

CAPACIDADE GERMINATIVA E INFECTIVA DE ISOLADOS DE *Dicyma pulvinata* ANTAGÔNICOS A *Microcyclus ulei* MANTIDOS EM COLEÇÃO DE CULTURA

Mello, S.C.M.¹; Frazão, H.S.; Silva, J.B.T.

RESUMO

As coleções de culturas desempenham importante papel como fontes de organismos, genes e metabólitos para diversos usos, dentre os quais, o controle biológico de fitopatógenos. Em um levantamento realizado nas principais regiões de cultivo de seringueira do Brasil foram obtidos 54 isolados de *Dicyma pulvinata*, considerado importante hiperparasita do *Microcyclus ulei*, agente causal do mal-das-folhas da seringueira. Esses isolados foram incorporados à coleção de fungos para controle biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A germinação dos conídios constitui o primeiro passo para o estabelecimento da interação entre o patógeno e o agente de biocontrole e pode ser influenciada por vários fatores, tais como umidade e temperatura, bem como alterações genéticas durante o armazenamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade germinativa e infectiva de 20 isolados de *D. pulvinata* mantidos na coleção. Foram adotados diferentes níveis de umidade (92%, 94%, 97%, 98%, 99% e 100%) e períodos de incubação (4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 e 24 horas). A germinação de conídios mostrou ser altamente dependente de umidade. Nos bioensaios conduzidos em casa de vegetação (umidade de 80-90% e temperatura variando entre 23 e 35° C), vários isolados mostraram-se extremamente agressivos ao *M. ulei*, ocorrendo penetração já no primeiro dia após a inoculação.

PALAVRAS-CHAVE: controle biológico, hiperparasita, mal-das-folhas da seringueira.

SUMMARY

GERMINATIVE AND INFECTIVE CAPABILITY OF *Dicyma pulvinata* ISOLATES ANTAGONISTIC TO *Microcyclus ulei* MAINTAINED IN CULTURE COLLECTION

Culture collections have played essential roles not only as sources of genes and biologically active metabolites, but also because of the interest in the possible use of these fungi and other microbes as biological agent for industry and biocontrol of agricultural pests. A survey was carried out in several rubber producing areas of Brazil, in order to obtain isolates of *Dicyma pulvinata*, a fungus that is said to be an efficient biocontrol agent to *Microcyclus ulei*, causal agent of South American leaf blight (SALB). Fifty-four isolates were obtained from different geographic areas across the country. All isolates were introduced into Embrapa Genetic Resources and Biotechnology fungus collection. Conidia germination is the first step for the establishment of the pathogens and biocontrol agent interactions. It can be influenced by several factors as humidity, temperature as well genetic alterations during the storage. The objective of this study was to evaluate the capacity of germination and infection of twenty *D. pulvinata* isolates from the Embrapa's collection. Different levels of relative humidity ranging among 92%, 94%, 97%, 98%, 99% and 100% and incubation periods of 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 and 24 hours were tested. Conidia germination showed to be highly dependent of humidity levels. In the experiments conducted under greenhouse (RH ranging near 95-100% and temperature 23-35° C), some isolates revealed to be extremely aggressive to the *M. ulei*, occurring penetration no longer first day after the inoculation.

KEY WORDS: biological controle, hiperparasite, South American Leaf Blight of Hevea rubber.

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 709770-900, Brasília, DF, Brasil.
E-mail:smello@cenargen.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O controle biológico é altamente desejável, mesmo quando associado a outros métodos de controle, pois promove menor impacto ambiental, evitando assim, o rompimento do equilíbrio biológico. Vários microrganismos com elevado potencial para controle biológico de doenças foliares têm sido identificados. No entanto, os resultados obtidos com esses microrganismos muitas vezes são insatisfatórios, por falta de melhores conhecimentos relativos a biologia, genética, epidemiologia ou variabilidade genética, especialmente em relação à virulência e agressividade de isolados entre populações.

