

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE GOIÁS Uni – ANHANGUERA
CURSO DE AGRONOMIA**

**ACTINOMICETOS NA SUPRESSÃO DA BRUSONE FOLIAR EM
ARROZ**

DANIELLE ALVES FERRERIA

GOIÂNÁ
Outubro/2018

DANIELLE ALVES FERREIRA

**ACTINOMICETOS NA SUPRESSÃO DA BRUSONE FOLIAR EM
ARROZ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Universitário de Goiás – Uni-ANHANGUERA, sob orientação da Dra Valácia Lemes da Silva Lobo e co-orientadoção do Prof. Pós Doc. Renato Carrer Filho, como requisito parcial para obtenção do título bacharelado em Agronomia.

GOIÂNIA

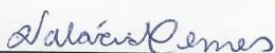
Outubro/2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIELLE ALVES FERREIRA

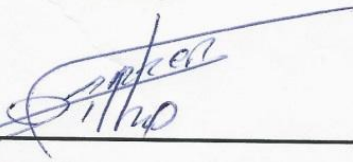
ACTINOMICETOS NA SUPRESSÃO DA BRUSONE FOLIAR EM ARROZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora como requisito parcial para obtenção do Bacharelado em Agronomia do Centro Universitário – Uni-Anhanguera, defendido e aprovado em 19 de novembro de 2018 pela banca examinadora constituída por:



Prof(a). Dr(a) Valácia Lemes da Silva Lobo

Orientadora



Prof. Pós Doc. Renato Carrer Filho

Co-orientador



Dr. Alan Carlos Alves de Souza

Membro

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades, conquistas e proteção.

Aos meus pais, minha irmã, meus avós, e meu padrinho pelo amor, incentivo e companheirismos.

À minha segunda mãe Dr^a Valácia Lemes Silva Lobo, pela orientação, confiança, paciência, amizade, incentivo e pela oportunidade de aprendizagem.

Ao Dr Alan Carlos Alves de Sousa, pela paciência, orientações, disposição em me ajudar, e pelo seu companheirismo.

Ao Prof Dr Renato Carrer Filho por me co-orientar e ajudar e sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Ao gestor do laboratório de Microbiologia Marcio Vinícius de Carvalho Barros, pelo apoio, sugestões e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À FUNARBE pela concessão de bolsa para realizar meu trabalho.

À Embrapa Arroz e Feijão pela oportunidade de execução do meu trabalho.

Aos funcionários da Embrapa Arroz e Feijão Livia, Mônica, Ronair, Elden, Pedro, Divino por todo apoio, paciência e por estarem sempre prontos para me ajuda.

Aos colegas de laboratório, Gabriel, Alan, Adriana, Cristiane Thânia, Amanda, Marina, Thatyane, Priscila, Bruna, Maythsulene, Leilane por toda ajuda.

As professoras de TCC Leandra Semensato e Fernanda Freitas pelas orientações e auxílios.

Ao meu namorado pela paciência, compreensão e incentivos

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste curso.

MUITO OBRIGADA!

Plante seu jardim e decore sua alma, em vez de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

William Shakespeare

Resumo

A brusone (*Magnaporthe oryzae*) é considerada a principal doença da cultura do arroz. Para o seu controle é utilizado o manejo integrado, porém ultimamente tem se recorrido ao uso excessivo de agrotóxicos. Isso tem resultado em alguns entraves para a produção sustentável. Os actinomicetos são agentes biológicos que produzem, aproximadamente, 70% dos compostos bioativos, podendo ser úteis no manejo de doenças. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de actinomicetos na supressão da brusone em folhas de arroz e quantificar as enzimas relacionadas a patogênese. Isolados de actinomicetos (AC04, AC18.4, AC22 e AC24) pertencentes a coleção de microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão que apresentaram antagonismo *in vitro* contra *M. oryzae* e outros patógenos, foram utilizados para a microbiolização, por 24 horas, de sementes da cv. BRS Primavera. As sementes foram semeadas em bandejas, em casa de vegetação. Aos 19 dias após o plantio foi pulverizada uma suspensão dos actinomicetos e dois dias depois a suspensão com o isolado BRM 31295 de *M. oryzae* (3×10^5 conídios.mL⁻¹). O tratamento controle foi pulverizado com *M. oryzae* e a testemunha absoluta com água. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, para a avaliação da severidade da doença foram 5 tratamentos com 3 repetições e para atividade enzimática foram 10 tratamentos com 3 repetições. Avaliou-se a severidade da brusone sete dias após a inoculação, utilizando uma escala de notas em porcentagem e a atividade enzimática, coletando-se a 0 horas antes da inoculação e as demais 24h, 48h, 72h e 96h após a inoculação com *M. oryzae*. Os actinomicetos reduziram a severidade da brusone e a maior expressão das enzimas, CHI, GLU, POX, PAL e LOX foi observada 72 horas após o desafio com o patógeno. Actinomicetos são eficientes na supressão da brusone e no aumento de atividade enzimática indicando indução de resistência na interação *M. oryzae* x arroz x actinomicetos.

PALAVRAS-CHAVES. *Magnaporthe oryzae*. Controle Biológico. Indução de Resistência

LISTA E TABELA

- Figura 1. Sintomas das principais doenças da cultura do arroz. Queima da Bainha, *Rhizoctonia solani* (A); Brusone, *Magnaporthe oryzae* (B); Mancha Parda, *Bipolaris oryzae* (C); Escaldadura, *Monognaphella albescens* (D). 15
- Figura 2. Sintomas de brusone nas folhas do arroz. 17
- Figura 3. Supressão de brusone foliar em plantas tratadas com isolados de actinomicetos. Médias das colunas que possuem a mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 26

LISTA DE TABELAS

- Tabela1. Atividade enzimática de QUI (U.mg⁻¹) em diferentes coletas para cada tratamento. Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal). 28
- Tabela2. Atividade enzimática GLU (U.mg⁻¹) em diferentes coletas para cada tratamento. Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal). 29
- Tabela3. Atividade enzimática POX (U.mg⁻¹) em diferentes coletas para cada tratamento. Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal). 30
- Tabela4. Atividade enzimática PAL (U.mg⁻¹) em diferentes coletas para cada tratamento. Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal). 31
- Tabela5. Atividade enzimática LOX (U.mg⁻¹) em diferentes coletas para cada tratamento. Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal). 32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Cultura do Arroz	14
2.2 Brusone	16
2.3 Controle Biológico	18
2.4 Actinomicetos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Localização da área experimental e descrição do experimento	21
3.2 Preparo da suspensão de actinomiceto	21
3.3 Preparo e Inoculação com <i>Magnaporthe oryzae</i>	22
3.4 Atividade Enzimática	22
3.4.1 Coleta das Amostras	22
3.4.2 Extração de proteínas totais	22
3.4.3 Dosagem de proteínas	22
3.4.4 Quitinase	22
3.4.5 β -1,3 glucanase	23
3.4.6 Peroxidase	23
3.4.7 Fenilamonoliase	23
3.4.8 Lipoxigenase	23
3.5 Análise dos Dados	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Severidade da doença	26

4.2 Atividade Enzimática	27
5 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIA	35

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos principais cereais mais consumido no mundo, é um alimento básico constituído principalmente por carboidratos e sua produção cresce constantemente devido ao aumento do consumo humano. O Brasil destaca-se por ser o nono maior produtor mundial dessa cultura, sendo o estado de Rio Grande do Sul o maior produtor nacional de arroz irrigado com uma produção de 7.858,9 toneladas na safra 2017/2018 e o estado de Mato Grosso destaca pela alta produção de arroz sequeiro com produção de 451,6 toneladas na safra 2017/2018 (CONAB, 2018).

