



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**Produção, armazenamento, estabilidade e eficiência de linhagens de *Dicyma pulvinata* no biocontrole para o mal-das-folhas da seringueira.**

**Débora Ferreira Melo**

**Dissertação apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.**

**Brasília-DF  
2006**

**Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação da Doutora Sueli Corrêa Marques de Mello, com o apoio do CNPq, da EMBRAPA/CENARGEN e da MICHELIN-Bahia.**

**Aprovado por:**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello  
Orientadora  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

**Dra. Maria Cléria Valadares-Inglis  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marisa A. S. Velloso Ferreira  
Universidade de Brasília – UnB**

**Aos meus pais Idermone e Maria dos Reis,**

**Com todo amor e gratidão**

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela constante presença em minha vida, pelos objetivos concretizados e vitórias alcançadas.

Aos meus pais Idermone e Maria dos Reis, pelo incentivo, apoio e dedicação total na minha formação profissional e pessoal. Ao meu irmão Diogo pelo companheirismo e alegria compartilhada.

A toda minha família pelo apoio e torcida.

À Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello, pelas oportunidades, orientação e amizade.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela disposição de suas instalações e recursos financeiros para realização deste trabalho.

Às Plantações Michelin da Bahia Ltda, pelo total apoio na realização dos trabalhos de campo. Aos funcionários da empresa, em especial ao Fitopatologista Carlos Raimundo Reis Mattos e o Técnico Saulo Emílio Almeida Cardorso, pela dedicação, amizade e apoio irrestritos.

A Dra. Maria Cléria Valadares-Inglis e ao Dr. Petter Ward Inglis, pelo grande auxílio, ensinamentos e orientação nos experimentos de biologia molecular.

Ao Dr. Marcos Rodrigues de Faria e ao Dr. Nilton Tadeu Vilela Junqueira pelas sugestões e colaboração.

Ao Dr. Alan Pomella, pela amostra do Biodac concedida.

Ao Dr. Miguel Michereff Filho pelas contribuições nas análises estatísticas.

Aos amigos de curso: Débora Zoccoli, Márcio, Tito, Reinaldo e Adriana por todo companheirismo e por conseguirem fazer com que os dias mais difíceis se tornassem agradáveis.

Em especial à Ana Cristina, Irene, Caroline e Mariana pela grande amizade, incondicional incentivo e total compreensão.

Aos amigos do Laboratório do CENARGEN, Dra. Zilá, Dr. João Tavares, Alice, Camila, Virgínia, Leonardo, Jales, Raquel, Diogo, Danilo e Magno pela amizade, incentivo e auxílio.

As demais pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a conclusão do trabalho.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
Tabelas do Capítulo 2.....	ix
Tabelas do Capítulo 3.....	x
Tabelas do Capítulo 4.....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
Figuras do Capítulo 2.....	xi
Figuras do Capítulo 3.....	xi
Figuras do Capítulo 4.....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica</b> .....	1
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
1) A Seringueira.....	3
2) Mal-das-folhas.....	8
3) O Patógeno.....	11
4) Controle.....	13
5) Controle Biológico.....	16
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 2 – Estudos sobre as condições de produção e armazenamento de <i>Dicyma pulvinata</i></b> .....	26
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	26

<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	29
1) Seleção de substrato sólido para esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	30
2) Comparação de métodos de produção de esporos de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	30
3) Influência do fotoperíodo no crescimento e esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	32
4) Crescimento, esporulação e germinação de <i>Dicyma pulvinata</i> sob diferentes temperaturas.....	33
5) Uso de fontes de carbono para a esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	33
6) Efeito de fontes de nitrogênio na esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> , em arroz parboilizado.....	34
7) Efeito da secagem na germinação de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	35
8) Germinação de conídios de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	35
9) Armazenamento de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	36
9.1) Armazenamento de <i>D. pulvinata</i> fresco, em temperatura de 4 °C.....	36
9.2) Armazenamento de <i>D. pulvinata</i> após secagem em dessecador.....	37
9.3) Armazenamento de <i>D. pulvinata</i> em suspensão.....	37
10) Uso de Biodac em substrato para o cultivo de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	37
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	39
1) Seleção de substrato sólido para esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	39
2) Comparação de métodos de produção de esporos de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	40
3) Influência do fotoperíodo no crescimento e esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	41
4) Crescimento, esporulação e germinação de <i>Dicyma pulvinata</i> sob diferentes temperaturas.....	45
5) Uso de fontes de carbono para a esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	49
6) Efeito de fontes de nitrogênio na esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> , em arroz parboilizado.....	51
7) Efeito da secagem na germinação de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	52
8) Germinação de conídios de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	55
9) Armazenamento de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	57
9.1) Armazenamento de <i>D. pulvinata</i> fresco, em temperatura de 4 °C.....	57
9.2) Armazenamento de <i>D. pulvinata</i> após secagem em dessecador.....	58
9.3) Armazenamento de <i>D. pulvinata</i> em suspensão.....	58

10) Uso de Biodac em substrato para o cultivo de <i>Dicyma pulvinata</i> .....	60
<b>CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64

**CAPÍTULO 3 – Avaliação da eficiência de linhagens de *Dicyma pulvinata* no controle biológico de *Microcyclus ulei* sob condições de campo e efeito de agrotóxicos e adjuvantes no crescimento e esporulação do mesmo.....** 67

**INTRODUÇÃO**..... 67

**MATERIAL E MÉTODOS**..... 69

1) Avaliação de linhagens de *Dicyma pulvinata* para o biocontrole do mal-das-folhas da seringueira sob condições de campo..... 70

1.1) Caracterização do experimento..... 70

1.2) Produção do inóculo para pulverização em campo..... 71

1.3) Aplicação e avaliação..... 71

2) Avaliação de agrotóxicos sobre o crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*..... 73

3) Efeito de adjuvantes no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*..... 75

**RESULTADOS E DICUSSÃO**..... 76

1) Avaliação de linhagens de *Dicyma pulvinata* para o biocontrole do mal-das-folhas da seringueira sob condições de campo..... 76

2) Avaliação de agrotóxicos sobre o crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*..... 81

3) Efeito de adjuvantes no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*..... 84

**CONCLUSÕES**..... 88

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**..... 89

**CAPÍTULO 4 – Estabilidade genética de linhagens do micoparasita *Dicyma pulvinata*.....** 91

**INTRODUÇÃO**..... 91

**MATERIAL E MÉTODOS**..... 94

1) Linhagens utilizadas..... 94

2) Cultivo do fungo e análise da estabilidade morfológica.....	94
3) Extração de DNA.....	98
4) RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso).....	99
5) RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição).....	100
<b>RESULTADOS E DICUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>112</b>

## LISTA DE TABELAS

### Tabelas do Capítulo 2 – Estudos sobre as condições de produção e armazenamento de *Dicyma pulvinata*

<b>Tabela 1</b> .....	39
Substratos sólidos para esporulação de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> .	
<b>Tabela 2</b> .....	41
Métodos de produção de esporos para <i>Dicyma pulvinata</i> .	
<b>Tabela 3</b> .....	42
Diâmetro médio das colônias de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> em diferentes períodos de cultivo (dias).	
<b>Tabela 4</b> .....	43
Esporulação média de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> nos fotoperíodos de 0, 6, 12 e 24 horas de luz aos 17 dias de crescimento em meio de cultura BDA.	
<b>Tabela 5</b> .....	43
Esporulação média de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> em diferentes períodos de luz aos 17 dias de crescimento em arroz parboilizado.	
<b>Tabela 6</b> .....	46
Esporulação de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> em meio de cultura BDA sob diferentes temperaturas aos 17 dias de crescimento.	
<b>Tabela 7</b> .....	46
Esporulação de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> em arroz parboilizado sob diferentes temperaturas aos 17 dias de crescimento.	
<b>Tabela 8</b> .....	49
Diâmetro médio das colônias de <i>D. pulvinata</i> em diferentes fontes de carbono.	
<b>Tabela 9</b> .....	50
Esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> em meio de cultura suplementado com diferentes fontes de carbono.	
<b>Tabela 10</b> .....	53
Porcentagem média de água retirada de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> em substrato arroz parboilizado em diferentes períodos.	
<b>Tabela 11</b> .....	56
Germinação de conídios de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> em diferentes períodos de incubação.	

<b>Tabela 12</b> .....	57
Viabilidade de <i>Dicyma pulvinata</i> armazenado fresco à 4 °C em diferentes períodos de armazenamento.	

<b>Tabela 13</b> .....	58
Armazenamento de <i>Dicyma pulvinata</i> em diferentes temperaturas.	

<b>Tabela 14</b> .....	59
Armazenamento de <i>Dicyma pulvinata</i> em suspensão em diferentes períodos de armazenamento.	

<b>Tabela 15</b> .....	61
Germinação de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> , cultivado em Biodac após 21 dias de armazenamento.	

**Tabelas do Capítulo 3 – Avaliação da eficiência de linhagens de *Dicyma pulvinata* no controle biológico de *Microcyclus ulei* sob condições de campo e o efeito de agrotóxicos e adjuvantes no crescimento e esporulação do mesmo**

<b>Tabela 1</b> .....	74
Descrição de agrotóxicos avaliados quanto aos seus efeitos no crescimento e esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> .	

<b>Tabela 2</b> .....	75
Descrição dos adjuvantes avaliados quanto aos seus efeitos no crescimento e esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> e dose comercial indicada.	

<b>Tabela 3</b> .....	82
Esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> em BDA (testemunha) e meio acrescido de Malathion.	

<b>Tabela 4</b> .....	86
Esporulação de colônias de <i>Dicyma pulvinata</i> tratadas com diferentes adjuvantes em meio BDA.	

**Tabelas do Capítulo 4 – Estabilidade genética de linhagens do micoparasita *Dicyma pulvinata***

<b>Tabela 1</b> .....	96
Descrição das amostras utilizadas para a realização das análises de estabilidade morfológica e genética. Seqüência de primers decâmeros (10pb) utilizados nos ensaios de RAPD.	

<b>Tabela 2</b> .....	100
Seqüência de primers decâmeros (10pb) utilizados nos ensaios de RAPD.	

## LISTA DE FIGURAS

### **Figuras do Capítulo 2 – Estudos Sobre as Condições de Produção e Armazenamento de *Dicyma pulvinata***

<b>Figura 1</b> .....	45
Diâmetro médio de colônias de linhagens <i>Dicyma pulvinata</i> crescidos sob diferentes temperaturas, aos 16 dias de idade.	
<b>Figura 2</b> .....	47
Germinação de 4 linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> sob diferentes temperaturas.	
<b>Figura 3</b> .....	51
Esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> em arroz parboilizado suplementado de fontes de carbono.	
<b>Figura 4</b> .....	52
Esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> em arroz parboilizado acrescido de fontes de nitrogênio.	
<b>Figura 5</b> .....	54
Porcentagem de esporos germinados para avaliar a viabilidade de linhagens de <i>Dicyma pulvinata</i> após secagem em dessecador a 4 % em diferentes dias de secagem.	
<b>Figura 6</b> .....	54
Porcentagem de água retirada de <i>Dicyma pulvinata</i> mais substrato após 72 horas em estufa.	
<b>Figura 7</b> .....	61
Desenvolvimento de <i>Dicyma pulvinata</i> em Biodac umedecido com os meios SDY e FMC.	
<b>Figura 8</b> .....	62
Esporulação de <i>Dicyma pulvinata</i> após plaqueamento e formação de unidades formadoras de colônias.	

### **Figuras do Capítulo 3 – Avaliação da eficiência de linhagens de *Dicyma pulvinata* no controle biológico de *Microcyclus ulei* sob condições de campo e o efeito de agrotóxicos e adjuvantes no crescimento e esporulação do mesmo**

<b>Figura 1</b> .....	73
Escala Diagramática Modificada ilustrando lesões do mal-das-folhas em folíolos de seringueira.	
<b>Figura 2</b> .....	77
Porcentagem de incidência de <i>Microcyclus ulei</i> em seringueira em resposta aos tratamentos, em condições de campo.	
<b>Figura 3</b> .....	78

Porcentagem de estromas de *Microcyclus ulei* colonizados por *Dicyma pulvinata* em diferentes períodos de avaliação.

**Figura 4.**..... 82  
Crescimento micelial de *Dicyma pulvinata* aos 16 dias em meio de cultivo BDA (testemunha) e meio acrescido de Malathion.

**Figura 5.**..... 85  
Crescimento micelial de *D. pulvinata* aos 16 dias em diferentes tratamentos.

**Figuras do Capítulo 4 – Estabilidade genética de linhagens do micoparasita *Dicyma pulvinata***

**Figura 1.**..... 102  
A – 1ª Geração da linhagem CEN 58 selecionada como morfologicamente estável. B – 1ª Geração da linhagem CEN 62 apresentando setorização.