O mal-das-folhas é a mais destrutiva doença da seringueira (*Hevea* sp.) cultivada no Brasil e em outros países da América Latina (Sambugaro, 2003). Sob condições favoráveis e variedades suscetíveis, as perdas podem chegar a 100%. No Brasil, esta doença foi a principal responsável pelos fracassos dos projetos Belterra, Fordlândia, Probor I, II e III, os quais totalizam aproximadamente 100.000 ha de seringais de cultivo (Gasparotto *et al.*, 1990). Com o fracasso do cultivo de seringais nas áreas sempre úmidas da Amazônia, Bahia e São Paulo, a heveicultura passou, então, a expandir-se nas áreas de menor umidade das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, nas denominadas “áreas de escape”, devido ao fato de possuírem condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento da doença, durante o período de renovação foliar (julho-setembro). A região Centro-Oeste, especialmente o ecossistema Cerrado, tornou-se uma das principais áreas de expansão da heveicultura no país, devido essencialmente à proximidade do mercado consumidor, baixo preço da terra, possibilidades de consorciação com culturas anuais, recuperação de áreas degradadas resultantes do intenso cultivo de pastagens e culturas anuais, e maior disponibilidade de mão-de-obra. Apesar dessas razões para ocupação do Cerrado com seringueira, condições climáticas favoráveis à cultura e desfavoráveis ao mal-das-folhas prevalecem como fatores decisivos para essa escolha.

A despeito do bom desempenho dos seringais das áreas do Cerrado, Gasparotto & Junqueira (1994) afirmam que o agente causal dessa doença, *Microcyclus ulei* (P. Henn.) Arx (fase ascógena) ou *Fusicladium macrosporum* Kuiper (fase conidial), por ser um fungo de alta capacidade de mutação, está em processo de adaptação às condições climáticas destas regiões. Desta forma, estes autores admitem que, numa questão de tempo, o mal-das-folhas tornar-se-á uma séria doença, também, nas áreas consideradas de escape, como o Cerrado.

O controle biológico do agente fitopatogênico, pelo uso do fungo *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx (syn. *Hansfordia pulvinata*), tem sido apontado como promissor, pois o antagonista coloniza as lesões estromáticas causadas por *M. ulei*, destruindo as estruturas do patógeno, tanto na fase ascógena como conidial, reduzindo, conseqüentemente, o desfolhamento das plantas e a taxa de inóculo para re-infecções (Junqueira & Gasparotto, 1991). No Brasil, além das avaliações realizadas por Junqueira & Gasparotto (1991), Rodrigues (2002) conduziu experimentos relativos ao cultivo do antagonista em laboratório, enquanto na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia são conduzidos estudos relacionados aos aspectos fisiológicos, morfológicos, moleculares e de patogenicidade, no intuito de selecionar isolados de *D. pulvinata* com potencial para o desenvolvimento de biofungicida (Mello, 2003; Tavares *et al.*, 2004).

Neste trabalho, são apresentados resultados parciais de estudos relativos à capacidade germinativa e infectiva dos isolados de *D. pulvinata*, mantidos em coleção de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação de conídios de *D. pulvinata* a diferentes níveis de umidade e períodos de incubação

Para avaliação da capacidade germinativa de conídios de *D. pulvinata* sob efeito de diferentes níveis de umidade e de períodos de incubação, foi utilizado o isolado CG 772, selecionado como promissor para o biocontrole do *M. ulei* em estudos preliminares. Os testes foram realizados utilizando conídios obtidos em meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Para estabelecer os níveis de umidade (92%, 94%, 97%, 98%, 99% e 100%) adotados nos testes de germinação, utilizou-se meio líquido (2 g de extrato de levedura e 2 g de sacarose /L de água), acrescido de glicerol e NaCl. Os períodos de incubação adotados foram: 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 e 24 horas, em temperatura de 26°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Capacidade infectiva de isolados de *D. pulvinata* sobre *M. ulei*

Plantas de seringueira foram enxertadas com o clone GD1 e mantidas em casa de vegetação para desenvolver brotações, até o estágio apropriado para os bioensaios. A inoculação do *M. ulei*, na superfície de folíolos em estágio de desenvolvimento correspondente ao “B2” descrito por Hallé *et al.* (1978), foi realizada com o auxílio de um atomizador. Utilizou-se uma suspensão contendo 2×10^5 conídios/mL, acrescida de Tween 20 a 0,02%. Os conídios

foram obtidos de lesões esporuladas, do mesmo clone. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, sob umidade de 95-100% e temperatura de 23-25°C. Após 48 horas no escuro, adotou-se o regime alternado de 12 horas de luz/escuro.