O aumento do cultivo de arroz, tem recorrido ao uso excessivo de insumos agrícolas, como agrotóxicos e fertilizantes, bem como na intensificação das práticas culturais em todos os sistemas de produção. Isto tem resultado em alguns entraves para a produção sustentável, destacando-se os estresses bióticos, como o aumento da incidência das doenças fúngicas de importância primária, desatacando se a brusone (*Magnaporthe oryzae*), mancha parda (*Bipolaris oryzae*), escaladura (*Monographella albescens*) e queima das bainhas (*Rhizoctonia solani*).

A brusone do arroz causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* é considerada a principal doença da cultura por ser policíclico, a qual pode ocorrer tanto na fase vegetativa quanto na reprodutiva. A ocorrência da brusone está relacionada às condições edafoclimáticas da região, época de semeadura, ao sistema de cultivo, ao manejo da cultura e à resistência das cultivares (EMBRAPA, 2015). Vários estudos foram realizados visando o controle da doença e grandes avanços foram obtidos, reduzindo prejuízos por meio do manejo integrado (EMBRAPA, 2015). Segundo Silva – Lobo (2004) o manejo integrado da brusone tem por objetivo o aumento da quantidade e da qualidade do produto por meio da redução da população do patógeno a níveis toleráveis, mediante um conjunto de medidas preventivas como a resistência genética das cultivares, as práticas culturais, o controle químico e o controle biológico.

O controle biológico é uma alternativa sustentável e de baixo custo que possibilita a redução da severidade da brusone, contribuindo para garantir a segurança alimentar e ambiental. Diversas pesquisas voltadas ao controle biológico em doenças na cultura do arroz, com microrganismos do gênero *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Sarocladium*, rizobactérias e actinomicetos, vem sendo desenvolvidas. Estes microrganismos vivem nos solos ou na parte aérea de plantas, podendo habitar as raízes e/ou no filopiano do arroz, atuando como antagonistas a patógenos sem causar danos ao vegetal (EMBRAPA, 2016). Segundo Bressan, Figueiredo (2003) os isolados de actinomicetos possuem potencial biológico para o controle de

Colletotrichum graminicola. Estudo feito em condição de casa de vegetação com *Sarocladium oryzae*, mostrou que o fungo foi capaz de reduzir a severidade da brusone foliar (GUIMARÃES, 2014).

Dentre a vasta gama de possíveis microrganismo candidatos a agentes de biocontrole, os actinomicetos tem sido investigados como agente biológico para controle alternativo de patógenos de várias culturas de importância econômica por produzirem aproximadamente 70% dos compostos bioativos, incluindo os antibióticos, além de outros metabólitos secundários. A produção dessas substâncias torna os actinomicetos fortes candidatos a agentes no biocontrole de fitopatógenos em plantas (SILVA, 2016). Segundo Miyauchi (2012) os isolados de actinomicetos provenientes de rizosfera de araucária apresentaram potencial no controle biológico de doenças causadas por fungos fitopatogênicos.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de actinomicetos na supressão da brusone em folhas de arroz em condições de casa de vegetação e a quantificação das enzimas relacionadas à patogênese no patossistema *Magnaporthe oryzae* – arroz.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do Arroz

O arroz ocupa atualmente, a terceira posição dentre os cereais mais consumidos do mundo, estando atrás apenas das culturas do milho e do trigo. Trata-se de uma planta herbácea, de cultivo anual, pertencente ao Família *Poaceae* (Graminea) e Gênero *Oryza*. É considerado um alimento básico e essencial para mais da metade da população mundial (JULIANO, 1993) por ser fonte de carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais (CONAB, 2015). Portanto, é uma fonte nutricional essencial à alimentação humana.

Aproximadamente, 90% de todo arroz do mundo é produzido e consumido na Ásia. Neste continente, o cereal é cultivado em mais de 250 milhões de pequenas propriedades, onde grande parte da população se alimenta do mesmo, em torno de duas a três vezes ao dia (EMBRAPA, 2006a). Segundo a FAO, em 2016, China, Índia e Indonésia destacaram-se como os maiores produtores do cereal em escala mundial, com uma produção alcançada em 209, 158 e 77 milhões de toneladas de arroz respectivamente. Ainda neste mesmo ano, o Brasil manteve o nono lugar do ranking com uma produção superior a dez milhões de toneladas.

Nacionalmente, o arroz juntamente com o feijão desempenham um importante papel na composição da dieta básica brasileira, sendo um dos principais componentes que constituem a chamada “cesta básica”, como uma forma de auxílio, para a classe mais carente. Porém, tal alimento não é restrito somente as classes mais baixas da sociedade, de modo geral, o arroz é consumido por todas as classes sociais e faixas etárias de forma ampla, bem característico a cultura e à tradição brasileira (EMBRAPA, 2015). No que se refere à produção de arroz no Brasil, pode se observar que os Estados que se destacaram no ano de 2017 foram Rio Grande do Sul apresentando uma produção de 7858,9 mil toneladas, Santa Catarina (1113,0 t), Tocantins (688,4 t), Mato Grosso (472,8 t) e Maranhão (295,1t) (CONAB, 2018).

A produção brasileira de arroz é caracterizada por dois sistemas de cultivo, sendo eles: o sistema em várzea ou cultivo irrigado por inundação controlada que, por sua vez, é responsável pela maior parte da produção brasileira, e o sistema de plantio em terras altas ou sequeiro, onde o arroz é cultivado por irrigação suplementar ou sem irrigação (EMBRAPA, 2006b).

A produtividade em ambos os sistemas pode ser afetada devido a fatores bióticos e/ou abióticos. Como um dos exemplos de fator biótico, tem-se as doenças, que ocorrem em todas as fases do desenvolvimento da planta reduzindo a qualidade e a produção dos grãos.

Dentre estas doenças, pode-se destacar as de maiores incidência e danos à cultura como: Mancha Parda, Escaldadura, Queima da Bainha e a Brusone.

A mancha parda, causada pelo patógeno *Bipolaris oryzae*. Essa doença é a principal causa das manchas dos grãos, afetando a emergência das plântulas, além de afetar folhas e bainhas, o fungo causa lesões circulares ou ovais de coloração marrom, com centro acinzentado. A escaldadura, causada pelo fungo *Monographella albescens*, vem se manifestando em todas as regiões brasileiras, os sintomas iniciam-se pelas extremidades apicais, as manchas não apresentam margem bem definidas e são inicialmente de coloração verde-oliva. Mais tarde, as áreas afetadas apresentam sucessão de faixas concêntricas. As lesões coalescem, causando secamento e morte das folhas afetadas. A queima das bainhas causada por *Rhizoctonia solani*, geralmente ocorre nas bainhas e nos colmos, é caracterizada por manchas ovaladas, elípticas ou arredondadas de coloração branco acinzentada e bordas marrons bem definidas. A brusone, que tem como agente causal o fungo *Magnaporthe oryzae* é a principal doença do arroz, provocando perdas significativas na produtividade das cultivares suscetíveis (EMBRAPA, 2006c). Principais doenças na cultura do arroz (Figura 1).