**Figura 2.**..... 104  
RAPD de amostras de *Dicyma pulvinata* com primer P1.

**Figura 3.**..... 105  
RAPD de amostras de *Dicyma pulvinata* com primer P3.

**Figura 4.**..... 105  
RAPD de amostras de *Dicyma pulvinata* com primer P4.

**Figura 5.**..... 107  
RFLP com sonda telomérica de amostras de *Dicyma pulvinata* com a enzima *Eco* RI.

**Figura 6.**..... 108  
RFLP com sonda telomérica de amostras de *Dicyma pulvinata* com a enzima *Hind* III.

## RESUMO

*Dicyma pulvinata* é um micoparasita encontrado em diferentes áreas geográficas do Brasil e em outros países, porém ainda pouco estudado. Esse fungo apresenta potencial para biocontrole do mal-das-folhas da seringueira, doença causada por *Microcyclus ulei*, que vem limitando a produção de látex e a implantação de novos seringais, especialmente nas regiões úmidas do Brasil e da América Latina. O presente trabalho teve por objetivo a realização de estudos sobre *D. pulvinata*, buscando o desenvolvimento de uma tecnologia de uso massal desse agente de biocontrole. Para tanto, avaliou-se o efeito de diferentes substratos, dos métodos de produção, regimes de luz, temperatura e das fontes nutricionais no crescimento e esporulação do antagonista, bem como, métodos de secagem e armazenamento dos esporos produzidos. Estudou-se, ainda, a compatibilidade do fungo com agrotóxicos e o efeito da adição de adjuvantes ao inóculo. Quatro linhagens do micoparasita foram avaliadas sob condições de campo. Finalmente, instabilidade genética de duas linhagens de *D. pulvinata* mantidas em coleção, após repicagens sucessivas, foi determinada através das técnicas moleculares RAPD e RFLP.

O método mais eficiente para produção de *D. pulvinata* em larga escala foi o de cultivo em sacos de polipropileno, utilizando arroz parboilizado como substrato. As fontes de carbono glicose e sacarose foram responsáveis pelo maior crescimento das colônias, enquanto a sacarose e o amido elevaram a esporulação do fungo. Em arroz parboilizado não houve diferença entre testemunha e as fontes de carbono. Sulfato de amônio destacou-se entre as fontes de nitrogênio testadas. Fotoperíodos de 0 e 6 horas de luz promoveram maior crescimento micelial do fungo e luz contínua favoreceu a esporulação das linhagens avaliadas. Com relação à temperatura, observou-se que o fungo cresce, esporula e germina

entre 19 e 25 °C. Nos experimentos de secagem, três dias em dessecador foi o período mais adequado. Na germinação, com seis horas de incubação a 25 °C obtiveram-se mais de 90 % de esporos germinados. Com relação ao armazenamento, o período de esporos viáveis após estocagem revelou ser curto, mostrando a necessidade de se desenvolver preparações formuladas. Resultados obtidos com o Biodac mostraram que esse material poderá se constituir em alternativa como suporte para cultivo e veiculação do hiperparasita.

A ação do *D. pulvinata* em campo foi comprovada, destacando-se as linhagens CEN 62 e CEN 93 com controle semelhante ao fungicida. O agente de controle demonstrou incompatibilidade com os agrotóxicos avaliados, exceto com Malathion. Quanto ao efeito da adição de adjuvantes às suspensões de esporos do antagonista, não houve inibição do crescimento e esporulação, indicando que qualquer um desses produtos poderia ser usado como componente de um formulado à base de esporos de *D. pulvinata*.

No que se refere aos estudos relativos à estabilidade desenvolvidos com duas linhagens de *D. pulvinata*, verificou-se que este fungo, quando mantido em meio de cultivo e após cultivos sucessivos, apresenta alterações morfológicas de colônias, caracterizadas por formação de setores. Alterações genéticas também foram evidenciadas pelos diferentes padrões de bandas obtidos nas análises de RAPD e RFLP.

Neste trabalho foram estabelecidas às condições ideais de produção e armazenagem, a eficiência em campo e a estabilidade genética de linhagens de *D. pulvinata*, que certamente irá contribuir para o estabelecimento de uma tecnologia de uso do *D. pulvinata* como agente de biocontrole para o mal-das-folhas da seringueira.

## ABSTRACT

*Dicyma pulvinata* is a mycoparasite found in different geographic areas of Brazil and in other countries; however, it is still little studied. This fungus shows potential for the biocontrol of South American Leaf Blight of the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, caused by *Microcyclus ulei*. This disease severely limits latex production and restricts the development of new plantations in the humid regions of Brazil and Latin America. The objective of the present work was to study *D. pulvinata*, to develop technology for mass-production of this biocontrol agent. In this way, the effect of different substrates, production methods, regimes of light, temperature and nutritional sources in the growth and sporulation of the antagonist was evaluated, as well as methods of drying and storage of the produced spores. The compatibility of the fungus with agrotoxins as well as the effect of the addition of adjuvant to inoculum was also studied. Four strains of the mycoparasite were evaluated under field conditions. Finally, genetic instability of two strains of *D. pulvinata* from our collection was determined after successive replications using the molecular techniques, RAPD and RFLP.

The method found to be most efficient for large-scale production of *D. pulvinata* was culture in polypropylene bags, using parboiled rice as substrate. The carbon sources glucose and sucrose allowed the fastest growth of the colonies, while sucrose and starch improved the sporulation of the fungus. In parboiled rice, additional carbon sources produced no difference from the control while ammonium sulphate was the most favourable among the tested nitrogen sources. Photoperiods of 0 and 6 hours of light promoted greater mycelial growth of fungus and continuous light favoured sporulation. In relation to temperature, it was observed that the fungus grows and germinates between 19

and 25 °C. In spore drying experiments, three days in a desiccator was the optimum period. In the germination tests, with six hours of incubation at 25 °C, 90 % of spores germinated. In storage, spores after harvest were found to be to be short-lived, indicating the necessity of developing formulated preparations. Results obtained with Biodac showed that this material is a viable alternative as support for culture and propagation of the hyperparasite.

The action of *D. pulvinata* in the field was proven, where strains CEN 62 and CEN 93 had similar control levels to the usual fungicide. The control agent, however, demonstrated incompatibility with the evaluated agrotoxins, except with Malathion. The addition of adjuvants to the suspensions of spores of the antagonist did not inhibit growth and sporulation, indicating that any one of these products could be used as a component in the formulations of spores of *D. pulvinata*.

Studies on the stability of two strains of *D. pulvinata*, showed that this fungus readily presents alterations of colonial morphology, characterized by the formation of sectors. Strains producing sectors were shown to possess genetic alterations as evidenced by variations in bands obtained in RAPD and RFLP analyses.

In this work, methods of production and storage have been optimised, the efficiency in field and the genetic stability of *D. pulvinata* strains demonstrated. These data may then contribute to the establishment of the use of *D. pulvinata* as an agent of biocontrol for leaf blight of rubber.

# **CAPÍTULO 1**

---

---

## **Revisão Bibliográfica**

### **INTRODUÇÃO**

A seringueira (*Hevea* spp.) é a principal fonte de borracha natural produzida no mundo. Apesar de ter como centro de origem a região amazônica, os primeiros plantios comerciais ocorreram no sudeste asiático através de sementes oriundas da região norte do Brasil (Furtado & Trindade, 2005). A heveicultura é uma atividade agrícola importante, pois está relacionada com a conservação do ambiente e com a fixação do homem no campo (Bettiol, 2003).

A produção de borracha natural no mundo atingiu cerca de 8.620.000 toneladas em 2004, sendo que apenas Tailândia e Indonésia são responsáveis por mais de 50 % desse total. Malásia, Índia, China e Vietnã também são grandes produtores. O Brasil neste mesmo ano produziu cerca de 98.000 toneladas, superando por exemplo o Sri Lanka (Agriannual, 2006), mas este número é considerado baixo frente aos grandes países produtores. A maior parte da borracha consumida no país hoje é importada.

No Brasil, existem condições edafo-climáticas favoráveis ao desenvolvimento da heveicultura e há milhões de hectares para o plantio, mas o insucesso nas áreas tradicionais de cultivo deve-se, especialmente, à presença do *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, agente causador do mal-das-folhas da seringueira (Mattos *et al.*, 2003).

A maioria das pesquisas com seringueira buscam o controle do mal-das-folhas. Esta é a mais séria enfermidade que vitima os seringais nas áreas sempre úmidas do Hemisfério

Ocidental (Viégas & Carvalho, 2000). O patógeno representa grande ameaça por sua rápida disseminação, alta capacidade de causar danos severos e seu difícil controle (Gaparotto *et al.*, 1997).

Atualmente, são conhecidos diversos microrganismos com grande potencial para o controle biológico de doenças foliares. Porém, a deficiência de conhecimentos relacionados à biologia, genética, epidemiologia ou variabilidade, notadamente quanto à virulência e agressividade dos isolados entre populações, tem levado a resultados muitas vezes insatisfatórios em termos práticos (Mello *et al.*, 2005).

O controle biológico apresenta uma série de vantagens, como o controle mais duradouro, possibilidade de associação com outros métodos de controle, possibilidade de utilização das mesmas máquinas usadas rotineiramente para a aplicação de defensivos químicos, a não poluição do ambiente e o baixo risco de intoxicação para homens e animais.

O fungo *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & Curtis)], tem sido considerado um candidato potencial como agente de biocontrole para o mal-das-folhas. Diversos isolados desse fungo foram encontrados, tanto em seringais nativos como nos cultivados, parasitando *M. ulei*. A região de São José do Rio Claro, Estado do Mato Grosso já possui práticas na exploração dessa técnica (Delmadi, 2002). Entretanto, para melhor desempenho desse antagonista é indispensável a realização de estudos mais aprofundados sobre alternativas de produção e formulação, eficiência em campo e genética desse fungo.

A revisão bibliográfica a seguir compreende informações a respeito da seringueira, do mal-das-folhas e do controle biológico, relevantes ao trabalho desenvolvido.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. A Seringueira

A seringueira (gênero *Hevea*) pertence a família Euphorbiaceae, compreendendo espécies lenhosas e arbóreas, que podem atingir até cerca de 50 metros. A primeira descrição de uma espécie deste gênero que possui a Região Amazônica brasileira como habitat natural, data de 1749 (Gonçalves *et al.*, 1983). Sua classificação atual congrega 11 espécies, sendo que destas, 10 são reconhecidas nessa região (Gasparotto *et al.*, 1997).

As espécies pertencentes ao gênero são: *H. brasiliensis* (Willd ex. A. Juss) Muell. Agr., *H. guianensis* Aub., *H. benthamiana* Muell. Arg., *H. nitida* Mart. ex. Muell. Arg., *H. pauciflora* (Spr. ex. Bth) Muell. Arg., *H. rigidifolia* (Spr. ex. Bth) Muell. Arg., *H. comporum* Ducke, *H. spruceana* (Bth.) Muell. Arg., *H. microphylla* Ule, *H. camargoana* Pires e *H. paludosa* Ule. Jhrb. (Gonçalves *et al.*, 1983).

De acordo com Webster & Paardekooper (1989), a seringueira é uma dicotiledônea, monóica, com flores unissexuais, folhas trifoliadas e longos pecíolos. O fruto é uma cápsula trilocular que geralmente possui três sementes (exceto as espécies *H. spreceana* e *H. microphylla*) e o sistema radicular corresponde a 15% do peso seco total da seringueira adulta.

Na maioria das espécies o caule é ereto, cilíndrico e sempre ramificado no alto da copa. Em cada brotação, as primeiras folhas são maiores e mais distantes entre si e o folíolo central, maior em relação aos laterais (Gomes & Albuquerque, 2000). A semente possui de 45 a 50% de óleo viscoso de cor amarela, que pode ser aplicado na fabricação de tintas e vernizes (Gonçalves *et al.* 1983).

Todas as espécies do gênero produzem látex, com maior ou menor intensidade, em função das diferenças inter e intra-específicas (Webster & Paardekooper, 1989; Gomes & Albuquerque, 2000).

Em regiões com temperatura média anual igual ou superior a 20 °C, a seringueira cresce e produz bem, especialmente em latitudes elevadas, como as das áreas continentais do Brasil e China. No entanto, essa planta apresenta condições excepcionais de tolerância e adaptação à seca (Ortolani, 1985).

A seringueira possui uma baixa exigência edáfica (Pereira, 1992). A maioria dos solos explorados com seringueira nos estados onde se produz borracha natural é de baixa fertilidade química natural, embora a cultura demonstre melhor produção e desenvolvimento se utilizados fertilizantes. Além de conter quantidades suficientes de nutrientes para a planta e um suprimento de água no solo e atmosfera, os solos considerados aptos para o cultivo da seringueira necessitam ter propriedades que possibilitem a fixação e o desenvolvimento de um sistema radicular vigoroso (Vieira & Gama, 2000).

Cerca de 70% do látex é constituído de água, portanto a pluviosidade torna-se importante tanto no crescimento da planta como na produção do látex (Pereira, 1992). Em condições climáticas de baixa pluviosidade ou elevada deficiência hídrica, a demanda de água da planta é atendida em solos profundos (Ortolani, 1985).

Em plantas de *Hevea* ocorre um período de senescência e queda das folhas. Nesse período, a planta utiliza suas reservas orgânicas e minerais para reconstituir sua folhagem, conseqüentemente diminuindo a produção de látex (Mathias Filho & Carmo, 1985). Essa é a fase mais importante para a fitopatologia, sendo relevante o conhecimento do hábito fenológico, a maneira e o refolhamento dos seringais. Quando os folíolos apresentam de 12

a 15 dias de idade, demonstrando coloração antociânica intensa, ocorre a grande maioria dos ataques das doenças foliares (Gasparotto *et al.*, 1997).

Segundo Hallé *et al.* (1978), há quatro fases no ciclo de ontogenia foliar relacionadas com o nível de atividade do meristema apical e com as fases de desenvolvimento foliar da seringueira:

Estádio A - dura em média nove dias. A gema apical, anteriormente em repouso, entra em atividade de divisão celular e formação dos primórdios foliares e das gemas auxiliares.

Estádio B - dura em média dez dias. Essa é a fase do alongamento e possui dois substádios: B1 – folíolos na posição vertical com ápice voltado para cima, fortemente carregado com antocianina.

B2 – ápices dos folíolos voltados para baixo e coloração antociânica menos intensa.

