

Notas Científicas

Isolados de *Dicyma pulvinata* em estromas de *Microcyclus ulei* em seringueira

Sueli Corrêa Marques de Mello⁽¹⁾, Maria de Fátima Santos⁽¹⁾ e João Batista Tavares da Silva⁽¹⁾

⁽¹⁾Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970 Brasília, DF. E-mail: smello@cenargen.embrapa.br, mfsantos@cenargen.embrapa.br, jtavares@cenargen.embrapa.br

Resumo – *Dicyma pulvinata* é um eficiente agente de biocontrole de *Microcyclus ulei*, causador do mal-das-folhas da seringueira. O objetivo deste trabalho foi obter isolados com grande potencial antagonístico. Em levantamentos realizados em 14 municípios produtores de borracha, localizados nos Estados do Acre, Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Pará e Rondônia, obtiveram-se 52 isolados de *D. pulvinata*. O fungo antagonístico, isolado diretamente em meio de cultura de batata-dextrose-ágar (BDA), foi identificado com base na morfologia dos conídios e conidióforos e preservado pelos métodos da liofilização, congelamento à temperatura de -80°C e criopreservação em nitrogênio líquido, a fim de manter as características morfológicas e patogênicas dos isolados. O efeito antagonístico foi testado por meio de inoculações de *D. pulvinata* em lesões de *Fusicladium macrosporum* induzidas em plantas de seringueira previamente infectadas. Todos os isolados foram incorporados à coleção de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Termos para indexação: *Hevea*, controle biológico, fungo antagonista.

Dicyma pulvinata isolates colonizing *Microcyclus ulei* stromata in rubber

Abstract – *Dicyma pulvinata* is an efficient biocontrol agent of *Microcyclus ulei*, causal agent of South American leaf blight. The objective of this work was to obtain strongly antagonistic isolates. A survey was carried out in rubber plantations located in 14 municipalities in the States of Acre, Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Pará and Roraima, Brazil, obtaining 52 isolates of *D. pulvinata*. The antagonistic fungus was isolated on potato-dextrose-agar (PDA) plates and identified based on morphological characteristics of conidiophores and conidia, and colony appearance. The antagonistic effect was tested by inoculating *D. pulvinata* on *Fusicladium macrosporum* lesions induced on rubber plants, previously. In order to maintain the morphological and pathogenic traits, fungus isolates were preserved by lyophilization, deep freeze (-80°C) and cryogeny. All isolates were introduced into Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia fungus collection.

Index terms: *Hevea*, biological control, antagonist fungi.

Conhecimentos tecnológicos disponíveis têm sido insuficientes para sustentar programas de controle da queima-das-folhas da seringueira (*Hevea* spp.), causada pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) Arx., principal fator limitante à produção de látex e à expansão da cultura no Brasil e em outros países da América Latina (Holliday, 1970; Gasparotto et al., 1984).

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 sexuais do patógeno e, conseqüentemente, redu-

zindo o desfolhamento das plantas e a taxa de inóculo em reinfecções (Junqueira & Gasparotto, 1991).

No Brasil, além das avaliações realizadas por Junqueira & Gasparotto (1991), Rodrigues (2002) conduziu experimentos relativos ao cultivo do fungo em laboratório, enquanto na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia são estudados aspectos fisiológicos, morfológicos, moleculares e de patogenicidade, no intuito de selecionar isolados de *D. pulvinata* com potencial para o desenvolvimento de biofungicida (Tavares et al., 2004).

Nos Estados Unidos e na França, *D. pulvinata* tem sido alvo de pesquisas para controle da mancha-preta

(*Cercosporidium personatum* Earle) do amendoim (*Arachis hipogea* L.) e da cladosporiose (*Cladosporium fulvum* Cooke) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Peresse & Le Picard, 1980; Mitchell et al., 1987; Tirilly, 1991). Recentemente, esse fungo foi relatado no Japão, colonizando basidiomata de Aphyllophorales (Watanabe et al., 2003). O gênero *Dicyma* tem despertado interesse, também, no isolamento de novos compostos terapêuticos para uso humano (Vázquez et al., 2003). Portanto, a conservação desse fungo é imprescindível para o desenvolvimento de processos e obtenção de produtos de interesse econômico.