Figura 1: Sintomas das principais doenças da cultura do arroz. Mancha Parda (*Bipolaris oryzae*) (A); Escaldadura, *Monographella albescens* (B);
 Fonte: ARAÚJO.
 Queima das bainhas (*Rhizoctonia solani* (C); Busone (*Magnaporthe oryzae*) (D).
 Fonte: SILVA-LOBO

2.2 Brusone

A brusone ocorre desde o estágio de plântula até a fase de maturação. O ciclo dessa doença inicia-se com a disseminação do inóculo, pelo vento, água ou sementes infectadas. Os conídios aderem-se na superfície da folha, germinam, formam o apressório, estrutura especializada que perfura a superfície foliar, permitindo a colonização que resulta no sintoma típico da doença (FILLIPI; SILVA-LOBO; PRABHU). Nas folhas, os sintomas iniciam-se com a formação de pequenas lesões necróticas, de coloração marrom, que ao evoluírem aumentam de tamanho, apresentam formatos irregulares e com coloração marrom nas margens e o centro das lesões ficam esbranquiçados. Em condições favoráveis as lesões coalescem, causando morte das folhas ou da planta inteira, como mostra a figura 2 (EMBRAPA, 2006).



Figura 2: Sintomas de brusone em folhas do arroz.

Fontes: SEBASTIÃO ARAUJO

Para a doença se desenvolver são necessárias altas temperaturas de 25 a 28 °C, e umidade acima de 90%. As principais fontes de inóculo primário são sementes infectadas, restos culturais e inóculo trazido pelo vento. Já a infecção secundária tem como fonte as lesões esporulativas das folhas infectadas. É importante ressaltar que todas as fases do ciclo da doença são altamente influenciadas pelos fatores climáticos, como por exemplo, a deposição de orvalho ou gotas de chuva nas folhas que, por sua vez, é essencial para a germinação dos conídios e para o início da infecção (SILVA-LOBO et al., 2007).

Os principais danos causados pela brusone são a diminuição da área fotossintética e da falta de uniformidade na emissão de panícula, o aumento do número de espiguetas chochas, baixo rendimento e até mesmo a perda da lavoura. Desse modo, é fundamental reduzir os danos causados pela doença por meio do uso de cultivares resistentes, de práticas culturais e pelo uso de fungicidas, utilizados sempre de forma integrada como um bom preparo do solo, adubação equilibrada, evitar crescimento vegetativo exagerado da cultura, uso de sementes de boa qualidade, controle de plantas daninhas, destruição de plantas voluntárias e doentes e troca de cultivares semeadas a cada três ou quatro anos (SILVA-LOBO et al., 2007) para obter desempenhos satisfatórios na produção da cultura do arroz.

No Brasil, a aplicação de fungicidas é intensiva, visando reduzir as perdas de rendimento. A utilização de indutores de resistência bióticos está sendo investigada como mais

uma estratégia para aumentar a durabilidade da resistência a doenças e reduzir os resíduos tóxicos resultantes do uso indiscriminado de produtos químicos (FILIPPI et al., 2011). Segundo Souza (2014), o manejo sustentável é importante para o controle da brusone, por possibilitar a diminuição da utilização de agrotóxicos.

2.3 Controle Biológico

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças de plantas na agricultura tem provocado diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água, dos animais, intoxicação de agricultores e resistência de patógenos. Consequentemente, ocasiona desequilíbrio biológico do sistema, alterando a ciclagem de nutrientes da matéria orgânica, eliminação de organismos benéficos e redução da biodiversidade (EMBRAPA, 2009). Deste modo é necessário a adoção de práticas sustentáveis na agricultura para melhorar a segurança ambiental e alimentar. A utilização de métodos alternativos para o controle de doenças de plantas é algo fundamental, já que os produtos químicos podem ocasionar o desequilíbrio da fauna e flora, por muitas vezes estarem sendo aplicado de forma incorreta. Estima-se que cerca de 90% dos agrotóxicos aplicados não atingem o alvo, sendo dissipados para o ambiente e tendo como ponto final reservatórios de água e, principalmente, o solo (MICHEREFF, 2001).

A busca pelo equilíbrio biológico e a recuperação em áreas degradadas pelo manejo incorreto das culturas é indispensável para a melhor sustentação do sistema agrícola. Assim, os agentes de controle microbiano de doenças têm um papel importante no meio ambiente (BETTIOL, 2009a). Segundo a Embrapa, trata-se de um método de controle racional e sadio, que tem como objetivo final utilizar esses inimigos naturais que não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população. Diante desse contexto, o controle biológico é uma alternativa para minimizar o uso dos produtos químicos na agricultura podendo ser definido como o uso de microrganismos benéficos para controlar patógenos. Segundo Cook & Baker (1983) o controle biológico de doenças de plantas é a redução da soma do inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não seja o homem.

No Brasil, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para que os produtos biológicos estejam cada vez mais disponíveis para o produtor. Com isso, alguns microrganismos veem sendo estudados mais fortemente para o controle de doenças de plantas, tais como as bactérias e os fungos, destacando-se principalmente as espécies: *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Trichoderma spp*. e *Cladosporium cladosporioides*. Alguns microrganismos

estão citados na literatura com agentes que controla a brusone foliar em arroz, segundo Chaibub, (2014) *C. cladosporioides* é um agente biológico capaz de suprimir a brusone foliar enquanto Filippi. et al, (2011) afirma que as rizobactérias também reduzem a severidade da brusone foliar em arroz. Deste modo o controle biológico é uma alternativa para minimizar uso excessivo dos fungicidas que causam a resistência de patógenos e consequentemente prejuízos ao produtor. Assim, há um vasto estudo desses microrganismos para serem conciliados com o uso de agrotóxicos visando uma agricultura mais sustentável.

2.4 Actinomicetos

Os actinomicetos são caracterizados pela existência de diversidade morfológica e de produção de metabólitos, como os antibióticos, produzidos como metabólito secundário. Os actinomicetos também são notórios na produção de pigmentos, enzimas e compostos terpenóides que dão o odor característicos do solo (OLIVEIRA, 2003). Eles destacam-se das outras bactérias, por crescerem lentamente em meio de cultura, e por serem os principais produtores de compostos bioativos de alto valor comercial e medicinal, bem como por seu importante papel na ciclagem de nutrientes do solo (ARAÚJO, 1998 apud OLIVEIRA, 2004).

Esses microrganismos são importantes constituintes da microfauna da rizosfera, seja pela capacidade de síntese de antibióticos, permitindo o uso de sua capacidade antagonista no biocontrole de fitopatógenos e/ou pela influência que promove no estabelecimento de microrganismos benéficos, como diazotróficos e as micorrizas e ainda pela formação de actinorrizas, onde são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (PEREIRA, 2000) podendo ativar o mecanismo de resistência da planta a doenças. Segundo Oliveira, (2017) os actinomicetos produzem o antibiótico neomicina em meio líquido que deve estar associado ao mecanismo de inibição do crescimento *in vitro* de *Pantoea ananatis*, agente causador da mancha branca do milho. Esse alto potencial na produção de moléculas de interesse biotecnológico reflete na escolha desse microrganismo para o controle de fitopatógenos. No caso de fungos aflatoxigênicos o uso de actinomicetos é amplamente estudado tanto para produção de enzimas líticas como metabólitos secundários que apresentam algum grau de controle (BETTIOL, 2009b).

