

CRESCIMENTO, ESPORULAÇÃO E ESTABILIDADE GENÉTICA DE *Pyricularia grisea* IN VITRO

Gustavo Emygdio Halfen⁽¹⁾, Maycon Eduardo Nicoletti⁽²⁾, Fernando Adami Tcacenco⁽³⁾, Leonardo Bittencourt Scoz⁽⁴⁾, Cristiane Maria da Silva⁽⁵⁾. ¹Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Bolsista do CNPq. Rua Uruguai, 458, Caixa Postal 360, 88302-202, Itajaí, SC. Email: gughalfen@yahoo.com.br. ²Biólogo Bacharel, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC. ³Eng. Agr, Ph. D., Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí. ⁴Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). ⁵Mestranda em RGV da UFSC.

O arroz é extensamente cultivado em todo o mundo e constitui base da alimentação em muitos países, incluindo o Brasil. A principal doença do arroz é a brusone, que se caracteriza por formar queimaduras das folhas, apresentando manchas elípticas com extremidades agudas que comprometem a área foliar fotossintetizante, tendo reflexo direto sobre a produção de grãos (Bedendo & Prabhu, 2005). O agente etiológico é o fungo *Magnaporthe grisea* (Herb.) Barr, que corresponde, em seu estágio anamórfico, a *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., caracterizando-se por apresentar conidióforos simples, longos e septados, dos quais se originam conídios piriformes com um ou dois septos transversais e hialinos (OU, 1985). O controle mais efetivo e econômico da doença é o uso de cultivares de arroz com resistência durável (Prabhu & Bedendo, 1991). No entanto, a variabilidade desse patógeno tem dificultado a obtenção de cultivares resistentes, sendo fundamental se conhecer as raças predominantes em um determinado local para que o melhorista possa direcionar suas pesquisas. Para esse estudo, é necessário isolar e cultivar esse fungo em meio de cultura, estimulando a produção de conídios para obtenção de inóculo (Xia *et al.*, 2000).

O cultivo de *Pyricularia grisea* é feito em vários meios de cultura, dependendo do objetivo. Para a obtenção de isolados, utiliza-se de modo geral o meio AA (ágar-água). Já o meio BDA (batata, dextrose, água e ágar) é o mais utilizado para o crescimento micelial, enquanto que, para a esporulação, são utilizados os meios CF (centeio fino, ágar e água), FT (farinha de trigo, ágar e água), AV (aveia, ágar e água), BDA e FA (farinha de arroz, ágar e água). No entanto, há registro na literatura alertando que o comportamento de diferentes cepas do fungo é diferenciado, dependendo do meio de cultura. Além disso, para ensaios de determinação de raças, nos quais se faz a inoculação em cultivares diferenciadoras, é necessária uma abundante produção de esporos (Xia *et al.*, 2000). Qualquer que seja o meio e a metodologia de cultivo adotada, cada repicagem pode induzir ao aparecimento de formas diferentes de virulência (Bedendo *et al.*, 1979). Para se obter resultados confiáveis, a cepa estudada deve não só produzir esporos em abundância, mas ser livre de variação em laboratório e para isso a otimização do cultivo do fungo *in vitro* torna-se necessária.

Para tal faz-se relevante o estudo do crescimento e esporulação do fungo em diferentes meios, bem como o surgimento de mutações *in vitro*, objetivando a padronização do cultivo de *P. grisea*. Com esse objetivo foi realizado o presente trabalho, no qual foram testados meios de cultura com diferentes fontes de carboidratos.

Para os testes de cultura *in vitro* de *P. grisea* foram utilizadas uma cepa isolada da cultivar Epagri 108 (isolado 1), e duas cepas isoladas de linhagens do programa de melhoramento genético de arroz da Epagri - Estação Experimental de Itajaí (isolados 2 e 3). Estas foram incubadas em câmara úmida por 24 h a 28 °C sob fotoperíodo de 12 h. Os conídios que surgiram foram transferidos para placas de Petri contendo meio AA (ágar, 15 g L⁻¹) e crescidos por 24 h a 28 °C. A partir dos conídios germinados, foram realizados isolamentos monospóricos, que foram crescidos em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (por litro de meio: 200 g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar) por sete

dias para obtenção de micélio. A partir daí, com o auxílio de um furador, as cepas foram inoculadas em cinco diferentes meios de esporulação: 1. FA (50 g de farinha de arroz – grãos de arroz com casca, moídos no liquidificador – e 15 g de ágar); 2. AV (50 g de aveia e 15 g de ágar); 3. CF (50 g de farinha de centeio fino, 15 g ágar); 4. FT (50 g de farinha de trigo e 15 g de ágar); e 5. BDA, utilizando-se quatro repetições em um delineamento completamente casualizado.

As avaliações foram realizadas aos seis, nove e doze dias de cultivo, sendo avaliados os seguintes parâmetros: (i) crescimento das colônias; (ii) esporulação; e (iii) formação de quimeras (zonas de mutação). Após os 12 dias de cultivo as placas foram abertas e raspadas com o auxílio de um alça de *drigalski* para a retirada de micélios e restos indesejáveis. Em seguida as placas foram cobertas com papel filme plástico perfurado e incubadas na BOD durante sete dias, estimulando assim a esporulação. Após o crescimento do fungo, foi realizada a contagem de conídios. Os resultados obtidos aos seis e doze dias de crescimento (avaliações 1 e 3) nos diversos meios foram submetidos a análise de variância.