Estádio C – dura aproximadamente oito dias. Os folíolos apresentam-se pendentes, flácidos e de cor verde.

Estádio D – dura cerca de 13 dias. Essa é a fase de dormência da gema apical com folhas totalmente amadurecidas.

A espécie *H. brasiliensis*, destaca-se como a espécie de maior interesse comercial e a mais recentemente domesticada entre as plantas produtoras de látex. Compreende características importantes, como a alta capacidade produtiva de uma borracha que contém propriedades como elasticidade, resistência ao desgaste, plasticidade, impermeabilidade para líquidos e gases e isolamento térmico (Gonçalves *et al.*, 1983).

Em meados do século XVII surgiu o primeiro estudo de caráter científico sobre a borracha de *Hevea*, feito pelo naturalista francês Charles Marie de la Condamine. Anteriormente a esta data, esta planta era apreciada somente como curiosidade, sem perspectivas de uso prático. Em 1839 descobriu-se o processo de vulcanização, sendo esse

um marco na evolução do setor, abrindo horizontes para sua aplicação e transformando a borracha em matéria-prima de maior relevância, indispensável na tecnologia moderna (Dutra *et al.*, 1988).

Em 1908, no município de Una (BA) ocorreu a primeira iniciativa de cultivo da seringueira no Brasil, com o plantio de 200 mudas de seringueiras vindas da Ilha de Java (Gonçalves *et al.*, 1983). Atualmente, a seringueira tem sido cultivada de Norte a Sul do país, incluindo todos os estados das Regiões Centro-Oeste e Sudeste. Na Região Norte, existem seringais de cultivo principalmente no Pará e Rondônia, embora ainda predomine a exploração de seringais nativos. No Nordeste, a cultura é explorada em Pernambuco e Bahia (Gasparotto *et al.*, 1997).

A produção de borracha brasileira vem sofrendo aumento, passando de 89.202 toneladas em 1996 para 156.318 toneladas em 2003. A Região Sudeste é a que possui os índices mais elevados de produção. Somente no Estado de São Paulo foram produzidos em 2003 (81.915 toneladas) mais de 50% do total do país. Os outros estados que mais contribuem com a heveicultura são Mato Grosso (25.187 toneladas), Bahia (22.259 toneladas) e Espírito Santo (7.624 toneladas). Em relação à borracha colhida em 2003, a região Sudeste novamente destaca-se com 41.242 hectares, seguida da Região Nordeste, da Centro-Oeste, Norte e, por fim, da Região Sul, com 296 hectares de área colhida (Agriannual, 2006).

A produção de látex é de fundamental importância, pois seu emprego como matéria prima é imprescindível na fabricação de objetos cirúrgicos, impermeabilização de tecidos, na indústria automobilística, especialmente na fabricação de pneumáticos, como isolante térmico, entre outros (Gonçalves *et al.*, 1983). Embora a borracha sintética obtida a partir

do petróleo possuir quase a mesma composição química da borracha natural, suas propriedades físicas restringem seu uso a alguns manufaturados (Tanzini, 2002).

Segundo Tanzini (2002), além do destaque devido a produção do látex, os seringais são importantes na conservação do solo e melhoria do ambiente, além de gerar empregos e riquezas, visto que a seringueira permanece produtiva por longos períodos, permitindo a utilização das áreas degradadas ou imprestáveis para culturas anuais.

Na Ásia, têm-se buscado algumas alternativas para aumentar a renda dos heveicultores. A alternativa complementar mais importante tem sido a exploração da madeira, extraída quando o período produtivo das árvores encerra (com cerca de 25 a 30 anos). Na Malásia, aproximadamente 70% da madeira utilizada vem das seringueiras, existindo a possibilidade de extração de 130 a 180 toneladas/ha de madeira em um seringal no final do seu ciclo produtivo. Também pode-se produzir sementes, já que a extração de óleos de seringueira vem apresentando grande potencial industrial (Tanzini, 2002).

No Brasil, apenas em 1990 pode-se verificar que a produção de borracha em seringais de cultivo (54%) superaria a de seringais nativos (Homma, 2003). A demanda por borracha no país ainda supera em muito a oferta, pois só em 2004 foram consumidas 282.000 toneladas de borracha, enquanto a produção ficou em torno de 98.000. Devido a este fato, grande parte da borracha consumida no país é importada. Os maiores fornecedores Tailândia, Indonésia e Malásia com 78.235, 61.623 e 48.306 toneladas respectivamente, em 2004. Outros países como Vietnã e Cingapura também contribuem, em menor escala, com as exportações de borracha para o Brasil (Agrianual, 2006).

Diversas doenças atacam a cultura da seringueira, sendo a maioria delas causadas por fungos. O mal-das-folhas é reconhecido por muitos fitopatologistas como a enfermidade mais grave (Furtado & Trindade, 2005).

## 2. Mal-das-folhas

O mal-das-folhas da seringueira, também conhecido como queima-das-folhas ou mal-sul-americano das folhas ou, ainda, South American leaf blight (SALB) para países de língua inglesa, é causada pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. É considerada a mais séria doença da seringueira e o principal problema para o estabelecimento de seringais de cultivo nas Américas Central e do Sul, limitando a implantação de novos empreendimentos. Até o momento a doença restringe-se ao Continente Americano representando forte ameaça para o Oriente, onde existem os maiores plantios de seringueira do mundo (Gasparotto *et al.*, 1984; Moraes, 1989; Gasparotto *et al.*, 1990; Gasparotto *et al.*, 1997).

A doença encontra-se distribuída em todas as áreas onde as espécies de *Hevea* são nativas, desde a latitude de 18 ° N, em El Palmar, no México até a latitude de 24 ° S no Estado de São Paulo (Gasparotto *et al.*, 1990). O mal-das-folhas já causou sérios prejuízos nos seringais do Brasil, Guiana, Suriname, Peru, Trinidad, Colômbia, México, Venezuela, Honduras, Nicarágua, Haiti, Guiana Francesa, Bolívia, entre outros. No Brasil, o mal-das-folhas ocorre em todos os estados onde a seringueira é cultivada, causando danos relevantes na Região Norte, no Sudeste da Bahia e em alguns municípios do estado do Mato Grosso e do Espírito Santo. (Gasparotto *et al.*, 1997).

As tentativas de implantação de seringais comerciais no Brasil iniciaram-se em 1928 pela Companhia Ford em Fordlândia - PA, e, posteriormente, em Belterra - PA. Porém, em razão do mal-das-folhas fracassaram-se inúmeros plantios, incluindo os do Programa Nacional de Incentivo à Produção de Borracha Natural na Região Amazônica (PROBOR), tendo sido implantados os PROBOR I, II e III (Dean, 1989; Moraes, 1989;

Gasparotto *et al.*, 1990). Até 1988 havia cerca de 166 mil hectares de seringueiras em plantios comerciais no Brasil, sendo que 38 mil de um total de 95 mil que se encontravam na região amazônica foram perdidos em consequência da doença (Furtado & Trindade, 2005).

De acordo com Tavares (2001), na Tailândia, Malásia e Indonésia, onde as condições ambientais e climáticas são propícias ao desenvolvimento do patógeno, constata-se a ausência do *M. ulei*, apesar da utilização de clones altamente suscetíveis. Este sucesso é devido à adoção de políticas de proteção e incentivo à cultura de *Hevea* spp.

Os sintomas do mal-das-folhas podem ser observados no limbo, no pecíolo e nos ramos novos e quando o clone é altamente suscetível também em frutos verdes. A expressão dos sintomas da doença é dependente da idade dos folíolos e da susceptibilidade dos clones (Gasparotto *et al.*, 1990; Gasparotto *et al.*, 1997).

Em viveiros e jardins clonais, a alta incidência desta doença provoca atraso no crescimento, redução do número de plantas em condições a serem enxertadas e diminuição no aproveitamento de borbulhas para enxertia em épocas apropriadas. Em seringais adultos, o mal-das-folhas debilita as plantas, podendo ocasionar a morte, além de facilitar a incidência de outras doenças, que também podem gerar a mortalidade das plantas (Gasparotto *et al.*, 1990).

Em folíolos jovens com até 10 dias de idade, são observadas inicialmente lesões claras, como manchas de óleo, que evoluem para cor escuras. Na fase abaxial, ocorre a esporulação conidial com tonalidade verde-oliva. Folíolos com elevado número de lesões caem precocemente. É possível observar o secamento dos terminais de hastes e galhos e, conseqüentemente morte descendente das plantas, devido aos desfolhamentos sucessivos provocados por infecções e reinfecções dos folíolos jovens. Os folíolos maduros não são

infectados pelo patógeno. Quando as infecções são leves, os folíolos permanecem nas plantas, desenvolvendo o sintoma de lixa que é resultante da produção de estromas negros. No interior dos estromas, originam-se os pseudotécios, que contêm os ascósporos, sendo estes a fonte de inóculo primário e as estruturas responsáveis pela sobrevivência do patógeno. Em condições favoráveis, os ascósporos germinam, penetrando e colonizando os folíolos. Cerca de cinco a seis dias após a infecção, quando há ótimas condições para o fungo, os folíolos apresentam-se recobertos de conídios, que constituem o inóculo secundário (Gasparotto *et al.*, 1997; Tavares, 2001).

A disseminação dos conídios de *M. ulei* ocorre através dos ventos e da água de chuva, sendo o primeiro, o maior responsável pela disseminação. Além dos fatores ambientais favoráveis à disseminação do patógeno, existem outros que devem ser considerados. Por exemplo, até 12 a 15 dias de idade as folhas de seringueira são suscetíveis (dependendo do vigor e do clone da planta). Outro fator importante é que a partir do terceiro ou quarto ano a seringueira perde todas as folhas e reenfolha anualmente. Estas são características fundamentais para a aplicação de técnicas adequadas para controle do mal-das-folhas (Gasparotto *et al.*, 1990).

Diversos aspectos são relevantes no que diz respeito à ocorrência e severidade da doença. A temperatura e o molhamento foliar implicam significativamente na infecção do *M. ulei* em folíolos de seringueira, variando o índice da doença com o grau de virulência dos isolados. A combinação de 24 °C com 16 horas de molhamento foliar é a melhor para que ocorra infecção, em muitos isolados (Gasparotto *et al.*, 1989). São consideradas condições propícias para germinação de esporos e infecção do hospedeiro: a umidade do ar acima de 95%, durante 10 horas consecutivas e uma temperatura média diária entre 24 ° e 26 °C (Camargo *et al.*, 1967). Assim, sob condições em que ocorrem períodos prolongados

de orvalho, neblinas ou chuvas leves, as lesões aumentam e as plantas podem perder totalmente a folhagem (Gasparotto *et al.*, 1990).

A incidência ou severidade do mal-das-folhas pode ser aumentada em seringais estabelecidos em regiões onde as temperaturas noturnas são baixas (16 a 18 °C) e as diurnas, altas (aproximadamente 24 °C). Sob baixas temperaturas, o tempo requerido para a germinação dos conídios e para causar infecção é maior. Porém existem raças ecológicas de *M. ulei* adaptadas a regiões que possuem o clima adverso para seu desenvolvimento. Estas são menos exigentes quanto ao período de molhamento, como é o caso de um isolado procedente de Viana no Espírito Santo que mostra ser agressivo a 16 °C (Gasparotto *et al.*, 1994).

### **3. O Patógeno**

O fungo *M. ulei*, anteriormente conhecido como *Dothidella ulei* P. Henn, pertence à classe Loculoascomycetes, Divisão Ascomycota (Furtado & Trindade, 2005). Possui ciclo biológico completo na seringueira (Brignani Neto *et al.*, 1991), apresentando ao todo três estruturas reprodutivas durante o seu ciclo de vida: conídios, picnidiósporos e ascósporos (Gasparotto *et al.*, 1984).

Os principais responsáveis pela doença são os conídios. Estes são produzidos em conidióforos erupentes, que explodem lançando-os ao vento e facilitando a disseminação da doença. Nesta fase anamórfica ou assexuada o fungo é denominado *Fusicladium macrosporium* Kuyper. Os conidióforos são simples eretos ou geniculados, ligeiramente esverdeados. Os conídios são hialinos à marrom claro, uni ou bicelulares (Zambolim *et al.*,

1985; Gasparotto *et al.*, 1984; Gasparotto *et al.*, 1997; Rodrigues, 2002). Os conídios, quando bicelulares, possuem aspecto retorcido característico, sendo as células proximais mais largas e truncadas (Furtado & Trindade, 2005).

Outra fase assexuada é a picnial. Segundo Gasparotto *et al.* (1997), esta fase apresenta-se em picnídios dentro de estromas. Os conidióforos podem ser simples ou ramificados e os picnídios ostiolados. Os picnidiósporos são de forma cilíndrica à fusóide. Os picnídios são descritos como *Aposphaeria ulei* (P. Henn.), porém ainda não se têm informações sobre as funções destas estruturas na patogenicidade (Zambolim *et al.*, 1985).

Na fase teleomórfica, são produzidos os ascósporos, em pseudotécios dentro do estroma, pela forma perfeita do fungo (*Microcyclus ulei*). Os ascos são bitunicados e contém oito ascósporos, hialinos (Zambolim *et al.*, 1985; Gasparotto *et al.*, 1984; Gasparotto *et al.*, 1997; Rodrigues, 2002). Brignani Neto *et al.* (1991), descrevem esta fase como a mais demorada, desenvolvendo nos folíolos maduros, os quais permanecem na planta e desempenham papel fundamental na sobrevivência do patógeno de um ano para o outro.

