

ÁCIDOS GRAXOS COMO MARCADORES QUÍMICOS DA *PYRICULARIA GRISEA*

Izabel Krieger⁽¹⁾, Jarlei Fiamoncini⁽¹⁾, Cristiane Maria da Silva⁽¹⁾, Lucas Miura⁽²⁾, Francisco Carlos Deschamps⁽³⁾

⁽¹⁾ UNIVALI – Curso de Biologia/Biotecnologia - Bolsistas de Iniciação Científica. ⁽²⁾ EPAGRI-Estação Experimental de Itajaí. ⁽³⁾ EPAGRI/UNIVALI, Caixa Postal 277, 88301-970, Itajaí, SC.
xicodsc@hotmail.com

Palavras chave: brusone, cromatografia, fitopatologia, fungos, lipídeos

A Brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea*, é uma das doenças de maior importância na cultura do arroz irrigado em todos os países onde a cultura se desenvolve. No Estado de Santa Catarina, principalmente na região litorânea, tradicional produtora de arroz irrigado, essa doença também é expressiva. Como sintomas característicos, causa mancha de folhas, lesões nos nós dos colmos e em todas as partes das panículas, podendo provocar morte das plantas com prejuízos elevados na produção. A doença afeta toda a parte aérea da planta, desde o plantio até o amadurecimento. Nas folhas, os sintomas típicos iniciam-se por pequenos pontos de coloração castanha, que evoluem para manchas elípticas, com extremidades agudas. Como consequência, a redução da área foliar fotossintetizante apresenta efeito direto sobre a produção de grãos.

Quando a doença ocorre severamente nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, o impacto é tão grande que a queima das folhas acaba por levar a planta à morte (KIMATI et al., 1997). Nas panículas a doença pode atingir o raque, as ramificações e o nó basal. A infecção do nó da base da panícula é conhecida como brusone do pescoço e tem um papel relevante na diminuição da produção. Quando as panículas são atacadas imediatamente após a emissão até a fase de aparecimento de grãos leitosos, a doença pode provocar o *chochamento* total dos grãos. Quando são infectadas mais tardiamente, ocorre redução no peso dos grãos ou a quebra da panícula na região afetada, caracterizando o sintoma conhecido por “pescoço quebrado”.

O efeito negativo da brusone sobre a produtividade do arroz é altamente significativo principalmente nos anos em que ocorrem associações de práticas como plantios tardios, uso de cultivares suscetíveis, irrigação tardia, alta densidade de semeadura e excesso de adubação nitrogenada em condições climáticas favoráveis a doença (MIURA, 1991).

O controle químico no combate à brusone, embora eficiente, é limitado por condições econômicas, sociais e ambientais. A utilização de cultivares resistentes é o método mais econômico e viável para o manejo da doença. Porém a suscetibilidade à brusone dos cultivares atualmente em uso, persiste como um dos graves obstáculos para a manutenção da produtividade do arroz irrigado.

Embora se reproduza assexuadamente, o fungo *P. grisea* se notabiliza por expressar um grande número de formas virulentas ou famílias, antes também designadas como raças. Esta dinâmica de adaptação resulta na “quebra” da resistência dos cultivares comerciais, observada poucos anos após o seu lançamento (OU, 1985). Portanto, o melhoramento visando maior resistência, têm sido a principal medida de controle na maioria das regiões produtoras de arroz, onde o uso de fungicidas não é compensador.