Esse grupo de bactéria tem potencial para controle biológico e até mesmo farmacológico, (TEIXEIRA, 2013). Logo é estudado em diferentes áreas. Na agricultura os actinomicetos são promissores como agentes no biocontrole de doenças de plantas e têm sido investigados no Brasil como agentes biológicos para controle de patógenos de várias culturas de importância econômica, incluindo plantas da família *Poaceae* (EMBRAPA, 2013), sendo

considerado mais uma alternativa de controle de doenças para agricultura sustentável. Deste modo, pesquisas relacionadas a esse microrganismo estão sendo desenvolvidas nos últimos anos. Carrer Filho, (2002) observou que os isolados de actinomicetos apresentam potencial como agentes de biocontrole dos patógenos foliares na cultura do tomate. Também foi observado que os actinomicetos reduzem significativamente o número de galhas de *Meloidogyne javanica* no sistema radicular do tomateiro (COIMBRA; CAMPOS, 2010)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização da área experimental e descrição do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Embrapa Arroz e Feijão, localizada no município de Santo Antônio de Goiás-GO (16°29'S, 49°17'W e 795 m de altitude). Sementes de arroz da cultivar BRS Primavera, foram desinfestadas em álcool 70% e hipoclorito de sódio 0,5% e semeadas em bandejas plásticas (15 x 30 x 10 cm) contendo 3kg de solo não autoclavado. Antes do semeio em bandejas, foi feito adubação de plantio com 5 g de NPK (5-30-15) mais micronutrientes (3g de sulfato de zinco por bandeja (ZnSO₄) e 3g de sulfato de ferro (FeSO₄)). As sementes foram distribuídas em oito sulcos, aproximadamente 15 sementes por sulco. Após o plantio as bandejas foram regadas com água e mantidas em casa de vegetação. Foram realizadas duas adubações de cobertura, com sulfato de amônia (1g sulfato de amônio/bandeja), aos 14 e aos 19 dias após a semeadura.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, sendo que, para a avaliação da severidade da brusone foram utilizados cinco tratamentos com três repetições e para a quantificação da atividade enzimáticas foram utilizados dez tratamentos com três repetições. O tratamento controle foi pulverizado com *M. oryzae* e a testemunha absoluta com água. Os tratamentos consistiram na microbiolização de sementes e na pulverização da parte aérea das plantas de arroz com os isolados de actinomicetos AC04, AC18.4, AC22 e AC24 pertencentes a Coleção de Fungo e Microrganismo Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão (CFMMCNPAF), que apresentaram antagonismo *in vitro* contra *Magnaporthe oryzae* e/ou a outros patógenos do arroz em estudos anteriores.

Aos dezenove dias após a semeadura foi realizada a pulverização dos isolados de actinomicetos, com uma bomba de pressão e uma pistola de aspersão, com pressão de 0,001 kg/cm², com um volume de 40 mL.bandeja⁻¹ e quarenta oito horas depois foi realizada a inoculação com o fungo *Magnaporthe oryzae*, na concentração de 3 x10⁵ conídios.mL⁻¹.

3.2 Preparo da suspensão de actinomiceto

Os isolados de actinomicetos foram submetidos a dois tipos de aplicações, sendo a primeira por microbiolização das sementes e a segunda via pulverização foliar 48 horas antes da aplicação do patógeno *M. oryzae*. Para a microbiolização das sementes, quatro isolados de actinomicetos foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar) por sete dias. Após esse período, algumas colônias foram transferidas com o auxílio de uma alça microbiana para Erlemeyers de 200 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo (caldo nutriente- meio

líquido), os quais foram mantidos sob agitação constante a 140 rpm a 28°C por sete dias. Após esse período, as sementes de arroz foram microbiolizadas e mantidas na suspensão de actinomicetos por 24 horas sob agitação de 140 rpm, a 28°C graus. Para o tratamento controle, as sementes foram mantidas em água autoclavada. Depois deste período as sementes foram colocadas para secar em temperatura ambiente, para realização do plantio.

Dezenove dias após a semeadura foi feita a pulverização foliar 40 mL.gaiola⁻¹ com a suspensão de actinomicetos. O preparo da suspensão foi o mesmo utilizado para a microbiolização das sementes.

3.3 Preparo da suspensão e inoculação de *Magnaporthe oryzae*

A inoculação das plantas de arroz foi realizada utilizando o isolado de *M. oryzae*, BRM 31295 armazenado na CFMMCNPAP. O fungo foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultura aveia e, posteriormente, incubado em câmara de crescimento em temperatura de 25°C e umidade do ar de 80% por sete dias. Em seguida, ocorreu a remoção do micélio com o auxílio de um bastão de vidro esterilizado, com o objetivo de induzir a produção de conídios. Para o preparo do inóculo, as placas foram lavadas com o auxílio de um pincel e água destilada autoclavada e a suspensão filtrada em tecido de malha fina. Logo após foi realizada a contagem dos conídios e a concentração final ajustada para 3×10^5 conídios.mL⁻¹.

Vinte e um dias após a semeadura, 48 horas após o desafio com os actinomicetos, as plantas foram inoculadas com a suspensão de *M. oryzae* e o tratamento controle com água destilada autoclavada. O ambiente foi mantido em temperatura entre de 27°C à 28 °C e umidade em torno de 90%. Logo após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, por 24 horas e temperatura em 25°C, a partir do segundo dia a temperatura foi mantida em aproximadamente 30°C durante o dia e a noite mantidas em câmara úmida. A avaliação da severidade da brusone foi realizada no sétimo dia após a inoculação, com o auxílio de uma escala de notas (NOTTEGHEM, 1981).

3.4 Atividade Enzimática

3.4.1 Coleta das Amostras

Foram coletadas amostras de cada tratamento (cinco a dez folhas) durante cinco dias, sendo que a primeira coleta foi feita antes da inoculação de *M. oryzae* e as demais foram coletadas após 24h, 48h, 72h e 96 h após a inoculação com *M. oryzae*, incluindo o tratamento

controle. As amostras coletadas foram imediatamente conservadas em gelo e posteriormente armazenadas em freezer para realização da quantificação da atividade enzimática.

3.4.2 Extração de proteínas totais

As folhas, armazenadas em freezer, foram maceradas com nitrogênio líquido com o auxílio de pistilo até formar um pó fino. O pó foi transferido para um microtubo (2,0mL) e foi adicionado à solução de tampão de extração de proteínas (Tris-HCL 10mM; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM, pH 7,0). Em seguida a suspensão foi agitada por cinco minutos e centrifugada sob refrigeração (4°C - 8°C) por trinta minutos a 13000 x g. O sobrenadante (proteína) foi transferido para microtubos limpos para dosagem de proteínas e ensaios enzimáticos.

3.4.3 Dosagem de proteínas

Para realização da dosagem de proteínas totais foram adicionadas 50µL de cada amostra e colocadas em microtubos e adicionadas 1 mL do reagente de Bradford (solubilizou-se 100mg de Coomassie Brilliant Blue G- 250 solubilizado em 50 mL de etanol 95% e em seguida, adicionado 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução foi filtrada em papel filtro quantitativo Whatman nº1 e avolumada a para 1 L de água deionizada). A solução foi homogeneizada e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi transferido 100µL de cada amostra para placa de Elisa e realizando a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm com o auxílio do software Gen5 Data Analyses (Biotek) (BRADFORD, 1976).

3.4.4 Quitinase - QUI

Para a quantificação de quitinase foram adicionados 100µL de extrato bruto em microtubos, 300µL de uma solução quitina 0,1% de tampão acetato de sódio 1,0 M e pH 4,5(0,1 g de quitina para 100 mL de tampão de acetato). Em seguida a solução foi incubada em temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, a reação foi paralisada com 1 mL da solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) 1% e levada ao banho maria por 5 minutos em uma temperatura de 100°C para quantificar as enzimas. Após o resfriamento 100µL foi transferido para placas de Elisa e foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de ondas 540 nm utilizando o software Gen5 Data Analysees (Biotek) (BABU et al., 2003).