O ciclo de vida do *M. ulei* pode ser estimado entre quatro a cinco meses. Inicia-se com as infecções dos folíolos novos, surgindo os sintomas após cerca de 4 a 10 dias. São necessários aproximadamente dois meses para a total formação do estroma e, finalmente, dois meses para a formação dos ascos, amadurecimento e liberação dos ascósporos (Gasparotto *et al.*, 1997; Furtado & Trindade, 2005).

*M. ulei* apresenta elevada variabilidade morfológica e fisiológica (Junqueira *et al.*, 1984). Em todas as regiões onde se pratica a heveicultura, observa-se a fase sexuada o ano todo, o que eleva a possibilidade de recombinação gênica e de mutações ocasionais. No

Brasil são conhecidas 22 raças do patógeno, cinco destas presentes na região do Vale do Ribeira (Furtado & Trindade, 2005).

Junqueira *et al.* (1987), verificaram que isolados de *M. ullei* que diferem em virulência, também diferem quanto aos padrões isoenzimáticos e, portanto, esta diferença pode estar relacionada à especificidade de hospedeiros e a capacidade de esporulação.

As fases do ciclo de ontogenia foliar estão diretamente relacionadas com o ciclo do patógeno, pois correspondem às fases de desenvolvimento do *M. ullei*, suscetibilidade e resistência dos folíolos à infecção. A utilização de cortes histológicos é uma técnica eficiente para a caracterização anatômica foliar permitindo distinguir também diferentes fases do ciclo do fungo e suas possíveis alterações no hospedeiro (Sambugaro, 2003).

O *M. ullei* possui uma elevada capacidade de mutação, sofrendo adaptações às diferentes condições climáticas, o que poderá tornar-se um grave problema para o controle da doença, principalmente em áreas consideradas de escape (Gasparotto & Junqueira, 1994).

#### **4. Controle**

Segundo Tavares (2001), no Brasil inúmeras estratégias de ação podem ser utilizadas como parte do controle ao mal-das-folhas, tais como: a seleção de clones resistentes, cultivo de seringueiras em áreas consideradas de escape, a utilização de produtos químicos, a enxertia-de-copa e o controle biológico.

Uma importante medida de controle são as “áreas de escape”, ou seja, plantio em locais desfavoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Utilizando o método do balanço

hídrico, que leva em conta os valores mensais de precipitação pluvial e de evapotranspiração de cada região, a Seção de Climatologia do Instituto Agrônomo de Campinas desenvolveu um zoneamento climático para a cultura revelando áreas com estação seca bem definida, que coincidem com o período de trocas de folhas das plantas, sem riscos de epidemias, o que viabiliza áreas potenciais ao cultivo da seringueira, mostrando novas fronteiras heveícolas (Furtado & Trindade, 2005).

As regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste são consideradas como áreas de escape, sendo nesta última especialmente o ecossistema Cerrado. Várias vantagens, como o baixo preço da terra, a localização próxima ao mercado consumidor, a disponibilidade de mão-de-obra, a recuperação de áreas degradadas pelo intenso cultivo de pastagens, as possibilidades de consórcio com culturas anuais e principalmente o clima favorável à cultura e impróprio ao mal-das-folhas, tornam este ecossistema uma das principais áreas para expansão da seringueira (Mello *et al.*, 2005).

A ausência do mal-das-folhas numa plantação não é suficiente para enquadrá-la como área de escape. O clima, a virulência ao patógeno, a susceptibilidade e densidade do hospedeiro, a disponibilidade do inóculo, a localização topográfica do plantio e o período de troca das folhas do clone, influenciam na ocorrência da doença (Gasparotto *et al.*, 1997).

No Brasil, a Companhia Ford realizou os primeiros cruzamentos e seleções para a resistência do mal-das-folhas. Quando as plantações foram vendidas ao governo brasileiro em 1945, prosseguiram-se esses esforços entre os governos brasileiro e americano (Gonçalves *et al.*, 1983). O uso de clones resistentes e produtivos representa uma medida considerável de controle ao mal-das-folhas. Entretanto, a maior parte dos trabalhos efetuados não levaram em conta a resistência do germoplasma e a variabilidade fisiológica do patógeno. Diversos clones obtidos mostram-se suscetíveis ao *M. ulei*, pois podem

apresentar um comportamento diferente de uma localidade para outra (Gasparotto *et al.*, 1997). Além disso, a grande diversidade em virulência do *M. ulei* mostra sua elevada capacidade de adaptação e a dificuldade para se obter, no futuro, clones com resistência durável (Mattos *et al.*, 2003), inviabilizando este método de controle.

O uso de fungicidas tem sua eficiência comprovada para o controle do mal-das-folhas por vários autores (Santos & Pereira, 1985; Brignani Neto *et al.*, 1991) e existem vários produtos comerciais disponíveis. Entretanto, o custo elevado dos fungicidas torna-os inacessível aos pequenos e médios produtores (Junqueira *et al.*, 1985). Além disso, o uso indiscriminado desses produtos pode originar uma série de problemas, como o surgimento de linhagens resistentes, o que diminui a eficácia do tratamento (Azevedo, 1991).

O processo de enxertia-de-copa iniciou-se em 1916. Nesta técnica, enxerta-se um clone de copa altamente resistente sobre o tronco de um clone muito produtivo, com o intuito de promover a combinação entre resistência e produtividade. Geralmente a enxertia garante a estabilidade e a potencialidade no indivíduo propagado, mas são muitos os efeitos que os porta-enxertos desempenham sobre a parte aérea de várias plantas multiplicadas por enxertia, como a alteração no vigor dos clones e na produção de látex (Pereira, 1992).

Segundo Bettiol (2003), nas regiões úmidas (Amazônia, litoral sul da Bahia e São Paulo) o controle químico é economicamente inviável e a resistência e enxertia-de-copa são métodos de controle que ainda estão em estudo. Deste modo, não existe uma forma convencional adequada para o controle. Técnicas alternativas como o controle biológico, desenvolvidas e testadas pelas pesquisas, deverão ser utilizadas para o controle do mal-das-folhas.

## 5. Controle Biológico

O mal-das-folhas tem limitado a exploração da cultura da seringueira na América do Sul e representa uma séria ameaça aos seringais asiáticos. Existem alternativas adequadas de controle tanto a longo, quanto a curto prazo, que se colocadas em prática corretamente, podem minimizar os prejuízos causados pela doença (Bergamim-Filho, 1982; Gasparotto *et al.*, 1990).

Em sistemas agropecuários e agroflorestais, o uso do controle biológico como alternativa de controle de inúmeras doenças tem se tornado cada vez mais uma prática constante e de sucesso. Sua utilização vem promovendo a redução de aplicações de agrotóxicos, amenizando o problema de desenvolvimento de resistência de fungos à fungicidas e dos custos de produção, elevando a produtividade e preservando o meio ambiente. O biocontrole deve ser considerado como uma alternativa dentro de um programa geral de controle, apresentando uma maior eficiência como ferramenta associada a outros métodos. De acordo com Ghini (1991), a integração de métodos de controle de doenças de plantas permite a solução de problemas fitossanitários em condições economicamente viáveis, com menos riscos de fracasso e de contaminação.

“Controle biológico ou biocontrole é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem” (Bettiol, 1991).

Os componentes do controle biológico são patógeno, hospedeiro e antagonistas, interagindo num sistema biológico onde todos sofrem isolada ou conjuntamente influências do ambiente (Bettiol, 1991). Alguns dos mecanismos do controle biológico de patógenos de plantas são: competição, indução da defesa da planta e parasitismo (Driesch & Bellows Jr., 1996).

Inicialmente o controle biológico foi aplicado para controlar insetos, ácaros e ervas daninhas. Com o passar do tempo, seu emprego se tornou mais amplo e outros invertebrados, patógenos de plantas e mesmo alguns vertebrados, são considerados alvo (Parra *et al.*, 2002).

Em 1932, o fungo *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz [syn. *Trichoderma viride* (Pers)] foi observado parasitando fungos fitopatogênicos. Esse foi o primeiro relato do uso de fungos como agente de biocontrole de fungos patogênicos, induzindo um progresso em torno de pesquisas do uso de micoparasitas para esta finalidade (Adans, 1990).

O fungo *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & M.A. Curtis)] foi citado em trabalhos de Junqueira *et al.* (1989a), Junqueira & Gasparotto (1991), Gasparotto *et al.* (1997), Rodrigues (2002), Delmadi (2002), Tavares *et al.* (2004) e considerado promissor para o uso em programas de controle biológico do mal-das-folhas da seringueira.

Essa espécie de micoparasita já foi identificada em diferentes áreas geográficas do Brasil como no Acre, Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Pará e Rondônia em levantamento de sua ocorrência em áreas de cultivo da seringueira (Mello *et al.*, 2003) e São Paulo, parasitando lesões em jardim clonal de seringais do litoral Norte (Furtado & Trindade, 2005). Em outros países, foi verificada sua presença na Índia (Ananda & Sridhar, 2004). Isolados provenientes da França e Espanha foram utilizados em trabalhos de Tavares (2001), bem como isolados procedentes dos EUA por Mitchell *et al.* (1987). No Japão *D. pulvinata* foi relatado por Watanabe *et al.* (2003).

*D. pulvinata* é capaz de colonizar as lesões estromáticas causadas por *M. ulei*, destruindo tanto a fase ascógena como a conidial do patógeno e provocando a redução do

desfolhamento das plantas e da taxa de inóculo para reinfecções (Junqueira & Gasparotto, 1991).

Bettioli (2003), destaca que técnicas alternativas de controle do mal-das-folhas utilizando o controle biológico poderá ser a única forma capaz de controlar esta doença. As técnicas sugeridas utilizam o controle integrado, ou seja, a associação do controle biológico utilizando o fungo *D. pulvinata* com outros métodos de controle, como o controle cultural (enxertia-de-copa ou cultivos em consórcio com espécies florestais, frutíferas ou palmeiras) ou com a resistência genética através de cultivos policlonais geneticamente heterogêneos.

Em trabalho realizado por Junqueira *et al.* (1991), verificou-se que a pré-inoculação de *D. pulvinata* em clones de *Hevea* spp. posteriormente inoculados com isolados virulentos de *M. ulei*, causou pequenas lesões nas folhas da planta, confirmando que o micoparasita penetra nas folhas e ativa uma resposta de hipersensibilidade. A pré-inoculação não reduziu o número de lesões produzidas por área foliar, mas diminuiu drasticamente a produção de esporos por lesão e o tamanho das lesões em comparação ao controle.

Estudos morfológicos e moleculares têm sido realizados para a identificação e caracterização correta de isolados de *D. pulvinata*, entendendo assim, a relação patógeno e hospedeiro e explorando melhor o seu potencial. Os conidióforos apresentam coloração marrom escuro, apresentando ramificações primárias na porção superior do corpo. As células conidiogênicas são poliblasticas, simpodiais e denticuladas. Os conídios demonstram ser esféricos, asseptados com uma cicatriz basal, de coloração marrom oliváceo e solitário. Colônias de *D. pulvinata* variam de branco a cinza esverdeado aproximando-se do preto (Tavares *et al.*, 2004).

De acordo com Junqueira *et al.* (1989b) e Junqueira & Gasparotto (1991), *D. pulvinata* também é capaz de controlar outra doença da seringueira, denominada complexo-da-crosta-negra, causada por *Phyllachora uberi* (P. Henn) e *Rosenscheldiella hevea* (Jun & Bez), mesmo em clones altamente suscetíveis. A pulverização do micoparasita sobre os estromas desses patógenos em seringal adulto mostrou sua grande capacidade para colonizar e destruir os estromas desses fitopatógenos. *D. pulvinata* causa a redução do inóculo primário destes patógenos nos seringais, conseqüentemente causando a diminuição da incidência da doença (Junqueira & Bezerra, 1986).

*D. pulvinata* foi relatado como agente potencial de controle biológico de doenças de outras culturas. Ressalta-se seu uso para controle da mancha-tardia-foliar causada por *Cercosporidium personatum* (Berk. & M.A. Curtis.) Deighton [syn. *Phaeoisariopsis personata* (Berk. & M.A. Curtis.) v. Arx) em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) que representa grande interesse econômico nos trópicos semi-áridos da Ásia e da África (Mitchell *et al.*, 1986; kishore *et al.*, 2005). Vários isolados de *Cercosporidium* resistentes a fungicidas têm sido relatados. Portanto, o uso de *D. pulvinata* apresenta-se como uma alternativa aos métodos convencionais de controle (Taber *et al.*, 1981). Segundo Mitchell *et al.* (1987), conidióforos e conídios de *C. personatum* colonizados por *D. pulvinata* mostram-se totalmente destruídos, além disso, os conídios que escapam do parasitismo ficam presos ao micélio do micoparasita e não conseguem se dispersar para iniciar novas infecções.

O potencial de *D. pulvinata* foi observado, também, para uma doença do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), onde as lesões de *Cladosporium fulvum* Cooke [syn. *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri] apresentavam-se recobertas pelas estruturas do micoparasita, que emite apressórios de penetração (Tirilly, 1991; Peresse & Picard, 1980).

Provavelmente, a eficiência do biocontrole está correlacionada com o potencial antagonico e a secreção de enzimas pelo parasita. Queiroz *et al.* (2002), desenvolveram um estudo visando à análise de enzimas micolíticas secretadas por *D. pulvinata*, revelando a presença de atividades enzimáticas relacionadas ao micoparasitismo.