O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e conservar isolados de *D. pulvinata*, provenientes de diversas regiões de cultivo da seringueira no Brasil, na busca de um agente eficiente de controle do *M. ulei*.

Nas inspeções realizadas em áreas de cultivo de seringueira localizadas em Brasília, Rio Branco e Santo Antônio, AC; Manaus, AM; Ituberá e Una, BA; Itiquira, Nova Maringá, Pontes e Lacerda e São José do Rio Claro, MT; Belém e São Francisco, PA e Ji-Paraná e Ouro Preto D'Oeste, RO, foram coletadas folhas maduras, contendo estromas de *M. ulei* parasitados por *D. pulvinata* e folhas jovens, contendo a fase conidial de *M. ulei* (*Fusicladium macrosporum* Kuyper), com vistas à obtenção de culturas do fitopatógeno e do antagonista.

As lesões estromáticas causadas por *M. ulei*, caracteristicamente escuras, mostraram-se recobertas por um crescimento branco de aspecto pulverulento, concentrado principalmente na região periférica das lesões, indicando correlação com o crescimento ativo do patógeno (Figura 1). Quando examinadas em microscópio de luz, tais lesões apresentaram uma rede de conidióforos extensivamente ramificados, septados, hialinos, com presença de conídios, sobre os estromas do patógeno, conforme descrição de Krishna & Singh (1979).

Os isolamentos de *D. pulvinata* foram feitos em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), pelo método direto. A incubação ocorreu à temperatura de 25°C sob fotoperíodo de 12 horas. As identificações foram feitas com base nas características culturais e na morfologia de conídios e conidióforos, utilizando as chaves para identificação de hifomicetos, propostas por Ellis (1971) e Carmichael et al. (1980).

No isolamento de *M. ulei*, empregou-se meio específico estabelecido por Junqueira et al. (1984), com modificações, constituído de sacarose, 10 g; KH₂PO₄,

2 g; MgSO₄.7H₂O, 2 g; cloranfenicol, 50 mg; Panvit (complexo de sais minerais, vitaminas e aminoácidos), 2 mL; ágar, 20 g; e água destilada, até completar o volume de 1.000 mL. As placas permaneceram incubadas no escuro, até o desenvolvimento das colônias, quando foram repicadas para meio indutor de esporulação.

Foram identificados 52 isolados pertencentes à espécie *D. pulvinata* (Tabela 1). Outros dois isolados obtidos da França e da Índia (CEN136 e CEN057, respectivamente) foram também incorporados à coleção e vêm sendo utilizados nos experimentos, como referências. A patogenicidade foi comprovada em bioensaios, utilizando-se plantas de seringueira previamente submetidas à inoculação do patógeno, na sua fase conidial (*F. macrosporum*). As estruturas propagativas típicas



Figura 1. Estromas de *Microcyclus ulei*, em folha de seringueira colonizada por *Dicyma pulvinata*.

Tabela 1. Identificação dos 52 isolados de *Dicyma pulvinata* obtidos de coleta realizada em seringais brasileiros.

Local de coleta	Isolados
Brasília, AC	CEN085
Rio Branco, AC	CEN087, CEN110
Santo Antônio, AC	CEN084
Manaus, AM	CEN061, CEN077
Ituberá, BA	CEN079, CEN082, CEN083, CEN088, CEN091, CEN105, CEN112, CEN114, CEN115
Una, BA	CEN086, CEN104, CEN116
Itiquira, MT	CEN059, CEN108, CEN109, CEN113, CEN120, CEN121
São José do Rio Claro, MT	CEN078, CEN097, CEN098, CEN101, CEN102, CEN107, CEN111, CEN117, CEN118
Nova Maringá, MT	CEN096, CEN099, CEN100, CEN103, CEN119
Pontes e Lacerda, MT	CEN092, CEN093, CEN094, CEN122, CEN123
Belém, PA	CEN060, CEN095
São Francisco, PA	CEN062, CEN106
Ji-Paraná, RO	CEN124
Ouro Preto do Oeste, RO	CEN056, CEN058, CEN089, CEN090

do antagonista se desenvolveram em profusão sobre as lesões do patógeno e, cinco dias depois da inoculação, não se observaram mais conídios e conidióforos.