Cada isolado de *D. pulvinata* (Tabela 1), multiplicado em BDA, foi inoculado aos seis dias após a inoculação do *M. ulei*, utilizando suspensão de 10⁶ conídios/mL, também acrescida de Tween 20 a 0,02%. As plantas foram mantidas em câmara úmida durante 24 horas e, então, transferidas para casa de vegetação, onde a temperatura variou de 23 a 35°C e a umidade relativa situou-se em torno de 80-90%. Amostras das folhas inoculadas foram retiradas diariamente e avaliadas, durante sete dias, quanto à presença de estruturas do patógeno e do hiperparasita, ao microscópio ótico. Determinaram-se as porcentagens de lesões do pa-

tógeno colonizadas pelo hiperparasita, ao final dos experimentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que a germinação de *D. pulvinata* é altamente dependente de umidade. Mais de 90 % dos conídios germinaram após 12 horas, com umidade de 99 %, tendo sido atingido o índice de germinação de 100 %, com apenas oito horas de incubação a 100 % de umidade. A emissão de tubos germinativos não foi observada quando os esporos foram incubados a 92 % de umidade, enquanto aqueles mantidos a 94 % de umidade só germinaram a partir de oito horas, ainda assim, a baixos índices. Neste nível de umidade, o máximo de germinação atingido foi de 75,6 %, após 24 horas de incubação (Tabela 2).

Tabela 1. Identificação dos 20 Isolados de *Dicyma pulvinata* utilizados nos bioensaios para avaliação da agressividade e virulência ao *Microcyclus ulei*.

LOCAL DE COLETA	ISOLADOS
Planaltina, DF	CG 678
Ouro Preto do Oeste, RO	CG 679, CG 771
Manaus, AM	CG 682, CG 732
São Francisco, PA	CG 683, CG 787
Brasiléia, AC	CG 764
Rio Branco, AC	CG 791
Ituberá, BA	CG 772, CG 734
S. J. do Rio Claro, MT	CG 733
Ponte de Lacerda, MT	CG 773, CG 774
Nova Maringá, MT	CG 777, CG 801
Itiquira, MT	CG 790, CG 802, CG 803
França	CG 826

Tabela 2. Germinação de esporos de *Dicyma pulvinata*, isolado CG 772, em diferentes condições de umidade.

Período de incubação (horas)	Umidade (%)					
	92	94	97	98	99	100
4	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0
6	0,0	0,0	0,0	18,0	19,0	71,0
8	0,0	1,0	1,0	41,0	58,8	97,0
10	0,0	3,0	5,0	64,0	82,0	100,0
12	0,0	5,0	10,0	78,0	94,0	100,0
16	0,0	37,0	53,0	86,0	93,0	100,0
20	0,0	50,0	67,0	86,0	93,0	100,0
24	0,0	76,0	71,0	86,0	93,0	100,0

As lesões de *M. ulei* encontravam-se esporuladas na ocasião em que receberam o inóculo do antagonista. Exames ao microscópio, das suspensões obtidas destas lesões, indicaram grande número de esporos do patógeno no primeiro dia de avaliação, quando a maioria dos isolados de *D. pulvinata*, por sua vez, já apresentou alguma taxa de germinação. Neste aspecto, destacou-se o isolado CG 774. Os esporos germinados emitiram tubo germinativo que cresceram sobre as lesões, penetrando os esporos do *M. ulei*. Verificou-se o crescimento do micélio branco típico de *D. pulvinata* e sua esporulação abundante, na superfície das lesões. Vários isolados mostraram-se extremamente agressivos em presença do *M. ulei*, ocorrendo penetração já no primeiro dia após a inoculação: CG 774, CG 801, CG

773, CG 826, CG 772, CG 733, CG 803, CG 734, CG 732 e CG 764. Entretanto, os melhores resultados, em termos de virulência, foram verificados com os isolados: CG 774, CG 801, CG 773, CG 790, CG 679, CG 826 e CG 682 (Figuras 1 e 2). Ao final do experimento, 100% das lesões de *M. ulei* apresentaram-se recobertas por micélio branco típico do antagonista (Figura 3).

Nessa etapa dos trabalhos foram avaliados 20 dos 54 isolados atualmente disponíveis na coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A seleção dos isolados para os bioensaios se deu a partir da caracterização morfológica e molecular, que determinou o padrão de variabilidade genética do fungo. Entretanto, os demais isolados deverão também ser avaliados em etapas futuras.