Para os dados de crescimento, não houve diferenças significativas entre meios e entre isolados, em ambas avaliações. No entanto, houve interação significativa entre isolados e meios, indicando que os isolados apresentam crescimento diferenciado nos meios testados (Tabela 1). Os dados médios de crescimento são apresentados na Tabela 2. Observa-se que o meio 5 (BDA) induziu a um crescimento inicial mais rápido, diminuindo com o passar do tempo. Já o meio 1 (FA) induziu ao menor crescimento inicial e a um baixo crescimento final.

Com relação à produção de esporos, as análises estatísticas indicaram que não houve diferenças significativas entre tratamentos, com um alto coeficiente de variação. Os dados médios, por meio de cultura, são apresentados na Tabela 3.

No tocante à formação de quimeras (zonas de mutação) aos doze dias de cultivo, verifica-se que os meios 1 (FA) e 5 (BDA) induziram a uma maior formação de quimeras, enquanto que o meio 4 (FT) não apresentou nenhuma quimera, quando todos os isolados são considerados (Tabela 3). Analisando-se cada um dos isolados, verificou-se que o isolado 1 não apresentou formação de quimeras em nenhum dos meios. Para o isolado 2, o meio 5 (BDA) foi crítico, apresentando em média 4,5 zonas de quimera por repetição; os meios 1 e 2 (FA e AV) apresentaram, em média, 1,5 zonas de quimera por repetição. Para o isolado 3, o meio 1 apresentou 2,5 zonas de quimera por repetição, enquanto que o meio 3 (CF) apresentou uma zona de quimera por repetição.

Tomando-se os três parâmetros em conjunto, conclui-se que nenhum meio isoladamente é eficiente para induzir um bom crescimento dos isolados, alta produção de esporos e ausência de mutações. Para o crescimento, todos os meios testados apresentam resultados satisfatórios. No entanto, os meios 1 (FA) e 5 (BDA), que apresentaram o maior número de conídios, também apresentaram as maiores taxas de mutação. Isto permite sugerir que, quando da produção de conídios para inoculação em ensaios de determinação de raças, deva ser utilizado mais de um meio de cultura, já que as respostas dos isolados diferem de meio para meio, e que seja dada especial atenção ao surgimento de mutações, eliminando-se placas que sejam suspeitas de mutação do fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEDENDO I.P.; PRABHU A.S. Doenças do arroz – *Oryza sativa*. In: KIMATI, H. et al. (eds). **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p.79-90.
- BEDENDO, I.P.; RIBEIRO, A.S.; CARDOSO, C.N. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae*, agente causal da brusone no arroz. **Summa Phytopathologica**, v.5, p.106-109, 1979.
- 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. (Editores) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1985, p.109-201.

PRABHU, A.S.; BEDENDO, I.P. Avaliação de resistência horizontal a brusone em cultivares de arroz. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, nº. 1, 1991, p. 34-38.

XIA, J.Q.; CORREL, J.C.; LEE, F.N.; ROSS, W.J. Regional population diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas and the influence of host selection. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.8, p.877-884, 2000.

Tabela 1. Resultados da análise de variância para diâmetro médio das colônias de três isolados de *Pyricularia grisea* (1, 2 e 3) crescidos em cinco diferentes meios de cultura, avaliados aos seis e 12 dias. Epagri, Itajaí, SC, 2007.

Tratamento	Avaliação 1 (6 dias)		Avaliação 3 (12 dias)	
	G.L. ^(a)	Valor de F	G.L.	Valor de F
Tratamentos A (meios)	4	10,66	4	5,62
Tratamentos B (isolados)	2	322,99	2	168,86
Interação A x B	8	4,35*** ^(b)	8	3,65**
Resíduo	45		45	
Total	59		59	
	Coef. de variação = 6,9%		Coef. de variação = 4,6%	

^(a) G.L. = Graus de liberdade

^(b) **, significativo ao nível de 0,1%; ***, significativo ao nível de 0,01%

Tabela 2. Diâmetro médio das colônias de três isolados de *Pyricularia grisea* (1, 2 e 3) crescidos em cinco diferentes meios de cultura, avaliados aos seis e 12 dias. Epagri, Itajaí, SC, 2007.

Tratamento	Diâmetro	
	Avaliação 1 (6 dias)	Avaliação 3 (12 dias)
	-----cm-----	
<u>Meio de cultura</u>		
1 (FA)	3,90	8,15
2 (AV)	4,14	8,26
3 (CF)	4,33	8,63
4 (FT)	4,21	8,51
5 (BDA)	4,66	7,98
<u>Isolados</u>		
1	3,83	7,01
2	3,36	9,00
3	5,58	8,90

Tabela 3. Produção média de conídios e formação de zonas de mutação (quimeras) em cinco meios de esporulação testados para *Pyricularia grisea* após doze dias de crescimento. Epagri, Itajaí, SC, 2007.

Meio de cultura	Diâmetro	
	Conídios	Zonas de quimera
	-- Número por mL x 10 ⁴ --	----- Número -----
1 (FA)	54,55	1,33
2 (AV)	23,76	0,50
3 (CF)	17,12	0,33
4 (FT)	17,13	0,00
5 (BDA)	27,78	1,50

Agradecimentos: Ao CNPq, pelas bolsas concedidas a G.E.H, M.E.N. e L.B.S. (Projeto 507096/2004-5).