3.4.5 β-1,3 glucanase - GLU

Foram adicionados 100µL de extrato em microtubos e solubilizadas em 300µL de uma solução de laminarina 0,1% em tampão acetato 100Mm, pH4,5 (0,1g de laminaria para 100 ml de tampão acetato). Logo após homogeneizar e incubar a solução em temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente a reação foi paralisada com 1mL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) 1% e levada ao banho maria por 5 minutos à 100°C para quantificar as enzimas. Após o resfriamento, transferiu-se 100µL para placas de Elisa foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda e 540nm utilizando o software Gen5 Data Analyses (Biotek) (PAN et al., 1991).

3.4.6 Peroxidase – POX

Foram adicionados diretamente na cubeta de leitura: 1,0ml de tampão acetato de potássio 0,1 M pH 5,0 com ABTS – 8mg para cada 100mL de tampão (ácido 2,2' – azino- bis 3- thybenzthiazoline-6-sulphonic) + 50µL do extrato bruto na cubeta e homogeneizado suavemente por 3 vezes com o auxílio de um parafilme. A cubeta foi posicionada dentro do espectrofotômetro e adicionado 200µL de peróxido de hidrogênio H₂O₂. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro Spectrum SP- 2000 no comprimento de onda de 405 nm por meio de um software Win Spec 2.3 (CORTES et al. 2008).

3.4.7 Fenilamonoliase – PAL

Para a realização desse ensaio foram adicionados 50µL de extrato bruto em microtubos de 2,0 mL. Logo após adicionar 1,5 mL de tampão borato de sódio 0,1 M pH: 8,0 acrescidos de 10mM de L- fenilalanina, incubando em temperatura ambiente por 24 horas. E realizada a leitura em espectrofotômetro Spectrum SP – 2000, no comprimento de onda de 290 nm (HOYODO; KURODA; YANG, 1978)

3.4.8 Lipoxigenase – LOX

Para análise da atividade lipoxigenase foram adicionados 50µL de extrato bruto em microtubos de 2,0mL, em seguida 1,2µL de uma solução contendo tampão fosfato de potássio 50mM pH: 6,0 e ácido linoleico. Posteriormente, foi incubado em temperatura ambiente por 24 horas e após esse período foi realizado a leitura em espectrofotômetro Spectrum SP – 2000, no comprimento de ondas de 234 nm (SCHEWE et al., 1981).

3.5 Análise dos Dados

As análises estatísticas dos dados da severidade da doença foram realizadas com o auxílio do programa SASM-Agri. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Em relação a quantificação das enzimas foram realizadas com auxílio do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 19.0. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Severidade da Brusone nas folhas

Observou-se diferença entre os tratamentos e efeito positivo dos actinomicetos na supressão da brusone foliar, em condições de casa de vegetação. Os tratamentos AC04, AC18.4, AC22 e AC24, proporcionaram a supressão da brusone foliar na ordem de 67,64%, 62,67%, 49,86% e 69,04%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 3).

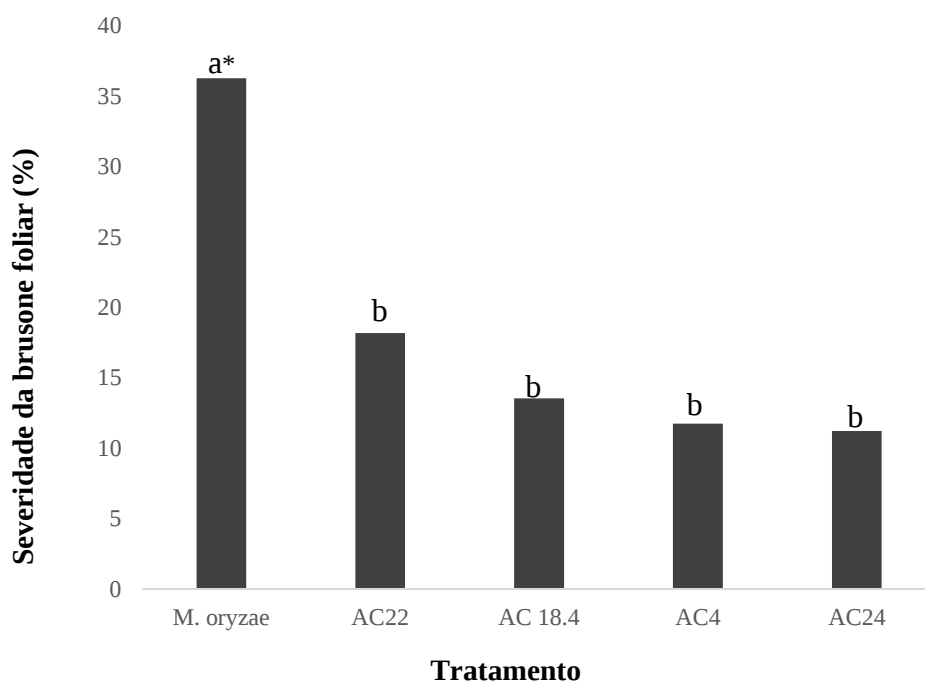


Figura 3. Supressão de brusone foliar em plantas de arroz tratadas com isolados de actinomicetos (AC04, AC18.4, AC22, AC24).

*Média das colunas que possuem a mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como neste estudo, onde se verificou o efeito de isolados de actinomicetos na supressão da brusone foliar em arroz, outras pesquisas também mostraram o potencial deste microrganismo no controle ou redução de outras doenças em outros patossistemas, como por exemplo, Moura; Romeiro; Neves (1998) que afirmaram que os isolados de actinomicetos possuem alto potencial para o controle de *R. solanacearum* em tomateiro, principalmente quando veiculados às sementes. Carrer Filho; Romeiro; Garcia, (2008) também observaram que actinomicetos reduziram a severidade de lesões em folhas de tomateiro, cultivada tanto de patógenos fúngicos (*C. cassicola*, *A. solani*, *S. solani*) como bacterianos (*P. syringae* pv. *tomato* e *X. campestris* pv. *vesicatoria*) em relação à testemunha, em condições de casa de vegetação. A severidade do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *plaseoli* var. *fuscans* foi reduzida significativamente quando as

plantas foram tratadas com actinomicetos (SBALCHEIRO, 2006). Em ensaio *in vitro*, Oliveira, 2017 observou que os isolados de actinomicetos são capazes de inibir o crescimento da bactéria *Pantoea ananatis*, apresentando potencial para utilização no controle biológico da mancha-branca do milho.

Os actinomicetos adaptam-se a diferentes condições ambientais e se destacam como os principais produtores de compostos bioativos de alto valor comercial e medicinal, devido à grande quantidade de metabólitos secundários e substâncias antimicrobianas produzidas (KORN-WENDISCH; KUTZNER,1992). Esta característica faz dos actinomicetos fortes agentes no biocontrole de fitopatógenos em plantas (SILVA, 2016), tornando-se uma alternativa para a obtenção de produtos biológicos agrícolas (OLIVEIRA, 2004).