Pela características de adaptação do fungo e para que o melhorista possa direcionar seu trabalho, é fundamental que sejam identificadas as raças predominantes em um determinado local. A identificação das raças pelo método convencional é realizada pela reação observada na Série Internacional de Cultivares Diferenciais de Arroz, proposta pelo International Rice Research Institute (IRRI). Com o avanço da biologia molecular, o emprego de marcadores moleculares permitiu agrupar mais adequadamente os isolados. Neste caso, as técnicas mais utilizadas são o Polimorfismo baseado no tamanho do fragmento (RFLP), Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), e a identificação de polimorfismo pela amplificação das seqüências entre as cópias do elemento repetitivo (rep-PCR). Entretanto, os produtos do genoma como lipídeos e especialmente proteínas, apresentam potencial

para serem usados como marcadores na caracterização de raças de fungo. No caso de ácidos graxos, PUPIN et al., (2000) relataram o sucesso deste enfoque separando raças do fungo *Metarhizium anisopliae*. Dependendo das condições da cultura, os lipídeos podem representar de 5 a 32% da composição dos fungos. Os ácidos graxos mais frequentemente encontrados são o ácido palmítico (saturado), o oléico (monosaturado) e linoleico (poliinsaturados).

O objetivo deste trabalho foi determinar a composição em ácidos graxos, dos lipídeos encontrados em raças do fungo *P. grisea*, como potenciais marcadores químicos na caracterização de raças do fungo causador da Brusone.

O trabalho foi realizado na EPAGRI – Estação Experimental de Itajaí – SC, utilizando-se três isolados de folhas (A, B e C) e dois de panícula (D e E), pertencentes as raças IB45, IB41, IG-2, ID-16 e IG-1. O isolado D é originário de Torres (RS), sendo os demais de Itajaí (SC).

O meio líquido utilizado para o crescimento do fungo, foi preparado com 200g de batata, 20g de extrato de levedura e 20g de dextrose para cada litro de meio (Rebello, 2003). Após a inoculação, o meio ficou em crescimento sob agitação por 14 dias, sendo a massa micelial separada por filtração utilizando filtros de papel. Em seguida o material foi congelado 24h e submetido a secagem por liofilização.

Para a extração dos lipídeos, o material seco foi macerado deixando-se extrair com 10mL da solução clorofórmio/metanol 2:1(v:v), acondicionados em frascos plásticos de 2,5cm de Ø. Os frascos foram agitados ocasionalmente e a mistura permaneceu reagindo por 24 horas. Após este período, foram adicionados 5mL de água para separar a fase de clorofórmio, que permanece no fundo do tubo. Os tubos foram então centrifugados a 1800rpm durante 10 minutos para otimizar a separação das fases. A fase de clorofórmio foi transferida para tubos de ensaio com tampa rosqueável, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Os tubos foram deixados em banho-maria a 40° C, com fluxo de ar comprimido dirigido para dentro do tubo para evaporar a fase de clorofórmio.

A derivatização foi realizada adicionando-se 500µL da solução de saponificação (KOH 0,4M em metanol), incubando os tubos vedados em banho-maria fervente durante 10 minutos. Após este período, os tubos foram deixados esfriar para posterior adição de 1,5mL da solução de esterificação (120mL de metanol + 4g de sulfato de amônio + 6mL de H₂SO₄). Os tubos foram novamente levados ao banho-maria fervente por mais 10 minutos. Após esfriar, foram adicionados 2mL de n-hexano 85%, para extrair os ésteres metílicos de ácidos graxos. Após a vigorosa mistura dos tubos, 1mL da fase de hexano foi transferida para um frasco adequado ao injetor automático do cromatógrafo gasoso.

A análise dos ésteres metilados foi realizada em um cromatógrafo a gás, equipado com o detector de ionização de chama e coluna capilar Supelco SP2340 (60m x 0,25mm x 0,2µm). As temperaturas do detector e injetor foram 260°C e 240°C. A programação de aquecimento da coluna foi iniciada com 140°C por 5 minutos e aumento gradual de 4°C/min. até a temperatura final de 240°C permanecendo assim por 10 min. O fluxo do gás de arraste (H₂) foi de 17mL/min. O volume de injeção foi de 3µL com razão de split de 1:50. A identificação dos picos foi efetuada pela comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos (Supelco 37 components FAMES Mix, ref. 47885-U). A quantificação foi determinada pela área do pico do éster metílico de interesse, em relação a área total dos picos identificados, expresso em %.