Existem na literatura inúmeros relatos sobre a secreção de antibióticos por diferentes micoparasitas. O metabólito fungistático deoxyphomeone (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>) foi isolado de culturas de *D. pulvinata* em regiões apicais de contato com *C. fulvum*, promovendo neste uma disfunção celular e por conseqüência a inibição em seu crescimento (Tirilly *et al.*, 1991). Este seria outro mecanismo de ação antagonista.

Uma grande vantagem do controle biológico é que ele permite o uso de misturas de diferentes agentes de biocontrole o que possibilita solucionar vários problemas simultaneamente. *D. pulvinata* admite a mistura com *Sporothrix insectorum* (Hoog & C. H. Evans) e *Hirsutella verticillioides* (Charles) controlando o mal-das-folhas, a mosca-de-renda e ácaro em seringueiras respectivamente. Está prática já está sendo adotada por produtores de São José do Rio Claro, MT (Bettioli, 2003). Sua eficiência também já foi testada em mistura com *Cylindrosporium concentricum* (Grev.) para controle da crosta-negra da seringueira (Junqueira & Gasparotto, 1991).

O trabalho desenvolvido teve como objetivo avaliar as condições apropriadas de produção e armazenamento de *D. pulvinata*, bem como a eficiência de linhagens deste fungo no controle biológico de *M. ulei* sob condições de campo e o efeito de agrotóxicos e adjuvantes no crescimento e esporulação do mesmo. Finalmente, devido às implicações da estabilidade no uso de *D. pulvinata*, analisar variações de linhagens deste fungo durante repicagens sucessivas utilizando técnicas moleculares (RAPD e RFLP).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 28: 59-72. 1990.
- AGRIFANUAL 2006. Anuário da Agricultura Brasileira. Seringueira. AGRA FNP. 2006. pp. 428-432.
- ANANDA, K. & SRIDHAR, K.R. Diversity of filamentous fungi on decomposing leaf and wood litter of mangrove forests in the southwest coast of India. *Current Science* 87: 1431-1437. 2004.
- AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 237-251.
- BERGAMIM FILHO, A. Alternativas para o controle do mal-das-folhas da seringueira: uma revisão. *Summa Phytopathologica* 8: 65-74. 1982.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 1-5.
- BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Ed.) Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp.191-215.
- BRIGNANI NETO, F., FURTADO, E.L., CARDOSO, R.M.G., OLIVEIRA, D.A. & ROLIM, P.R.R. Efeito de fungicidas sistêmicos no ciclo biológico de *Microcyclus ulei*, agente causal da queima da folha da seringueira (*Hevea* spp.). *Summa Phytopathologica* 17: 238-246. 1991.
- CAMARGO, A.P., CARDOSO, R.M.G. & SCHMIDT, N.C. Comportamento e ecologia do mal-das-folhas da seringueira nas condições do planalto paulista. *Bragantia* 26: 1-8. 1967.
- DEAN, W. A luta pela borracha no Brasil. São Paulo. Nobel. 1989.
- DELMADI, L.C. Avaliação do potencial de uso do hiperparasita *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) no controle biológico do mal-das-folhas [*Microcyclus ulei* (P. Henn v. Arx.) de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss) Muell. Arg] em São José do Rio Claro - MT. (Dissertação de Mestrado). Mato Grosso. Universidade Federal do Mato Grosso. 2002.
- DRIESCHE, R.G.V. & BELLOWS JR. T. S. Biological control. United States of America. Chapman & Hall. 1996.

DUTRA, R.M.M., NEVES, M.A.C. & WISNIEWSKI, A. Bibliografia de tecnologia do látex e da borracha de seringueira. Brasília. Embrapa - CNPSD. 1988.

FURTADO, E.L. & TRINDADE, D.R. Doenças da seringueira (*Hevea* spp.). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamim Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Ed) Manual de Fitopatologia - Doenças de plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp.559-567.

GASPAROTTO, L., TRINDADE, D.R. & SILVA, H.M. Doenças da Seringueira. Manaus. Embrapa – CNPSD. 1984.

GASPAROTTO, L., ZAMBOLIM, L., MAFFIA, L.A., VALE, F.X.R. & JUNQUEIRA, N.T.V. Efeito da temperatura e umidade sobre a infecção de seringueira (*Hevea* spp.) por *Microcyclus ulei*. Fitopatologia Brasileira 14: 38-41. 1989.

GASPAROTTO, L., FERREIRA, F. A., LIMA, M.I.P.M., PEREIRA, J.C.R. & SANTOS, A.F. Enfermidades da Seringueira no Brasil. Manaus. Embrapa – CPAA. 1990. pp. 1-169 (Circular Técnica, 3).

GASPAROTTO, L. & JUNQUEIRA, N.T.V. Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*, causal agent of rubber tree leaf blight. Fitopatologia Brasileira 19:22-28. 1994.

GASPAROTTO, L., SANTOS, A.F., PEREIRA, J.C.R. & FERREIRA, F.A. Doenças da Seringueira no Brasil. Brasília. Embrapa - SPI. 1997.

GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. In: Bettioli, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 201-217.

GOMES, J.I. & ALBUQUERQUE, J.M. Características botânicas do gênero *Hevea*. In: Viégas, I.J.M. & Carvalho, J.G. (Ed) Seringueira: Nutrição e Adubação no Brasil. Brasília. Embrapa. 2000. pp.17-34.

GONÇALVES, P.S., PAIVA, J.R.A. & SOUZA, R.A. Retrospectiva e atualidades do melhoramento genético da seringueira (*Hevea* spp.) no Brasil e em países asiáticos. Manaus. Embrapa - CNPSD. 1983.

HALLÉ, F., OLDEMAN, R.A. & TOMLINSON, P.B. Tropical trees and forest. Berling: Springer – Verlag. 1978.

HOMMA, A.K.O. História da Agricultura na Amazônia: da era pré-colombiana ao terceiro milênio. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V., CHAVES, G.M., ZAMBOLIM, L. ROMEIRO, R.S. & GASPAROTTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. Revista Ceres 31(177): 322-331. 1984.

JUNQUEIRA, N.T.V., ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Resistência de clones de seringueira ao mal-das-folhas. Belo Horizonte. Informe Agropecuário - EPAMIG. 1985. pp. 42- 44.

JUNQUEIRA, N.T.V. & BEZERRA, J.L. Ocorrência e controle de nova doença fúngica em seringais de cultivo no estado do Amazonas. Embrapa - CNPSD. 1986. pp.1-3 (Comunicado Técnico 54).

JUNQUEIRA, N.T.V., ALFENAS, A.C., CHAVES, G.M., ZAMBOLIM, L. & GASPAROTTO, L. Variabilidade isoenzimática de isolados de *Microcyclus ulei* com diferentes níveis de virulência. Fitopatologia Brasileira 12: 208-214. 1987.

JUNQUEIRA, N.T.V., GASPAROTTO, L., LIMA, M.I.P.M., LIEBEREI, R. & NORMANDO, M.C.S. Potencial do fungo *Hansfordia pulvinata* no controle biológico do mal-das-folhas da seringueira. Resumos, 271. Fitopatologia Brasileira 14:158. 1989a.

JUNQUEIRA, N.T.V., LIMA, M.I.P.M, GASPAROTTO, L., LIEBEREI, R. & NORMANDO, M.C.S. Controle Biológico do complexo da crosta negra da seringueira. Resumos, 272. Fitopatologia Brasileira 14: 158.1989b.

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. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 307-331.

JUNQUEIRA, N.T.V., MEVENKAMP, G., LIEBEREI, R. & NORMANDO, M.C.S. Resistance activation in rubber tree (*Hevea* spp.) to leaf blight (*Microcyclus ulei*) by non- and weakly-pathogenic fungi. Fitopatologia Brasileira 16: 268-271. 1991.

KISHORE, G.K., PANDE, S. & PODILE, A.R. Management of late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogae*) with chlorothalonil-tolerant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Plant Pathology 54: 401-408. 2005.

MATHIAS FILHO, W.P. & CARMO, C.A.F.S. Sangria e armazenamento do látex. Belo Horizonte. Informe Agropecuário - EPAMIG. 1985. pp. 58- 60.

MATTOS, C.R.R., GARCIA, D., PINARD, F. & GUEN, V.L. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia. Fitopatologia Brasileira 28: 502-507. 2003.

MELLO, S.C.M., SANTOS, M.F., GANGANA, F. & KOSOSKI, R. Isolados de *Dicyma pulvinata* obtidos em um levantamento realizado em seringais brasileiros. Brasília. Embrapa - CENARGEN. 2003. pp.1-4 (Comunicado Técnico 81).

MELLO, S.C.M., FRAZÃO, H.S. & SILVA, J.B.T. Capacidade germinativa e infectiva de isolados de *Dicyma pulvinata* antagonicos a *Microcyclus ulei* mantidos em coleção de cultura. Agrociência 9: 421-426. 2005.

- MITCHELL, J.K., TABER, R.A. & PETTIT, R.E. Establishment of *Dicyma pulvinata* in *Cercosporidium personatum* leaf spot peanuts: effect of spray formulation, inoculation time and hours of leaf wetness. *Phytopathology* 76: 1168-1171. 1986.
- 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* 65: 2263-2269. 1987.
- MORAES, E. Melhoramento Genético da Seringueira. Manaus. Embrapa - CNPSA. 1989.
- ORTOLANI, A.A. Aptidão climática para cultura da seringueira em Minas Gerais. Belo Horizonte. Informe Agropecuário - EPAMIG. 1985. pp. 8- 12.
- PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORRÊA-FERREIRA, B.S. & BENTO, J.M. Controle biológico: terminologia. In: Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S. & Bento, J.M. (Ed.) Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. pp.1-16.
- PEREIRA, J.P. Seringueira: formação de mudas, manejo e perspectivas no Noroeste do Paraná. Instituto agrônômico do Paraná. 1992. pp. 1-60. (Circular, 70).
- PERESSE, M. & PICARD, D.L.E. *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. *Mycopathologia* 71: 23-30. 1980.
- QUEIROZ, P.R., LAGO, W.N.M., MATOS, R.A.C., LIMA, L.H.C. & MELLO, S.C.M. Métodos para indução e análise de enzimas micolíticas secretadas por *Dicyma pulvinata*. Brasília. EMBRAPA - CENARGEN. 2002. pp. 1-6. (Circular Técnica 17).
- RODRIGUES, M.A. 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 e Curt)] in vitro. (Dissertação de Mestrado). Mato Grosso. Universidade Federal do Mato Grosso. 2002.
- SAMBUGARO, R. Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (*Hevea* spp.) visando resistência ao *Microcyclus ulei*. (Dissertação de Mestrado). Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. 2003.
- SANTOS, A.F & PEREIRA, J.C.R. Eficiência de fungicidas no controle de *Microcyclus ulei* in vitro e in vivo. *Revista Theobroma* 15: 185-190.1985.
- TABER, R.A., PETTIT, R.E., MCGEE, R.E. & SMITH, D.H. Potential for biological control of *Cercosporidium* leafspot of peanuts by *Hansfordia*. Abstract. *Phytopathology* 71: 260. 1981.
- TANZINI, M.R. Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomatopatogênicos. (Tese de Doutorado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2002.

TAVARES, E.T. Variabilidade genética de isolados do micoparasita *Dicyma pulvinata* obtidos em lesões provocadas por *Microcyclus ulei* nos seringais brasileiros. (Dissertação de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 2001.

TAVARES, E.T., TIGANO, M.S., MELLO, S.C.M., MARTINS, I. & CORDEIRO, D.M.T. Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. Fitopatologia Brasileira 29:148-154. 2004.

TIRILLY, Y. The role of fosetyl-al in the potential integrated control of *Fulvia fulva*. Canadian Journal of Botany 69:306-309. 1991.

TIRILLY, L., LAMBERT, F. & THOUVENOT, D. Bioproduction of [14C] deoxyphomeonone, a fungistatic metabolite of the hyperparasite *Dicyma pulvinata*. Phytochemistry 30: 3963-3965. 1991.

VIÉGAS, I.J.M. & CARVALHO, J.G. Seringueira: Nutrição e Adubação no Brasil. Brasília. Embrapa. 2000.

VIEIRA, L.S. & GAMA, J.R.N.F. Solos e plantio da seringueira. In: Viégas, I.J.M. & Carvalho, J.G. (Ed.) Seringueira: Nutrição e Adubação no Brasil. Brasília. Embrapa. 2000. pp.63-76.

ZAMBOLIM, L., JUNQUEIRA, N.T.V. & CHAVES, G.M. Doenças que incidem sobre a seringueira em Minas Gerais. Belo Horizonte. Informe Agropecuário - EPAMIG. 1985. pp. 36-42.

WATANABE, T., KAWANO, Y. & NAKAMURA, K. New records of *Ardhachandra*, *Dicyma* and *Sibirina* species from basidiomata of Aphyllophorales (Basidiomycetes) in Japan. Mycoscience 44: 411-414. 2003.

WEBSTER, C.C. & PAARDEKOOOPER, E.C. The botany of rubber tree In: Webster, C.C. & Baulkill, W. J. (Ed.) Rubber. London. Longman Group UK Limited. 1989. pp.57-84.

## **CAPÍTULO 2**

---

---

### **Estudos sobre as condições de produção e armazenamento de *Dicyma pulvinata***

#### **INTRODUÇÃO**

Os estudos de fungos utilizados no controle biológico têm avançado bastante, demonstrando que a quantidade e a qualidade do propágulo produzido podem ser dependentes de diferentes fatores, tais como: isolado do fungo utilizado, substrato e meio de cultura selecionados para o cultivo, nutrientes e proporção dos mesmos na produção, dentre outros (Leite *et al.*, 2003). A produção de inóculo viável a baixo custo é um importante requisito para o desenvolvimento de programas de controle biológico.