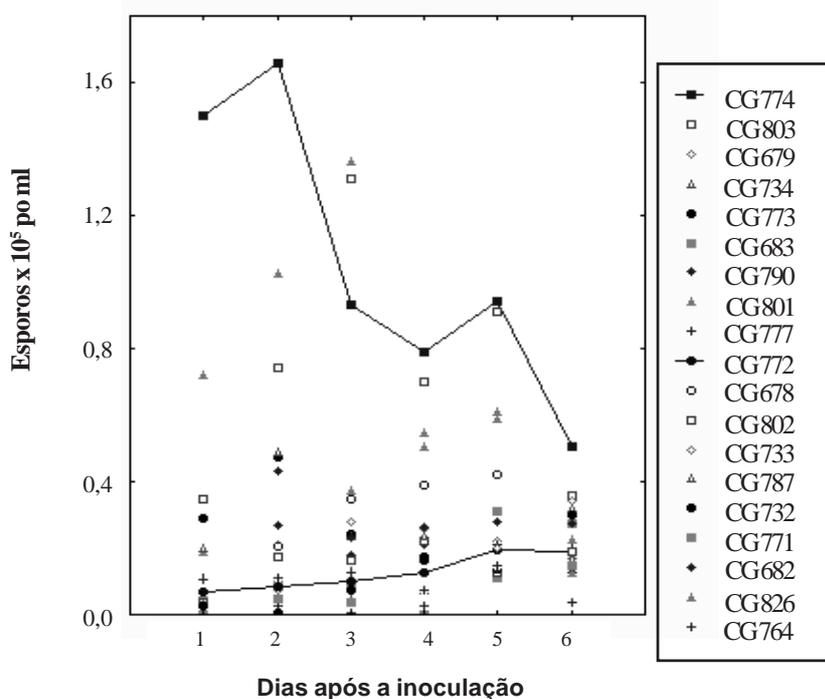


Figura 1. Esporos de *Dicyma pulvinata* germinados, por mL da suspensão obtida por lavagem da superfície de lesões causadas de *Microcyclus ulei*, a diferentes períodos (dias) após a inoculação do antagonista.