Em meio BDA, todos os isolados produziram colônias efusas, cinza-claro a cinza-esverdeado, tornando-se mais escuras e de aspecto aveludado, com o envelhecimento. Micélio imerso e superficial, septado, marrom-oliváceo e extensivamente ramificado; conidióforo liso, mais escuro na base, ereto, não ramificado na porção inferior e irregularmente ramificado na porção superior. Célula conidiogênica em ramos, poliblática, discreta simpodial e denticulada. Conídio solitário, marrom-oliváceo, unicelular, esférico a subsférico, com cicatriz basal. O diâmetro dos conídios dos diferentes isolados de *D. pulvinata* variou de 4,3–7,3 μm . Essas características morfológicas correspondem às descritas para a espécie (Hughes, 1951).

A fim de garantir a estabilidade das características morfológicas e patogênicas das culturas, os isolados de *D. pulvinata* foram preservados, utilizando-se os mé-

todos da liofilização, congelamento à temperatura -80°C e criopreservação em nitrogênio líquido. Cada isolado foi mantido sob essas três condições, com pelo menos dez acessos, possibilitando testes de viabilidade periódicos. O monitoramento da estabilidade genética e da fenotípica vem sendo conduzido, com base na observação de formação de setores de colônias desenvolvidas em meio BDA, em repicagens consecutivas, isolamento dos setores e regiões centrais das colônias, análise por Southern blot depois da digestão com enzimas de restrição e hibridação com sonda telomérica, conforme Inglis et al. (2001).

Os ensaios para avaliação da eficiência em colonizar estromas do patógeno vêm indicando diferenças quanto à agressividade e à virulência entre isolados de *D. pulvinata*. Destacou-se, entre esses, o isolado CEN093, com maior número de esporos germinados dois dias depois da inoculação e o máximo de penetração nos esporos de *M. ulei* aos quatro dias (Figuras 2 e 3).