4.2 Atividade Enzimática

Para todas as enzimas analisadas, observou-se variação na expressão das mesmas conforme o tratamento e o momento da coleta. Como descrito a seguir: Em relação à atividade da enzima quitinase (QUI), na ausência de *M. oryzae*, os tratamentos que se destacaram estatisticamente no aumento da atividade enzimática foram: AC18.4, e AC 22 às 0 horas. Sendo que AC18.4 apresentou 2 vezes mais atividade de QUI em relação ao tratamento controle (H₂O) (Tabela 1). Na presença de *M. oryzae*, o tratamento que se destacou em relação ao tratamento controle (H₂O) foi: Mo+AC04 às 72 horas, apresentando 3 vezes mais atividade de QUI. Em relação ao efeito somente das coletas, destacaram-se as coletas realizadas às 72 horas, com 6,237 U.mg⁻¹. Entre o efeito somente dos isolados, destacaram-se AC22 e AC18.4, com 1,931 e 2,364 U.mg⁻¹, respectivamente.

Tabela 1.Atividade enzimática Quitinase (U.mg⁻¹) em diferentes coletas e tratamentos.

Tratamento	Coletas					
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
AC4	0,637 B b	0,86 DE b	1,389 A b	1,001 B b	8,032 A a	
AC18.4	2,364 A a	1,426 ABC a	1,192 A a	2,695 B a	2,933 A a	
AC22	1,931 A b	1,173 BCD b	1,047 A b	1,602 B b	4,476 A a	
AC24	0,778 B c	0,574 E c	0,911 A c	2,407 B b	3,651 A a	
H ₂ O	1,142 B b	1,538 ABC b	0,815 A b	6,237 B a	2,829 A ab	
M.o		0,696 DE b	1,46 A b	4,048 B a	4,901 A a	
M.o+AC04		1,606 AB b	1,036 A b	18,808 A a	3,059 A b	
M.o+AC18.4		1,748 A b	1,079 A b	1,98 B b	12,211 A a	
M.o+AC22		1,047 CDE a	1,134 A a	4,953 B a	13,075 A a	
M.o+AC24		1,551 ABC b	1,46 A b	10,782 AB a	2,818 A ab	

Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal).

Em relação a atividade da enzima β -1,3 Glucanase (GLU), na ausência de *M. oryzae*, os tratamentos que diferiram no aumento da atividade enzimática foram: AC04 e AC18.4 às 0 horas, apresentando 1,4 e 1,9 vezes mais atividade de GLU, respectivamente em relação ao tratamento controle (H₂O) e AC22 às 24 e 48 horas. Na presença de *M. oryzae*, os tratamentos que se destacaram em relação ao tratamento controle (H₂O) foram: M.o+AC04 e M.o +AC18,4, às 24 horas, apresentando aproximadamente 2 vezes mais atividade de GLU relação ao tratamento controle. Às 48 horas os tratamentos M.o+AC18.4 e M.o+AC22 apresentaram maior expressão da atividade GLU. Em relação ao efeito somente das coletas, a coleta que se desacatou foi a de 72 horas com 17,81 U.mg⁻¹. Entre o efeito somente dos isolados, destacaram-se AC4, AC18.4 e AC22 com 1,099, 1,464 e 0,952 U.mg⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

Tabela2.Atividade enzimática GLU (U.mg⁻¹) em diferentes coletas e tratamentos.

Tratamento	Coletas				
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
AC4	1,099 B b	1,012 DE b	1,265 ABC b	0,955 C b	8,99 AB a
AC18.4	1,464 A a	0,795 E a	0,766 BCD a	3,081 C a	1,958 B a
AC22	0,952 BC d	1,816 BC b	1,588 A bc	1,275 C cd	2,82 AB a
AC24	0,625 C b	0,859 DE b	0,605 CD b	1,222 C b	8,866 AB a
H2O	0,746 C b	1,148 DE b	0,714 BCD b	17,81 AB a	2,231 AB b
M.o		1,388 CDE c	0,639 CD d	2,216 C b	3,305 AB a
M.o+AC04		2,459 A b	0,494 D b	26,698 A a	1,34 B b
M.o+AC18.4		2,188 AB a	1,564 A a	1,853 C a	13,895 AB a
M.o+AC22		1,137 DE a	1,482 A a	4,277 BC a	16,517 A a
M.o+AC24		1,508 CD b	1,339 AB b	8,53 BC a	0,000 B b

Letra maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical). Letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal).

Em relação a atividade da enzima peroxidase (POX), na ausência de *M. oryzae*, o tratamento que se destacou no aumento da atividade da enzima POX, em 30 vezes, em relação ao tratamento controle (H₂O) foi AC4 às 96 horas. Na presença de *M. oryzae*, o tratamento que se destacou em relação ao tratamento controle (H₂O) foi M.o+AC04 às 72 horas apresentando 3 vezes mais atividade de POX. Em relação ao efeito das coletas, foi a de 72 horas com 0,386 U.mg⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3.Atividade enzimática POX (U.mg⁻¹) em diferentes coletas e tratamentos.

Tratamento	Coletas				
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
AC4	0,006 A a	0,000 A a	0,000 B a	0,014 B a	0,678 A a
AC18.4	0,007 A b	0,000 A b	0,006 B b	0,213 B a	0,043 B a
AC22	0,113 A b	0,000 A b	0,106 A a	0,09 B a	0,021 B ab
AC24	0,000 A a	0,000 A a	0,273 AB a	0,082 B a	0,081 B a
H2O	0,000 A b	0,543 A b	0,081 AB b	0,386 B a	0,022 B b
M.o		0,003 A a	0,051 AB a	0,106 B a	0,106 B a
M.o+AC04		0,027 A a	0,059 AB a	1,161 A a	0,027 B a
M.o+AC18.4		0,004 A b	0,063 AB a	0,018 B b	0,000 B b
M.o+AC22		0,006 A a	0,033 AB a	0,018 B a	0,026 B a
M.o+AC24		0,000 A a	0,07 AB a	0,179 B a	0,000 B a

Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal).

Em relação a atividade da enzima Fenilamonoliase (PAL), na ausência de *M. oryzae*, os tratamentos que apresentou maior aumento na expressão da atividade enzimática foram: AC04 e AC 18.4 às 24 horas, apresentando 2 vezes mais atividade de PAL em relação ao tratamento controle (H₂O). Na presença de *M. oryzae*, os melhores tratamentos foram: M.o+AC04, M.o+AC18.4 e M.o+AC24 às 24 horas e Mo+AC04 às 72 horas, neste último apresentando 2 vezes mais atividade de PAL em relação ao tratamento controle. Em relação ao efeito somente das coletas, a coleta que se destacou foi as de 72 com 15,257 U.mg⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4.Atividade enzimática PAL (U.mg⁻¹) em diferentes coletas e tratamentos.

Tratameto	Coletas				
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
AC 4	0,829 C b	2,636 A b	1,688 BC b	1,504 B b	7,727 A a
AC 18,4	2,04 A a	2,645 A a	1,206 C a	2,92 1 B a	2,728 A a
AC 22	1,551 B bc	1,281 C c	1,915 AB b	1,436 B c	8,103 A a
AC 24	1,906 A b	1,26 C b	1,233 C b	2,921 B b	9,018 A a
H2O	2,011 A b	1,165 C b	2,401 A b	15,257 B a	5,126 A b
M.o		1,166 C c	2,123 AB c	4,699 B b	6,345 A a
M.o+AC04		1,833 B b	1,607 BC b	30,973 A a	7,399 A b
M.o+AC18.4		1,82 B a	2,102 AB a	4,24 B a	9,849 A a
M.o+AC22		0,942 C a	2,498 A a	4,01 B a	7,175 A a
M.o+AC24		2,328 A b	1,653 BC b	11,893 B a	3,216 A b

Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal).