O sucesso na utilização do presente método para caracterizar diferentes raças de fungo, depende da diversidade na composição de ácidos graxos que as raças apresentam. Apesar de serem apenas cinco, as raças analisadas no presente trabalho apresentaram-se distintas quanto a composição em ácidos graxos (Tabela 1). Apesar dos ácidos graxos serem moléculas de grande diversidade de formas químicas, foram detectadas apenas cinco formas nos fungos estudados. Mesmo que em concentrações distintas, estes ácidos graxos também foram encontrados no fungo *Metarhizium anisopliae* (PUPIN et al., 2000).

É possível observar que as diferenças entre as maiores e menores concentrações determinadas nas cinco raças foi da ordem de pouco mais de 30% para os ácidos palmítico

e linoléico. Para os demais esta diferença situou-se bem acima dos 100%, alcançando mais de 270% no caso do ácido esteárico. Como único representante dos monoinsaturados, o ácido oléico apresentou concentração mínima de 8,32% na raça IB45 e 20,64% na raça IB41, evidenciando a grande diversidade de composição que as raças podem apresentar em relação a este ácido. A maior concentração de ácidos saturados (palmitico + esteárico) foi apresentado pela raça IG-2, enquanto de poliinsaturados foi da raça IB45 alcançando 68% (Tabela 1).

Também foram registrados alguns picos nos cromatogramas, que não apresentaram similaridade com os padrões disponíveis. Como eles não se repetem nas raças estudadas, a sua identificação poderia se constituir em novos marcadores químicos.

Pela diversidade observada na composição de ácidos graxos, estas moléculas apresentam potencial para serem utilizadas como marcadores químicos. Os ácidos esteárico, linolênico e oléico, são os que apresentam por ordem, as maiores variações na composição de lipídeos dos fungos estudados. Deve ser considerado que com número elevado de raças a serem separadas, além da composição química, procedimentos matemáticos (análises multivariadas) devem estar associados.

Tabela 1 – Concentração (%) dos ácidos graxos presentes em 5 raças de *Pyricularia grisea* isolados de folhas e panículas de plantas de arroz.

Ácido graxo	Representação	T.R.*	Raças				
			A(IB45)	B(IB41)	C(IG-2)	D(ID-16)	E(IG-1)
Palmitico	C16:0	24,888	21,80	20,20	22,67	17,18	17,48
Não identificado	?	25,570			**		
Não identificado	?	27,741	**				
Esteárico	C18:0	28,570	1,88	4,09	7,00	4,81	5,23
Oleico	C18:1n9c	29,623	8,32	20,64	16,88	18,83	12,82
Não identificado	?	30,153			**		
Linoleico	C18:2n6c	31,257	58,31	49,79	43,51	51,31	49,95
Linolênico	C18:3n3	33,039	9,69	5,27	9,93	7,86	14,52
Não identificado	?	35,116		**		**	

* T.R. = Tempo de retenção na corrida cromatográfica.

** Picos que parecem no cromatograma sem a respectiva correspondência com qualquer dos padrões utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**, 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2 1997 p.85-88.

MIURA, L. Eficiência de Fungicidas no controle da *Pyricularia grisea* sob diferentes métodos de aplicação. In: **Reunião da cultura do arroz irrigado, 19. Anais... 1991**. Balneário Camboriu, SC. Florianópolis: EMPASC. 1991 p. 350.

OU, S.H. A Proposal for an International Program of Research on the Rice Blast Disease. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1985. p.109-201.

PUPIN, A. M. et al. Total Lipids And Fatty Acids Of Strains Of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 121-128, 2000.

REBELO, J. A. Mancha Reticulada (*Leandria mormodicae* Rangel) em cucurbitáceas. Tese de Doutorado. UFRGS - Faculdade de Agronomia. Porto Alegre, 2003. 230 p.