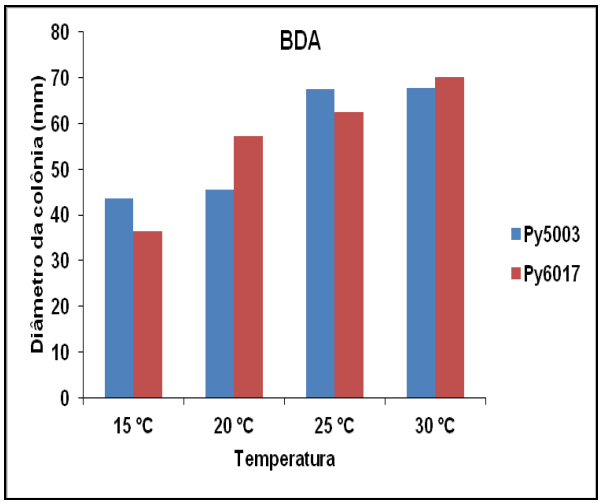


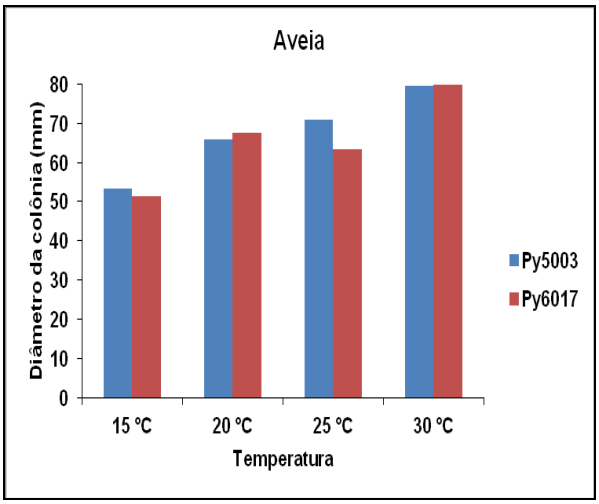


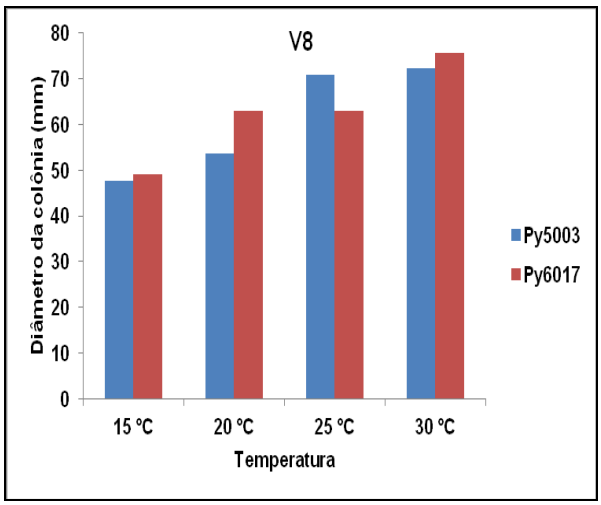
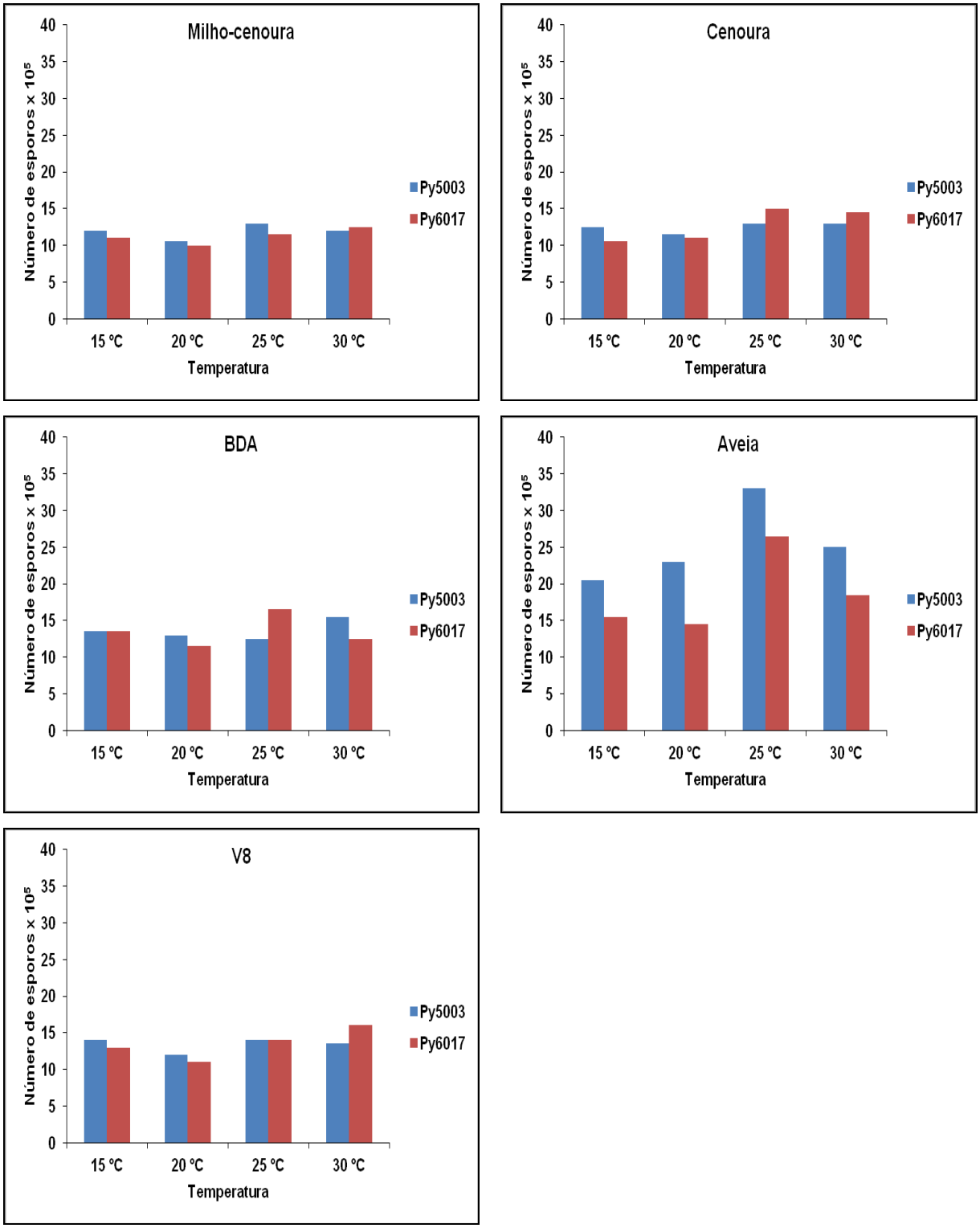
APÊNDICE E – Crescimento micelial total (mm) do fungo *M. oryzae*, mantido em fotoperíodo 12 h, 20 dias após o crescimento em diferentes meios de cultivo e faixas de temperatura











APÊNDICE F – Esporulação do fungo *M. oryzae* em diferentes meios de cultivo, faixas de temperatura e fotoperíodo 12 h, 20 dias após incubação