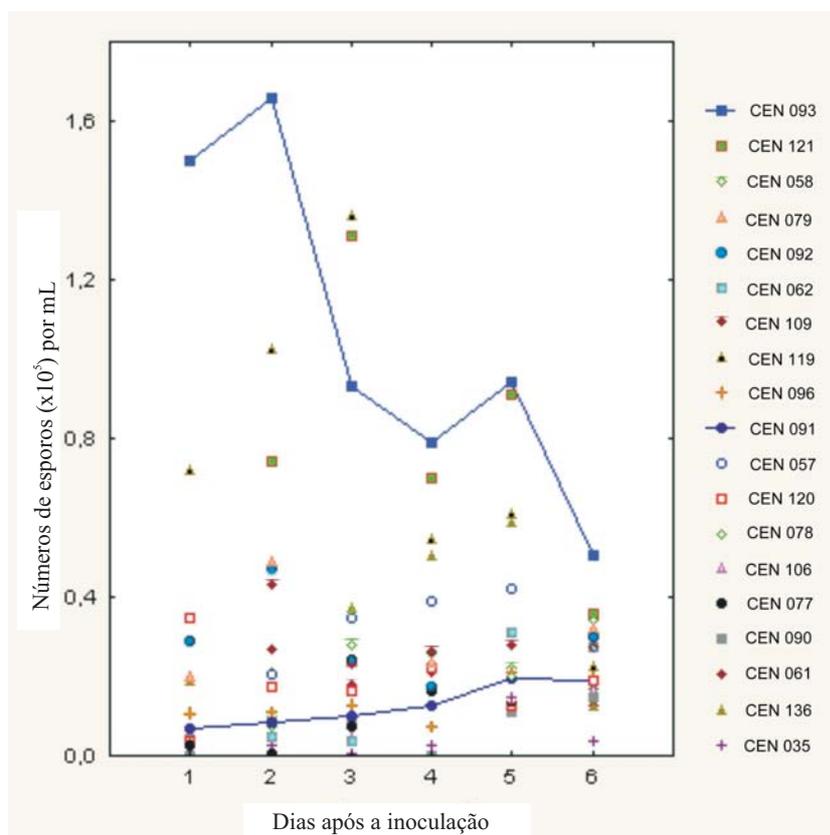


Figura 2. Concentração de esporos de *Dicyma pulvinata* na suspensão obtida por lavagens da superfície das lesões estromáticas de *Microcyclus ulei*, a diferentes períodos depois da inoculação do antagonista.

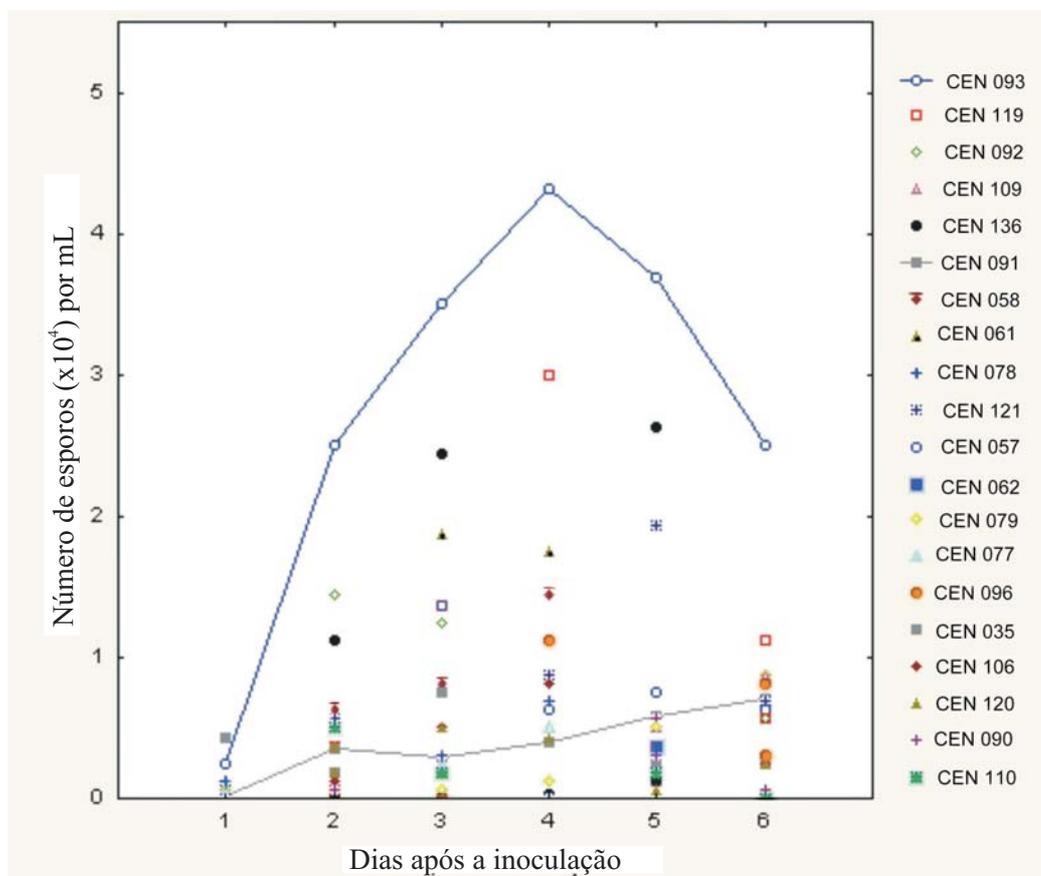


Figura 3. Número de esporos de *Microcyclus ulei*, sofrendo penetração por *Dicyma pulvinata*, presentes em suspensão aquosa obtida de lesões estromáticas do patógeno, a diferentes períodos depois da inoculação do antagonista.