Em relação à atividade da enzima Lipoxigenase (LOX), na ausência de *M. oryzae*, os destaques foram os tratamentos AC04, AC18.4 e AC24 às 0 horas. Às 48 horas todos os tratamentos apresentando 2, 3 e 5 vezes mais atividade de LOX em relação ao tratamento controle (H₂O). Na presença de *M. oryzae*, os tratamentos M.o+AC04 e M.o +AC18.4, M.o+AC22 e M.o+AC24 às 48 horas apresentaram 2 vezes mais atividade de LOX em relação ao tratamento controle e às 72 horas M.o+AC04 apresentou um aumento de quase 7 vezes. Em relação ao efeito das coletas, se destacaram as coletas de 72 e 96 horas com 23,855 e 24,815 U.mg⁻¹. Entre o efeito somente dos isolados, destacaram-se AC4, AC18.4 e AC24 com 1,45, 1,372 e 1,93 U.mg⁻¹, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade enzimática LOX (U.mg⁻¹) em diferentes coletas e tratamentos.

Tratamento	Coletas				
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
AC4	1,45 B b	2,113 CD b	5,116 A b	5,076 B b	15,976 AB a
AC18.4	1,372 B b	2,879 B ab	3,486 B ab	9,843 B a	8,733 B ab
AC22	1,135 C c	1,699 DE c	2,767 BC b	3,261 B b	4,172 B a
AC24	1,93 A b	2,277 BCD b	2,888 BC b	6,213 B b	22,513 A a
H20	1,046 C b	4,918 A b	0,92 D b	23,855 B a	24,815 A a
M.o		1,263 E c	0,897 D c	22,33 B a	11,672 AB b
M.o+AC04		4,63 A b	2,34 C b	165,313 A a	7,138 B b
M.o+AC18.4		2,249 BCD a	2,644 BC a	10,15 B a	12,931 AB a
M.o+AC22		2,595 BCD b	2,891 BC b	25,27 B a	13,546 AB ab
M.o+AC24		4,888 A b	2,252 C b	32,902 B a	6,41 B b

Letras maiúsculas definem a análise dos tratamentos dentro de cada coleta (vertical) e letras minúsculas definem análise das coletas dentro de cada tratamento (horizontal).

As enzimas podem ser utilizadas para impedir a colonização dos tecidos das plantas podendo agir como agentes de biocontrole a parede celular dos fitopatógenos, além de disponibilizar nutrientes para a planta (OLIVEIRA, 2009).

GLU e a QUI são proteínas relacionadas a patogênese pertencente à família PR-2 e PR-3, as quais possuem função hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos (LABANCA, 2002). A POX é uma enzima responsável por proteger a parede celular de plantas hospedeiras através da oxidação de fenóis, suberização e lignificação durante as reações de defesa ao ataque de patógenos (SYROS et al., 2004). A peroxidase pode atuar tanto diretamente na defesa de plantas a patógenos, quanto nas vias de sinalização relacionadas a diversos processos fisiológicos em plantas, inclusive resposta à defesa (PINTO, RIBEIRO DE OLIVEIRA, 2010). A enzima Fenilamonoliase (PAL) tem como substrato o aminoácido fenilalanina. Esta é uma enzima chave para todas as vias de síntese de compostos fenólicos, os quais estão envolvidos com resistência a patógenos (PINTO, RIBEIRO DE OLIVEIRA, 2010). A enzima LOX atua no impedimento do crescimento de patógenos induzindo a produção de fitoalexinas, aldeídos e ácido jasmônico, participando também da transdução de sinais (NAMAI et al., 1990).

A resistência induzida é o fenômeno em que uma planta, uma vez adequadamente estimulada, apresenta uma resistência aumentada após inoculação 'desafio' com um agente patogênico (VAN LOON, 1997). Deste modo, a indução de resistência exposta a agentes

indutores podem ser confirmados por meio de análise da atividade de algumas enzimas chaves, envolvidas na resistência de plantas contra patógenos (MACAGNAN, et al 2008).

Quitinase, β -1,3 glucanase, lisozimas, peroxidase dentre outras, estão relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese (PEREIRA,2008). Os actinomicetos são produtores de substâncias antimicrobianas (LOCCI, 1984; MILLER et al., 1989), que diante dos resultados verificados neste estudo, parecem ativar a expressão destas enzimas. Moura (2000), observou que os actinomicetos podem apresentar alguns mecanismos, como o aumento da disponibilidade de nutrientes, a produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal e a indução de resistência.

Em estudo feito por Oliveira (2009), foi encontrado resultados em que os actinomicetos produzem amilase, proteinase, celulase e pectinase o controle de murcha bacteriana ocasionada pela *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomate. Damasceno, (2011) afirmaram que os isolados de actinomicetos demonstraram ser produtores de quitinase, em mudas de tomates no controle de *Meloidogyne javaica*. Em estudos feitos por Macagnan et al (2008), em mudas de cacaueiros tratadas com actinomicetos apresentou atividade de peroxidase elevada até 12 dias.

Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que os actinomicetos podem atuar como indutores de resistência em plantas, e que foi capaz de aumentar a expressão das enzimas QUI, GLU, POX, LOX, PAL, as quais podem ter atuado ativamente na supressão da brusone foliar.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- a) Os Isolados AC04, AC18.4, AC22 e AC24 apresentam potencial para controle da brusone em folhas de arroz.
- b) A atividade enzimática tem sua expressão aumentada na presença dos isolados AC04, AC18.4, AC22 e AC24 podendo atuar na indução da resistência à brusone nas plantas de arroz.

REFERÊNCIA

BABU, R. M. et al. **Differential induction of chitinase and β -1,3 glucanase in rice response to inoculation with bacterial leaf blight pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*).** *Journal of plant diseases and protection* v. 110, n.2, p.105-112,2003.

BETTIOL, W. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas.** Jaguariúna-SP, 2009 cap. 2 p. 25. a

BETTIOL, W. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas.** Jaguariúna-SP, 2009 cap. 5 p. 77. b

BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem*, v.72, p.248-254, 1976

BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J. E. F. **Controle biológico de raças e isolados de *Colletotrichum graminicola*, do sorgo, por Actinomicetos.** Embrapa Milho e Sorgo- Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2003.

CARRER FILHO, R. **Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomateiro.** Dissertação (Tese em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2002

CARRER FILHO, R. ROMEIRO, R.S.; GARCIA F.A.O. **Biocontrole de doenças de parte área do tomateiro por *Nocardoides thermophilus*,** *Tropical Plant Pathology* Viçosa, 2008

CHAIBUB, A.A. **Supressão de Brusone nas folhas de arroz com *Cladosporium cladosporioides*.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V.P. **Efeito antagônico de actinomicetos isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 10, n. 2, 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **A cultura do Arroz.** Brasília-DF, 2015 cap. 1, p. 15

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**, v. 9, cap. 9 p. 65-68 Brasília-DF, 2018

COOK, R.J; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens.** St Paul: APS, 539 p, 1983

CÔRTEZ, M.V.C.B.; VIANA, H.F; SILVA F.R.; SILVA-LOBO, V.L; SILVA, G.B.; PRABHUS, A. S.; FILLIPI, M. C. C. **Quantificação da atividade enzimática**

DAMASCENO, J.C.A **Potencialidade de actinobacterias no biocontrole do nematoide de galhas em mudas de tomateiro.** Dissertação (Mestrado) Cruz das Almas-BA Fevereiro, 2011

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Cultura do Arroz.** Santo Antônio de Goiás, 2006 cap. 3, p. 53- 54. a

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Controle biológico: ciência a serviço da sustentabilidade.** Brasília – DF, 2009. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acesso em: 08 jul. 2018

EMBRAPA. Empresa Brasileira de pesquisas Agropecuárias. **Fungos e bactérias são aliados no combate a doenças do arroz**. Brasília – DF 2016. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9618226/fungos-e-bacterias-sao-aliados-no-combate-a-doencas-do-arroz>> Acesso em: 29 jun. 2018

EMBRAPA. Empresa Brasileira de pesquisas agropecuárias. **Brusone em Arroz**. p. 06 Santo Antônio de Goiás, 2015

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Cultura do Arroz**. Santo Antônio de Goiás, 2006 cap. 15, p. 561- 603. b

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Cultura do Arroz**. Santo Antônio de Goiás, 2006 cap. 15, p.561-581 c

FAO. Food and Agriculture Organisation, 2017. Disponível em:<http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity_imports>. Acesso em: 29 jun. 2018

FILIPPI, M.C.C.; SILVA-LOBO, V.L; PRABHU, A.S. **Aplicação da Biotecnologia na busca de resistência estável à Brusone em Arroz Irrigado**. Santo Antônio de Goiás.