A produção em escala industrial de fungos agentes de controle biológico representa uma etapa crítica e limitante no desenvolvimento do controle microbiano de doenças de plantas. A pesquisa de novas metodologias para os sistemas de produção é muito importante, tornando o biocontrole economicamente viável e possível de utilização em grandes áreas. Assim, o conhecimento do efeito de certos fatores ambientais que poderão favorecer ou prejudicar a reprodução e a patogenicidade, tais como, temperatura, regime de iluminação e composições de meios de cultura, é indispensável para a obtenção de um melhor desempenho dos microrganismos que serão utilizados como agente de biocontrole (Allen *et al.*, 1983; Olufolaji, 1984).

Existem diferentes argumentos sobre o regime de luz no cultivo de fungos. Para alguns autores, a luminosidade é requerida para a formação de vários tipos de estruturas

reprodutivas e está diretamente ligada à composição do meio de cultura através de reações enzimáticas (Barbosa *et al.*, 2002). Outros autores propõem que a luz não tem efeito direto no desenvolvimento da maioria dos fungos, embora alguns sejam afetados pela luminosidade, de acordo com o tipo de substrato utilizado (Gurgel *et al.*, 2002).

A dificuldade de acesso fácil a nutrientes é uma característica comum de habitats naturais de diversos microrganismos, especialmente os que vivem no solo e em superfícies de plantas. Os nutrientes têm uma influência direta no crescimento e morfogênese de fungos, além disso, também influenciam indiretamente na atividade antagonística dos microrganismos (Celar, 2003).

A baixa capacidade para crescer ou esporular em meios de cultura ou substratos artificiais de baixo custo tem representado um dos principais fatores que vem limitando o uso de *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & Curtis)] para controle biológico de fungos estromáticos (Junqueira & Gasparotto, 1991).

Um produto biológico deve ser formulado ou preparado visando o seu armazenamento, de preferência em temperatura ambiente e ter um período longo de vida de prateleira (Leite *et al.*, 2003) fatores que levam a necessidade de ensaios relacionados a secagem e armazenamento.

Um fator limitante na comercialização de produtos biológicos vem sendo a falta de formulações adequadas e a escassez no desenvolvimento de técnicas de produção em larga escala. Biodac, nome comercial de um complexo de celulose, constituído de fibra de papel (47-53 %), kaolin (28-34 %), carbonato de cálcio (14-20 %) e dióxido de titânio (não mais que 1 %), vem sendo utilizado como carreador de microrganismos no solo. Possui grande capacidade de absorção de líquidos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Essa propriedade é importante na distribuição dos microrganismos nos grânulos de Biodac e na absorção do

substrato, o que provavelmente favorece o crescimento de bactérias e fungos (Ilyna *et al.*, 2000). Esse produto tem sido testado em formulações com agentes de controle biológico no desenvolvimento de sistemas viáveis e eficientes para a aplicação apropriada de microrganismos (Lewis *et al.*, 1998).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de substratos, dos métodos de produção, regimes de luz, temperatura e das fontes nutricionais no crescimento e esporulação de *D. pulvinata*. Além disso, o trabalho também visa o estudo da secagem, germinação e armazenamento de esporos deste fungo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Núcleo Temático de Controle Biológico (NTCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando as linhagens de *D. pulvinata*, CEN 58 (CG 679), CEN 62 (CG 683), CEN 91 (CG 772) e CEN 93 (CG 774) procedentes de Ouro Preto (RO), Belém (PA), Ituberá (BA) e Ponte de Lacerda (MT), respectivamente. Estas linhagens são pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Plantas Daninhas e Fitopatógenos da Unidade, sendo que os números entre parênteses referem-se aos antigos códigos de acessos da coleção. A recuperação das colônias, mantidas em meio BDA (Batata 200g.l<sup>-1</sup>; Dextrose, 20g.l<sup>-1</sup>; Agar, 20g.l<sup>-1</sup>) em tubos inclinados e sob refrigeração, ocorreu no mesmo meio, a 25 °C.

Salvos os casos especificados, em todos os ensaios as colônias foram incubadas a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. O fotoperíodo foi simulado por meio de quatro lâmpadas fluorescentes de 20 W, luz do dia, instaladas na porta da BOD (Nova Técnica, modelo NT 708 – AT), onde foram mantidas as culturas em placas de Petri. Quando o cultivo ocorreu em substratos sólidos, a iluminação na sala de incubação foi obtida por meio de lâmpadas fluorescentes de 22 W instaladas ao longo de prateleiras distantes 30 cm entre si, fornecendo uma luminosidade média de 1.063 lux. O ambiente escuro foi atingido por luminosidade máxima de 10 lux. Para produção de micélio em meio líquido, a incubação ocorreu em agitador orbital (Lab-line incubator-shaker modelo NT 711), a 150 rpm e 25 °C, por sete dias. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso e os resultados, submetidos à análise de variância, seguida de comparação das médias, pelo teste de Tukey a 0,05.

### **1) Seleção de substrato sólido para esporulação de *Dicyma pulvinata***

Com o intuito de selecionar um substrato sólido que promovesse uma maior produção de esporos de *D. pulvinata* foram avaliados: arroz parboilizado, arroz comum, milho, quirela de milho, trigo e palha de arroz.

Para o substrato à base de palha de arroz, 8 g da mesma foram umedecidas com 15 ml de caldo resultante do cozimento de batata (200 g.l<sup>-1</sup>). Em relação aos outros substratos, 25 g de cada foram pesados e umedecidos com 15 ml de água destilada. Estes valores foram estabelecidos com base em testes realizados anteriormente ao experimento para ajustar as melhores quantidades de água e de caldo de batata. Os substratos foram colocados em frascos do tipo erlenmeyer de 250 ml de capacidade, fechados com tampão de algodão e autoclavados a 120 °C, durante 20 minutos.

Para a preparação do inóculo, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA. Após 10 dias de crescimento, discos de colônia (9 mm de diâmetro) foram transferidos para os erlenmeyers (4 discos/frasco) e homogeneizados ao substrato por agitação manual. Após 17 dias de incubação, realizaram-se as avaliações, a partir de uma suspensão de esporos obtida pela adição de 100 ml de Tween 80 a 0,05 % em cada frasco. Desta suspensão homogeneizada, tomaram-se alíquotas para observação sob lente de 40 X, com o auxílio de câmara de Neubauer. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial, com seis substratos e quatro linhagens.

### **2) Comparação de métodos de produção de esporos de *Dicyma pulvinata***

Com a finalidade de avaliar diferentes sistemas de produção do fungo em termos de rendimento de esporos, foi montado um ensaio como a seguir:

- 1) Método de produção em bandejas - As bandejas, retangulares de alumínio com 30 cm de largura, 44 cm de comprimento e 4,5 cm de altura recobertas por sacos plásticos autoclaváveis, cujas aberturas foram dobradas e grampeadas, receberam 500 g de arroz parboilizado.
- 2) Método de produção em sacos de polipropileno - Sacos medindo 28 cm de largura e 42 cm de comprimento, fechados com auxílio de grampeador, receberam 200 g de arroz parboilizado.
- 3) Método de produção em erlenmeyers – Os frascos erlenmeyers de 2000 ml de capacidade, vedados com tampão de algodão, receberam 250 g de arroz parboilizado.

O arroz foi previamente umedecido com 60 % (P/V) de água destilada, deixado secar por aproximadamente 30 minutos para a absorção da água e, então, esterilizado em autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, procedeu-se à inoculação dos substratos com micélio das quatro linhagens citadas anteriormente. O inóculo foi produzido em meio líquido SDY (peptona 10g.l<sup>-1</sup>; dextrose 40g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura 10g.l<sup>-1</sup>). Para tanto, cinco discos de micélio (9mm de diâmetro) oriundos de culturas com 10 dias de idade, desenvolvidas em meio BDA, foram transferidos para o meio SDY, incubando-se à 150 rpm e 25 °C, durante 7 dias. Foram inoculados 10 % (P/V) de micélio para cada um dos métodos.

Após 17 dias de incubação, amostras de 5 g de arroz colonizado foram retiradas ao acaso, de cada recipiente. Preparou-se uma suspensão, adicionando-se 30 ml de Tween 80 à 0,05 % a qual foi submetida a agitação para liberação dos conídios e homogeneização da amostra. Foram utilizadas três alíquotas de cada amostra, para contagem em câmara de Neubauer.

### **3) Influência do fotoperíodo no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata***

Para verificar o efeito do regime de luz na produção do fungo, dois experimentos foram conduzidos com quatro fotoperíodos (0, 6, 12 e 24 horas de iluminação) para as quatro linhagens do fungo, utilizando duas formas de cultivo: em meio BDA e em arroz parboilizado.

No primeiro experimento, discos de 9 mm de diâmetro retirados de colônias com 10 dias de idade, incubadas a 25 °C em fotoperíodo de 12 horas, foram depositados no centro de placas de Petri contendo o meio BDA, com o micélio voltado para baixo.

No segundo experimento, utilizaram-se frascos erlenmeyers de 250 ml de capacidade contendo 25 g de arroz parboilizado. Este substrato, previamente umedecido com água destilada (60 % P/V) e autoclavados a 120 °C durante 20 minutos, foi inoculado com quatro discos de 9 mm de diâmetro por frasco, retirados das mesmas culturas. As placas e frascos, após inoculação, foram incubados a 25 °C, nos referidos fotoperíodos.

Foram realizadas quatro repetições por tratamento, em sistema fatorial, para cada experimento. Para avaliação do crescimento micelial, foram tomadas medidas do diâmetro das colônias desenvolvidas em meio BDA, aos 4, 8, 12 e 16 dias de incubação. As medidas dos diâmetros foram tomadas em duas linhas perpendiculares, passando pelo centro da placa, com auxílio de uma régua milimetrada. A esporulação, tanto em BDA como no arroz parboilizado, foi avaliada aos 17 dias após inoculação com adição de Tween 80 à 0,05%. Em BDA adicionou-se 10 ml, e procedeu-se raspagem das colônias com a alça de Drigalski e em arroz acrescentou-se 100 ml e as amostras foram submetidas a homogeneização para liberar dos conídios. Foram retiradas alíquotas para contagem de esporos em câmara de Neubauer.

#### **4) Crescimento, esporulação e germinação de *Dicyma pulvinata* sob diferentes temperaturas**

Este ensaio teve como objetivo determinar a temperatura mais adequada para crescimento, esporulação e germinação de *D. pulvinata*, em meio BDA e em arroz parboilizado. Utilizaram-se os mesmos processos de inoculação e avaliação descritos para o experimento anterior, à exceção do período adotado para determinação do crescimento micelial que foi de 16 dias após a inoculação. O fungo foi incubado a 19, 22, 25, 28 e 31°C, nas incubadoras anteriormente especificadas, mantendo-se o regime de 12 horas de luz/ 12 escuro.

Na avaliação da germinação, aos 17 dias de crescimento, foram preparadas as suspensões, plaqueadas em meio ágar-água e incubadas por 16 horas, nas mesmas temperaturas referidas anteriormente. Foram realizadas quatro repetições por tratamento. A germinação foi avaliada pela contagem de 100 conídios de cada uma das repetições, visualizados em campo microscópico aleatoriamente escolhidos. Consideraram-se germinados, os conídios com tubo germinativo maior ou igual o seu diâmetro.

#### **5) Uso de fontes de carbono para a esporulação de *Dicyma pulvinata***

Foi avaliado o efeito de diferentes fontes de carbono na esporulação das linhagens de *D. pulvinata*, tanto em meio de cultura Batata-Ágar (BA - 200 g.l<sup>-1</sup> de batata, 20 g.l<sup>-1</sup> de agar), em placas de Petri, como adicionadas ao arroz parboilizado. As fontes utilizadas foram: glicose, galactose, sacarose, maltose e amido.

Discos de 9 mm de diâmetro retirados de colônias com 10 dias de idade foram utilizados como inóculo. Esses discos foram colocados no centro de placas de Petri (1/placa), contendo 25 ml dos meios preparados a partir de BA, os quais foram

suplementados com as fontes de carbono ( $20 \text{ g.l}^{-1}$ ). Como testemunha, foi usado o meio sem adição de nenhum dos suplementos. Determinou-se o crescimento micelial por meio das medidas de diâmetro de colônias tomadas aos 16 dias de cultivo.

No experimento com arroz parboilizado, cada erlenmeyer de 125 ml de capacidade, contendo 12,5 g de arroz recebeu uma suspensão preparada com 7,5 ml de água destilada acrescida das fontes de carbono, específica para cada tratamento, na proporção de  $20 \text{ g.l}^{-1}$ . A testemunha consistiu de arroz parboilizado umedecido somente com 7,5 ml de água destilada. Estes frascos foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para a inoculação, foram usados dois discos de cultura para cada frasco.

A esporulação foi avaliada em ambos experimentos, aos 17 dias de cultivo. Adotou-se o modulo fatorial (linhagens x fontes de carbono) para as análises estatísticas.

#### **6) Efeito de fontes de nitrogênio na esporulação de *Dicyma pulvinata*, em arroz parboilizado**

Para verificar o efeito de fontes de nitrogênio na esporulação de *D. pulvinata* utilizou-se os seguintes tratamentos: nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), sulfato de amônio ( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e fosfato de amônio ( $\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , na concentração de  $20 \text{ g.l}^{-1}$

Os procedimentos para preparo do substrato, inoculação e incubação foram os mesmos descritos no experimento anterior. Avaliou-se o número de esporos. $\text{g}^{-1}$  de substrato, aos 17 dias de cultivo. Da mesma forma que no experimento anterior, adotou-se o modelo fatorial (linhagens x fontes de nitrogênio) para as análises estatísticas.