Quatro dos isolados testados em casa de vegetação (CEN093, CEN091, CEN062, CEN058) foram escolhidos com base na eficiência e estudos de estabilidade genética, para uso em experimentos de campo, atualmente em fase de instalação.

Agradecimentos

À Embrapa Acre, à Embrapa Amazônia Ocidental, à Embrapa Amazônia Oriental, à Embrapa Rondônia, à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – Ceplac –, ao Instituto Agrônomo, à Plantações Michelin, à Agricultura Morais Ferrari e à Fazenda Triângulo, pelo auxílio na condução dos trabalhos de coleta; ao Fundo Nacional do Meio Ambiente, pelo apoio financeiro.

Referências

- CARMICHAEL, J.W.; BRYCE KENDRICK, W.; CONNERS, I.L.; SIGLER, L. **Genera of Hyphomycetes**. Edmonton, AB: University of Alberta Press, 1980. 386p.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- GASPAROTTO, L.; TRINDADE, D.R.; SILVA, H.M. **Doenças da seringueira**. Manaus: Embrapa-CNPDS, 1984. 71p. (Embrapa-CNPDS. Circular técnica, 4).
- HOLLIDAY, P. **South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis***. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1970. 31p. (Phytopathology papers, 12).
- HUGHES, S.J. Studies on micro-fungi. XI. Some hyphomycetes which produce phialides. **Mycological Papers**, v.45, p.1-36, 1951.
- INGLIS, W.P.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, D.M.; VALADARES-INGLIS, M.C.; TIGANO, M.S.; MELLO, S.C.M. Molecular

- markers for the characterization of Brazilian *Cercospora caricis* isolates. **Current Microbiology**, v.42, p.194-198, 2001.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L.; ROMEIRO, R. da S.; GASPAROTTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. **Revista Ceres**, v.31, p.322-331, 1984.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPDA, 1991. v.1, p.307-331. (Embrapa-CNPDA. Documentos, 15).
- KRISHNA, A.; SINGH, R.A. *Hansfordia pulvinata* mycoparasitic on *Cercospora* species causing "Tikka disease" of groundnut. **Indian Phytopathology**, v.32, p.318-320, 1979.
- MITCHELL, J.K.; SMITH, D.H.; TABER, R.A. Potential for biological control of *Cercosporidium personatum* leafspot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p.2263-2269, 1987.
- PERESSE, M.; LE PICARD, D. *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. **Mycopathologia**, v.71, p.23-30, 1980.
- RODRIGUES, A.M. **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 pulvinata* (Berk & Curt)] in vitro**. 2002. 39p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.
- TAVARES, E.T.; TIGANO, M.S.; MELLO, S.C.M.; MARTINS, I.; CORDEIRO, C.M.T. Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.148-154, 2004.
- TIRILLY, Y. The role of fosetyl-Al in the potential integrated control of *Fulvia fulva*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.306-310, 1991.
- VÁZQUEZ, M.J.; ROA, A.M.; REYES, F.; VEGA, A.; RIVERA-SAGREDO, A.; THOMAS, D.R.; DÍEZ, E.; HUESO-RODRÍGUEZ, J.A. A novel ergot alkaloid as a 5-HT_{1A} inhibitor produced by *Dicyma* sp. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.5117-5120, 2003.
- WATANABE, T.; KAWANO, Y.; NAKAMURA, K. New records of *Ardhachandra*, *Dicyma*, and *Sibirina* species from basidiomata of Aphyllophorales (Basidiomycetes) in Japan. **Mycoscience**, v.44, p.411-414, 2003.

Recebido em 9 de julho de 2004 e aprovado em 14 de setembro de 2005