FILIPPI, M.C.C.; et al **Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil**. Biological Control, v. 58, p. 160-166, 2011.

GUIMARÃES, R.A. **Caracterização de isolados de *sarocladium oryzae* e seu potencial na supressão da brusone foliar**.(Dissertação em Agronomia) Goiânia, 2014.

JULIANO, B. O. Rice in human nutrition. Rome. FAO, 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E00.htm#Contents>>. Acesso em: 29 mai. 2015.

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

KORN-WENDISCH, F; KUTZNER, H. J. **The family streptomycetaceae**. The prokaryotes, Springer Verlag, p 1027. New York. 1992,

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Dissertação, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. 2002

LOCCI, R. **Straptomycetes and related genera**. In Bergeys Manual of systematics bacteriology. P 2451-2508,1984

MACAGNAN, D., et al. (2008). **Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano**. Summa Phytopathologica, 34(1), 34-37.

MICHEREFF, S.J. **Proteção de prantas na agricultura sustentável**. Recife, 2001. p. 2

MYAUCHI, M.Y.H. **Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria angustifolia***. Tese (Doutorado em Ciências) Piracicaba – SP, 2012

MOURA, A.B; ROMEIRO, R.S; NEVES, M.C.P **Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro** Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.33, p. 2065-2072, dez. 1998

NASCIMENTO, T.C.E.S **Produção, caracterização e purificação parcial de quitinase produzida por *Streptomyces* sp. DPUA 1581**, Dissertação. Recife, 2012

NOTTEGHEM, J.L. **Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. In: Blast and upland rice: report and recommendation from the meeting for international collaboration in upland rice improvement.** Los Baños, IRRI, p.43-51. 1981

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

PEREIRA, J.C. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera.** Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ, dez. 2000, p. 11

PINTO, M. D. S. T.; RIBEIRO, J. M.; DE OLIVEIRA, E. A. G. **O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas.** Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2011.

OLIVEIRA, M.F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Porto Alegre - RS, 2003

OLIVEIRA, M.F. **Prospecção de actinomicetos endofíticos de tomateiro com produção de metabólitos bioativos e suas otimização** Tese (Grau de doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Porto Alegre-RS, 2009

OLIVEIRA, J. C. M. D. **Potencial biotecnológico de actinomicetos para produção de enzimas hidrolíticas e biocontrole in vitro de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha-branca do milho** Dissertação (Mestrado área de concentração em Produção Vegetal), Sete Lagoas, MG, 2017t

OLIVEIRA, S.R. **Atividade antagônica de actinomicetos contra *Botrytis cinérea*, patógeno da videira (*Vitis* sp)** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Recife, 2004

SBALCHEIRO, C.C. **Ação do Biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.),** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Passo Fundo, Janeiro de 2006

SILVA-LOBO, V.L. **Tratamento químico para o controle da brusone na panícula.** Comunicado técnico Santo Antônio de Goiás, 2004

SILVA-LOBO, V.L.; FILIPPI, M.C.C; PRABHU, A.S. **Manejo de doenças-Brusone.** Santo Antônio de Goiás, 2007. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fuzvmwzg02wyiv80166sqfmvytyts.html>>. Acesso em: 02 jun. 2018

SILVA, V.M. **Potencial antagônico de actinobactérias visando o biocontrole de *Botrytis cinerea* Patógeno de *Eucalyptus* sp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia, Patologia) Curitiba, 2016

SOUZA, A.C.A, **Silício e Bioagentes na supressão da brusone foliar em arroz**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração: Fitossanidade) Goiânia, 2014

SYROS, T. et al, **Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L.** Journal of Plant Physiology, Stuttgart, v. 161, n. 1, p. 69-77. 2004

TEIXEIRA, L.P. **Biodiversidade de actinobactérias do solo da caatinga para controle biológico de pragas**. VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, Campinas- SP, 2013

TUNCER, M., BALL, A. S., ROB, A., & WILSON, M. T. (1999). **Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25**. Enzyme and Microbial Technology, 25(1-2), 38–47.

VAN LOON, L. C. **Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins**. European journal of plant pathology, v. 103, n. 9, p. 753-765, 1997.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. **The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins**. Physiological and molecular plant pathology, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.

ACTINOMICETO NA SUPRESSÃO DA BRUSONE FOLIAR EM ARROZ

**FERREIRA, Danielle Alves¹; CARRER, Renato Filho¹; FILIPPI, Marta C.C²;
CORTÊS, Márcio V.C.B.²; SOUZA, Alan Carlos Alves² SILVA-LOBO,
VALACIA L.²**

¹ Centro Universitário de Goiás Uni-Anhanguera.

² Embrapa Arroz e Feijão. E-mail:daniellealves003@gmail.com

A brusone (*Magnaporthe oryzae*) é a principal doença da cultura do arroz, podendo causar até 100% de perdas. No controle, o uso de agrotóxicos é intensivo, sendo urgente a adoção de práticas mais sustentáveis. Os actinomicetos produzem 70% dos compostos bioativos, como antibióticos e outros metabólitos secundários, podendo ser úteis no manejo de doenças. Com o objetivo de avaliar o potencial de actinomiceto na supressão da brusone foliar em arroz, os isolados AC04, AC18.4, AC22 e AC24, antagonistas *in vitro* contra *M. oryzae* e outros patógenos, foram utilizados para a microbiolização, por 24 horas, de sementes da cv. BRS Primavera. As sementes foram plantadas em casa de vegetação, em bandejas. Aos 19 dias após o plantio foi pulverizada uma suspensão dos actinomicetos e dois dias depois a inoculação com o isolado BRM 31295 de *M. oryzae* (3×10^5 conídios.mL⁻¹). O tratamento controle foi pulverizado com *M. oryzae* e a testemunha absoluta com água. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com seis tratamentos e três repetições. Avaliou-se a severidade da brusone sete dias após a inoculação, utilizando escala de notas (1-9) e a atividade enzimática, coletando-se amostras diárias, a primeira antes da inoculação, as demais 24h, 48h, e 72h após a inoculação com *M. oryzae*. Os actinomicetos reduziram a severidade da brusone e a maior expressão das enzimas, β -1,3-glucanase, peroxidase, lipoxigenase, fenilalanina-amônia liase e quitinase foi observada 72 horas após o desafio com o patógeno. Actinomicetos são eficientes na supressão da brusone e a atividade enzimática indica indução de resistência na interação *M. oryzae* x arroz x actinomicetos.

PALAVRAS-CHAVES. *Magnaporthe oryzae*. Controle Biológico. Indução de Resistência