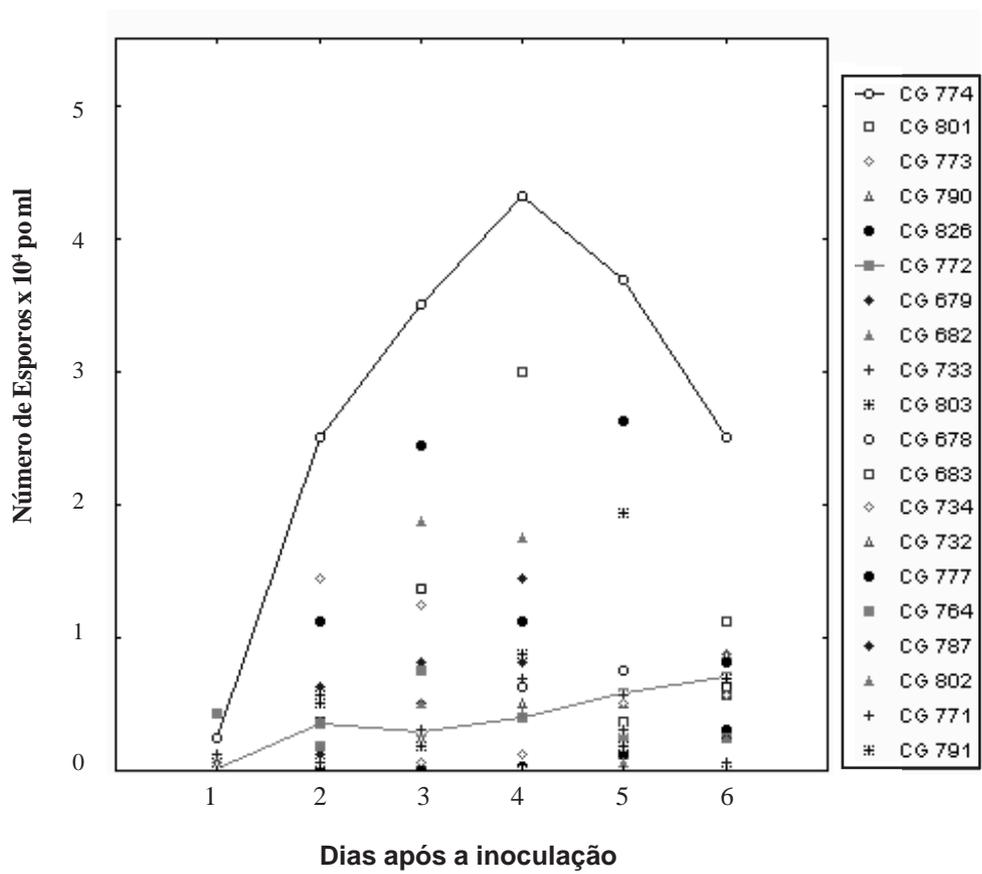


Figura 2. Esporos de *Microcyclus ulei*, penetrados por *Dicyma pulvinata*, por mL, presentes em suspensão aquosa obtida de lesões do patógeno, a diferentes períodos (dias) após a inoculação do antagonista.

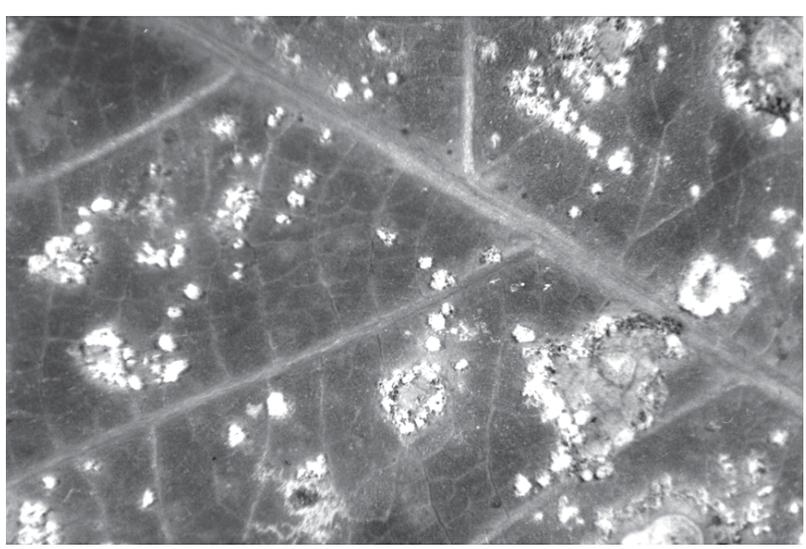


Figura 3. Lesões de *Microcyclus ulei* cobertas pelo micélio de *Dicyma pulvinata*, aos sete dias após a inoculação do antagonista.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GASPAROTTO, L. & JUNQUEIRA, N.T.V. 1994. Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*, causal agent of rubber tree leaf blight. *Fitopat. Bras.* 19: 22-28.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, F. A. & LIMA, M. I. P. M. 1990. Enfermidade da seringueira no Brasil. Manaus: EMBRAPA, CPAA., 169p (EMBRAPA. CPAA. Circular Técnica, 3).
- HALLÉ, F.; OLDEMAN, R.A. & TOMLINSON, P.B. 1978. *Tropical trees and forest*. Berling: Spring-Verlag, 441p.
- JUNQUEIRA, N.T.V. & GASPAROTTO, L. 1991. Controle biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: Bettiol, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, p.307-331.
- MELLO, S. C. M. 2003. Controle biológico do mal-das-folhas da seringueira. In: Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, 8., Ilhéus, Anais. Ilhéus: Ceplac/Cepec, 2003, p.136-137.
- RODRIGUES, A.M. 2002. Influência da luz, do pH e de aditivos químicos sobre o crescimento micelial e esporulação de *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A Curtis) Arx {Syn. *Hansfordia pulvinta* (Berk & Curt)} *in vitro*. Tese de mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso.
- SAMBUGARO, R. 2003. Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (*Hevea* spp.) visando resistência ao *Microcyclus ulei*. Tese de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas.
- TAVARES, E.T.; TIGANO, M.S.; MELLO, S.C.M.; MARTINS, I. & CORDEIRO, C.M.T. 2004. Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. *Fitopatol. Bras.* 29:148-154.