### **7) Efeito da secagem na germinação de *Dicyma pulvinata***

O fungo foi cultivado em erlenmeyers de 2000 ml de capacidade, contendo 250 gramas de arroz parboilizado, previamente umedecidos com 150 ml de água destilada e autoclavados a 120 °C durante 20 minutos. Como inóculo, utilizaram-se 25 ml de micélio produzido em meio líquido SDY como descrito anteriormente.

Para avaliar se a secagem do fungo interferia em sua viabilidade, após 17 dias de crescimento, retiraram-se 13 amostras de 10 gramas cada, do fungo mais arroz parboilizado, para cada uma das linhagens. Destas, seis amostras foram colocadas em estufa a 100 °C durante 72 horas para a determinação do teor de água e as outras setes foram colocadas em dessecador (contendo solução de NaOH que mantinha a umidade interna em 4 %). Destas últimas, seis foram pesadas diariamente até atingirem peso constante, verificando a porcentagem de água retirada. Da amostra restante, tomou-se uma alíquota, da qual foi preparada a suspensão a ser plaqueada em meio ágar-água, para avaliar a porcentagem de esporos germinados, diariamente, durante o processo de secagem.

### **8) Germinação de conídios de *Dicyma pulvinata***

Este ensaio foi conduzido com o intuito de analisar o período necessário para a obtenção de mais de 90 % de esporos germinados e se existe diferença deste período entre as linhagens.

O fungo foi produzido em erlenmeyers de 125 ml de capacidade contendo 12,5 gramas de arroz parboilizado, umedecidos com 60 % P/V de água destilada e autoclavados a 120 °C por 20 minutos. A inoculação em cada frasco foi realizada com dois discos (9 mm de diâmetro) de cultura com 10 dias de idade, desenvolvida em meio BDA.

Após 17 dias de cultivo, preparou-se a suspensão fúngica na concentração de  $10^6$  esporos.ml<sup>-1</sup>, a qual foi plaqueada em meio ágar-água e incubada a 25 °C. A avaliação procedeu-se de hora em hora. A germinação foi interrompida pela adição de formaldeído 3,5 %. Em seguida, cobriu-se a amostra com uma lamínula, para visualização sob lente de aumento (40 x). Foram examinados 100 conídios de cada uma das repetições, em cada hora, tomados aleatoriamente, no campo microscópico. Consideraram-se germinados os conídios com tubos germinativos maior, ou igual, a sua menor dimensão.

### **9) Armazenamento de *Dicyma pulvinata***

Cada uma das linhagens de *D. pulvinata* foi produzida em frascos erlenmeyers com 2000 ml de capacidade, contendo 250 g de arroz parboilizado umedecidos com 60 % P/V de água destilada. Os frascos foram vedados com tampão de algodão e autoclavados durante 20 minutos à temperatura de 120 °C.

Utilizaram-se, como inóculo, 25 ml de micélio produzidos em meio SDY sob agitação. Após inoculação, os frascos foram incubados em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 17 dias, após o que realizaram três experimentos para testar a viabilidade do fungo armazenado:

#### **9.1) Armazenamento de *D. pulvinata* fresco, em temperatura de 4 °C**

Amostras de arroz parboilizado colonizados por *D. pulvinata* (aproximadamente 5 gramas) foram armazenadas imediatamente após coleta em tubos “falcon” de 50 ml de capacidade à 4 °C. Avaliou-se a germinação, inicialmente, após 17 dias e, posteriormente, a cada 7 dias, até o 28 ° dia de armazenamento.

### **9.2) Armazenamento de *D. pulvinata* após secagem em dessecador**

Amostras de cerca de 10 gramas de arroz parboilizado + fungo, foram depositadas em placas de Petri e colocadas em dessecador, cuja umidade interna foi mantida em 4 %, por meio de solução de NaOH. Após 72 horas, as amostras foram empacotadas em sacos metálicos e armazenadas sob duas temperaturas (4 e 25 °C). As avaliações procederam-se imediatamente após a retirada do dessecador e aos 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

### **9.3) Armazenamento de *D. pulvinata* em suspensão**

Este ensaio foi realizado com intuito de verificar se é possível preparar uma suspensão de *D. pulvinata* e guardá-la, mantendo a viabilidade dos esporos. De amostras de 5 gramas de fungo mais arroz, preparou-se uma suspensão com 30 ml de Tween 80 a 0,05 %. Essas amostras foram colocadas em tubos “falcon” de 50 ml de capacidade e guardadas à temperatura de 4 °C. As avaliações foram realizadas por meio de teste de germinação em ágar-água antes do fungo ser estocado e aos 5, 10 e 30 dias de armazenamento.

Para determinar a germinação nos experimentos 9.1 e 9.2 retirava-se, das amostras armazenadas, uma pequena alíquota, das quais se prepararam suspensões de aproximadamente  $10^6$  esporos.ml<sup>-1</sup> para plaqueamento em meio ágar-água. No experimento 9.3 as próprias suspensões foram plaqueadas. As incubações transcorreram por 16 horas, sendo a germinação avaliada pela contagem de 100 conídios de cada repetição visualizados aleatoriamente ao microscópio. Consideraram-se germinados, os conídios com tubos germinativos maior, ou igual, à sua menor dimensão.

## **10) Uso de Biodac em substrato para o cultivo de *Dicyma pulvinata***

Este ensaio foi realizado com o objetivo de testar o produto constituído de grânulos absorventes composto de um complexo de celulose resultantes de resíduos de papel

industrial, comercialmente conhecido como Biodac, no suporte para o crescimento das 4 linhagens de *D. pulvinata* utilizadas nos experimentos anteriores.

Frascos erlenmeyer de 125 ml de capacidade, contendo 25 g de Biodac puro foram autoclavados a 120 °C por uma hora e adicionados aos meios:

- 1) 12,5 ml do meio SDY (peptona 10g.l<sup>-1</sup>; dextrose 40g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura 10g.l<sup>-1</sup>) previamente autoclavados por 20 minutos a 120 °C.
- 2) 12,5 ml do meio FMC (fermento de padaria 10g.l<sup>-1</sup>; melão de cana 15g.l<sup>-1</sup>) autoclavados duas vezes a 120 °C por 1 hora, conforme Pomella\*.

Os meios constituíram dois diferentes tratamentos. Após a mistura de Biodac nos diferentes meios, seguiu-se nova autoclavagem de 1 hora, seguida de inoculação com 2,5 ml de micélio. Esse inóculo à base de micélio foi produzido no meio SDY sob agitação a 150 rpm. Os frascos, após inoculação, foram incubados nas mesmas condições descritas para os ensaios anteriores.

Após 17 dias de inoculação, o substrato contendo o fungo foi misturado a 100 ml de Tween 80 a 0,05 % e, a partir dessa suspensão, prepararam-se 3 diluições seriadas. Da última, retirou-se uma alíquota de 0,03 ml para plaqueamento em meio BDA, procedendo-se as avaliações, em termos de unidades formadoras de colônias por grama de substrato (UFC.g<sup>-1</sup>). O restante do material foi armazenado em geladeira durante 21 dias e, então, novamente avaliado quanto à viabilidade.

Para constatar a esporulação após crescimento em Biodac, as colônias desenvolvidas em BDA permaneceram incubadas à 25 °C até completar 17 dias. Foram preparadas amostras colocando-se 20 ml de Tween 80 à 0,05% nas placas, da qual

---

\* POMELLA, A. (CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Ilhéus -BA) Informação pessoal, 2005.

procedeu-se a raspagem das colônias e homogeneização dos esporos com alça de Drigalski para contagem da quantidade de esporos.ml<sup>-1</sup> em cada placa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1) Seleção de substrato sólido para esporulação de *Dicyma pulvinata*

De modo geral, todos os substratos propiciaram o cultivo do fungo, independente da linhagem utilizada. Entretanto, a produção de esporos foi superior quando em arroz parboilizado. A linhagem CEN 93 foi a que apresentou os maiores valores de produção de esporos por grama de substrato. Observou-se menor esporulação quando a palha de arroz foi utilizada como substrato, embora acrescida de caldo de batata (Tabela 1).

**Tabela 1.** Substratos sólidos para esporulação de linhagens de *Dicyma pulvinata*.

Substratos	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
Arroz parboilizado	5,153 Ab*	4,795 Ab	3,598 Ac	7,774 Aa
Arroz comum	3,844 Bb	3,091 Bc	2,593 Bc	6,1128 Ba
Milho	3,112 BCb	2,583 BCb	2,509 Bb	5,081 Ca
Quirela de milho	2,394 CDb	2,034 Cb	2,048 Bb	3,1373 Da
Trigo	2,212 DEb	1,868 Cb	1,816 Bb	2,915 Da
Palha	1,507 Ea	0,993 Da	0,8927 Ca	1,301 Ea

CV= 12,31

\*Esporulação média (x 10<sup>6</sup> esporos.g<sup>-1</sup> de substrato). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados por SQRT (x + 0,5). Letras maiúsculas comparam as médias no sentido vertical e letras minúsculas comparam as médias no sentido horizontal.

Os fungos antagonistas devem ser facilmente cultivados em meios disponíveis e não ser exigentes em seus requerimentos nutricionais, possibilitando que grandes quantidades de inóculo possam ser preparados (Wood & Tveit, 1955). Com a finalidade de se obter a produção de conídios de fungos em larga escala, tem se utilizado produtos vegetais de baixo custo, especialmente grão de arroz (Leite *et al.*, 2003). Na produção de hifomicetos, um dos meios mais empregados, principalmente em países em desenvolvimento, tem sido o arroz cozido (Jackson, 1997), a exemplo dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Sporothrix insectorium*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Verticillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae* (Tanzini, 2002). A eficácia do arroz parboilizado já foi constatada, por exemplo, por Borges Neto *et al.*, (2004) para a obtenção de inóculo de *Fusarium graminearum*. O presente trabalho mostra que este substrato também pode ser considerado propício para o cultivo de *D. pulvinata* possibilitando seu uso para produção de inóculo em larga escala.

## **2) Comparação de métodos de produção de esporos de *Dicyma pulvinata***

Os métodos de produção usados para linhagens de *D. pulvinata* comparados em termos de esporulação não diferiram estatisticamente entre si, para a maioria das linhagens. Entretanto, para a linhagem CEN 93, observou-se que a produção em erlenmeyers supera as demais, embora este valor seja aproximado ao dos outros métodos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Métodos de produção de esporos para *Dicyma pulvinata*.

Métodos de produção	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
Sacos de polipropileno	1,861 Aa*	1,205Abc	0,790 Ac	1,306 Bb
Erlenmeyers	1,790 Aa	1,197 Ab	0,840 Ab	1,891 Aa
Bandejas	2,195 Aa	1,464 Ab	0,741 Ac	1,021 Bbc

CV= 16,14

\*Esporulação média ( $\times 10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> de arroz parboilizado). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados por SQRT ( $x + 0,5$ ). Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

Como as médias de produção de esporos entre os métodos avaliados são bastante semelhantes, o uso de sacos de polipropileno representaria um método mais viável para o cultivo de *D. pulvinata*, devido ao fácil manuseio, além de permitir a produção do fungo em larga escala com o custo menos elevado. Diversos fungos são produzidos usando sacos de polipropileno. Para a produção de *Metarhizium* spp. e *Beauveria bassiana* o uso de sacos plásticos autoclaváveis é o procedimento mais empregado (Leite *et al.*, 2003).

### 3) Influência do fotoperíodo no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*

Não houve interação significativa entre os fatores (fotoperíodo e linhagem), para os valores de diâmetro de colônias. Os resultados mostraram que ausência de luz, assim como seis horas diárias de luz, foram os regimes que melhor favoreceram o crescimento do fungo.

Estes dados estão de acordo com Rodrigues (2002) que em avaliações da influência da luz no crescimento micelial de *D. pulvinata* constatou que a ausência de luz promoveu

um maior crescimento do fungo. Resultados semelhantes foram observados para outros fungos como *Phomopsis sojae* (Almeida, 1982) e *Microdochium oryzae* (Manandhar, 1998) onde o escuro contínuo promoveu maior crescimento micelial.

Aos 4 e 8 dias de incubação, não se observou diferença entre as linhagens quanto ao crescimento. Porém, aos 12 e aos 16 dias, as linhagens CEN 58 e CEN 91 apresentaram os maiores valores médios de diâmetro de colônias (Tabela 3).

**Tabela 3.** Diâmetro médio das colônias de linhagens de *Dicyma pulvinata* em diferentes períodos de cultivo (dias).

Dias de cultivo	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
4	0,20 Da*	0,20 Da	0,15 Da	0,20 Da
8	1,01 Ca	0,99 Ca	0,93 Ca	0,94 Ca
12	1,86 Ba	1,66 Bbc	1,78 Bab	1,48 Bc
16	2,55 Aa	2,26 Ab	2,51 Aa	2,02 Ac

CV= 16,18

\*Diâmetro médio das colônias (cm). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

De maneira geral, luz contínua proporcionou maior esporulação das linhagens. No experimento realizado em meio de cultura BDA, apenas CEN 93 não sofreu influência dos fotoperíodos avaliados, pois os mesmos não diferiram-se estatisticamente, já para as outras linhagens 24 horas diárias de luz propiciaram maior concentração de esporos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Esporulação média de linhagens de *Dicyma pulvinata* nos fotoperíodos de 0, 6, 12 e 24 horas de luz aos 17 dias de crescimento em meio de cultura BDA.

Fotoperíodos (horas de luz)	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
0	2,57 Ca*	0,85 Ba	1,17 Ba	0,32 Aa
6	7,02 Ba	3,57 Bab	3,62 Bab	0,45 Ab
12	3,82 BCa	0,77 Ba	1,97 Ba	0,47 Aa
24	17,45 Aa	9,77 Ab	11,67 Ab	0,85 Ac

CV= 20,25

\*Esporulação média ( $\times 10^5$  esporos.ml<sup>-1</sup>). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

No que se refere ao experimento em substrato sólido, a esporulação foi semelhante com 12 ou 24 horas de luz, para a linhagem CEN 58. Já para as linhagens CEN 62 e CEN 91 não houve diferença significativa nas luminosidades testadas. Porém constatou-se com CEN 93 uma elevação da produção de esporos no regime de 24 horas de luz, enquanto nos outros regimes de luz (0, 6 e 12 horas), houve similaridade (Tabela 5).

**Tabela 5.** Esporulação média de linhagens de *Dicyma pulvinata* em diferentes períodos de luz aos 17 dias de crescimento em arroz parboilizado.

Fotoperíodos (horas de luz)	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
0	3,05 Bb*	5,11 Aab	0,49 Ac	6,38 Ba
6	2,90 Bbc	4,43 Ab	1,49 Ac	7,44 Ba
12	4,21 ABb	3,92 Ab	0,39 Ac	7,13 Ba
24	6,35 Ab	5,82 Ab	1,62 Ac	11,32 Aa

CV= 28,94

\*Esporulação média ( $\times 10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> de arroz parboilizado). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

Segundo Leite *et al.* (2003), a conidiogênese de fungos é estimulada pela luminosidade. Em estudos realizados no Instituto Biológico de São Paulo com *Sporothrix insectorium*, verificou-se maior produção de conídios quando o fungo foi exposto a um regime de luz contínua. A luminosidade também aumentou a produção de conídios de *Microcyclus ulei* (Junqueira *et al.*, 1986).

Em trabalho realizado por Rodrigues (2002) utilizando um único isolado de *D. pulvinata* e envolvendo comprimentos de onda que compõe o espectro de luz visível, a esporulação deste fungo alcançou maior desempenho em luz branca, ausência de luz e luz azul, mas em uma análise da esporulação total, a ausência de luz representou a melhor condição.

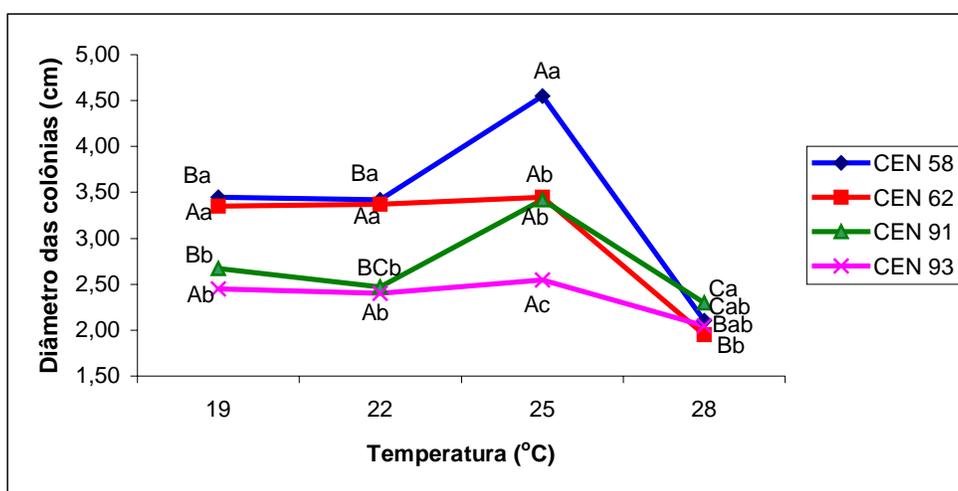
Loureiro *et al.* (2002), cita que a produção de conídios é aumentada por qualquer regime de luz, embora para se alcançar o rendimento máximo seja necessário determinar o tipo de luz mais favorável em função de cada fungo, para cada isolado e também para cada meio de cultura utilizado.

Esses dados mostram que os fungos podem agir diferentemente ao estímulo induzido pelo regime de iluminação, justificando assim, a importância dos resultados obtidos neste ensaio.

No caso de linhagens para as quais não há influência da luz ou da sua ausência sobre o crescimento micelial e esporulação de *D. pulvinata*, a isenção de luz poderia representar uma redução dos custos finais de obtenção deste agente de controle biológico. Como existe uma diferença entre o melhor fotoperíodo para a esporulação em meio de cultivo e em substratos sólido, é importante levar em consideração o intuito da produção (produção em larga escala) e a linhagem que apresentar maior eficiência para o controle da doença, selecionando desta forma, um fotoperíodo mais adequado para tal finalidade.

#### 4) Crescimento, esporulação e germinação de *Dicyma pulvinata* sob diferentes temperaturas

Exceto 31 °C, as temperaturas testadas propiciaram o cultivo das linhagens. A 28 °C, observou-se um menor crescimento micelial do fungo. Para a linhagem CEN 58 e CEN 91, a melhor temperatura foi de 25 °C. Já para as linhagens CEN 62 e CEN 93, as temperaturas de 19, 22 e 25 °C não diferiram-se estatisticamente no crescimento de *D. pulvinata* (Figura 1).



**Figura 1.** Diâmetro médio de colônias de *Dicyma pulvinata* crescidas sob diferentes temperaturas, aos 16 dias de idade. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na horizontal e minúscula na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV= 5,45.

Observaram-se diferenças quanto à melhor temperatura para esporulação de *D. pulvinata* tanto em meio de agarizado como em arroz parboilizado. Em meio BDA, as temperaturas de 19, 22 e 25 °C não influenciaram significativamente no desenvolvimento de CEN 58. Porém, para CEN 62 e CEN 91, a temperatura de 22 °C mostrou ser mais apropriada para a esporulação. Para a linhagem CEN 93, as temperaturas avaliadas tiveram suas médias estatisticamente semelhantes (Tabela 6).

Com relação ao cultivo em arroz parboilizado, a linhagem CEN 58 esporulou melhor quando mantido à temperatura de 19 °C, sendo que nas demais, não houve diferença estatística quanto ao número de esporos.g<sup>-1</sup> de substrato. CEN 62 e CEN 91 foram favorecidos pelas temperaturas de 19 e 22 °C, com maior produção de esporos. Já para CEN 93, as temperaturas de 19, 22 e 25 °C não diferiram-se significativamente, promovendo maior rendimento de esporos (Tabela 7).

**Tabela 6.** Esporulação de linhagens de *Dicyma pulvinata* em meio de cultura BDA sob diferentes temperaturas aos 17 dias de crescimento.

Temperaturas	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
19 °C	8,2 Ab*	10,45 Bb	15,15 Ba	3,95 Ac
22 °C	9,8 Ac	15,8 Ab	23,9 Aa	4,2 Ad
25 °C	7,15 Aba	2,42 Cb	4,77 Cab	1,40 Ab
28 °C	3,47 Ba	0,37 Ca	2,20 Ca	0,75 Aa

CV= 29,71

\*Esporulação média (x 10<sup>5</sup> esporos.ml<sup>-1</sup>). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na vertical e minúscula na horizontal) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

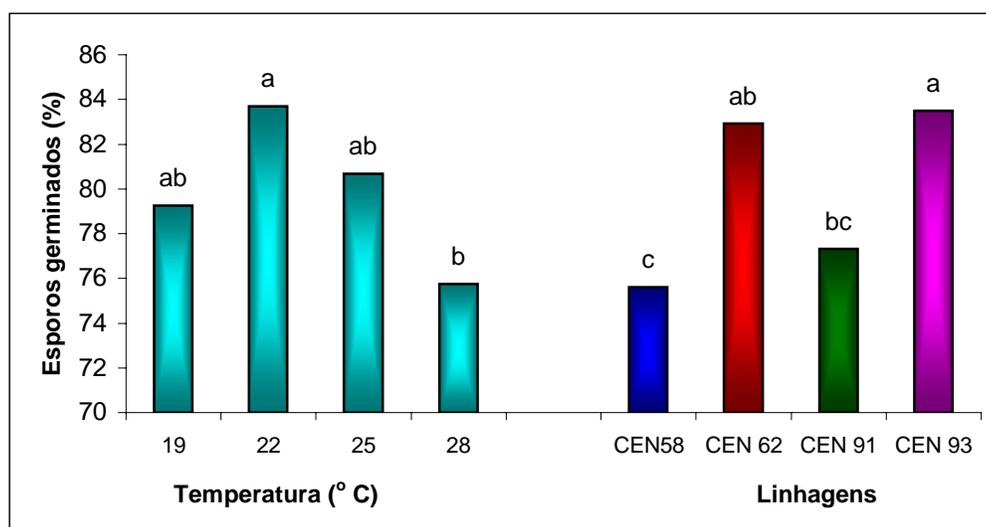
**Tabela 7.** Esporulação de linhagens de *Dicyma pulvinata* em arroz parboilizado sob diferentes temperaturas aos 17 dias de crescimento.

Temperaturas	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
19 °C	8,40 Aa*	6,06 ABb	9,05 Aa	5,32 Ab
22 °C	5,43 Bb	7,34 Ab	9,65 Aa	6,34 Ab
25 °C	4,61 Bab	4,03 Bab	2,51 Bb	6,04 Aa
28 °C	3,86 Ba	0,81 Cb	0,29 Cb	0,23 Bb

CV= 22,43

\*Esporulação média (x 10<sup>7</sup> esporos.g<sup>-1</sup> de substrato). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias nas colunas e letras minúsculas compara as médias nas linhas.

Quanto à germinação dos conídios, em análise fatorial a interação entre temperatura e linhagem não foi significativa, não se detectando diferenças para temperaturas de 19, 22 e 25 °C, nem entre as linhagens CEN 62 e CEN 93 que se destacaram dos demais (Figura 2).



**Figura 2.** Germinação de 4 linhagens de *Dicyma pulvinata* sob diferentes temperaturas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV= 7,72.

Grande parte dos fungos hifomicetos, durante o crescimento e conidiogênese, são favorecidos por temperaturas próximas de 25 °C (Leite *et al.*, 2003). Neste experimento, *D. pulvinata* apresentou faixa de temperatura favorável ao seu desenvolvimento de 19 à 25 °C. Na temperatura de 28 °C, foi observada uma queda no crescimento e esporulação. Esses dados estão de acordo com um experimento de Mitchell & Taber (1986), obtidos com isolado americano do fungo proveniente do Texas, onde a produção de *D. pulvinata* em meio de cultura líquido teve seu ponto máximo de crescimento entre 23 e 25 °C e um declínio de 22 % no crescimento à 28 °C. Estes mesmos autores verificaram a existência de efeito da temperatura na colonização e esporulação de lesões de *Cercosporidium personatum* por *D. pulvinata*, destacando-se como melhor faixa 23 a 25 °C.

A determinação da temperatura adequada para o crescimento do fungo é um dos requisitos indispensáveis para otimizar sua produção tanto em pequena como em média e larga escalas, além de ser útil para fazer inferências quanto às condições ambientais na época de aplicação do fungo. Há uma alta diversidade entre as faixas de temperatura ideais exigidas para a produção das espécies de fungo. *B. bassiana* em trabalho de Luz & Fargues (1997) teve sua germinação constatada em todas temperaturas testadas (15, 20, 25, 28, 30 e 35 °C). Silva *et al.* (2003), verificaram que a temperatura ótima para a germinação de *Sphaerotheca pannosa* oscilou entre 20 e 25 °C. Abbas *et al.* (1995), estudando *Alternaria helianthi* observou que este cresceu bem entre 18 e 30 °C e que o crescimento é mais rápido em 28 e 30 °C do que em temperaturas mais baixas. Este autor sugere que baixas temperaturas possam beneficiar a produção de conídios por reduzir a quantidade de CO<sub>2</sub> produzido por conídios. De acordo com Misaghi *et al.* (1978), as taxas respiratórias aumentam com a temperatura e o CO<sub>2</sub> produzido inibe a esporulação do fungo.

No presente trabalho, as linhagens de *D. pulvinata* não apresentaram crescimento à temperatura de 31 °C. Entretanto, quando o fungo incubado por 17 dias nessa temperatura, foi transferido para condições de 25 °C, observou-se o seu crescimento micelial e esporulação, tanto em meio BDA como em arroz parboilizado. Os esporos assim obtidos apresentaram viabilidade. Mitchel *et al.* (1986), confirmaram que isolados de *D. pulvinata* utilizados no controle de *C. personatum* incubados à 30 °C só apresentaram esporulação após 30 dias de incubação. Dados similares já foram constatados por outros fungos como em *Cercospora piaropi*, que apesar de não apresentar desenvolvimento a 35 °C, quando transferidos para 25 °C demonstrou crescimento da colônia (Ávila, 2002).

## 5) Uso de fontes de carbono para a esporulação de *Dicyma pulvinata*

Observou-se, no tocante ao crescimento micelial, diferenças entre as linhagens quanto à utilização de fontes de carbono. Porém, todas as linhagens foram favorecidas pela adição de glicose e sacarose. Para CEN 58, além destas fontes, maltose também mostrou-se uma boa fonte de carbono. Para o CEN 93, glicose, sacarose, maltose e galactose não diferiram estatisticamente (Tabela 8).

**Tabela 8.** Diâmetro médio das colônias de *D. pulvinata* em diferentes fontes de carbono.

Fontes de carbono	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
Glicose	3,82 Aa*	3,61 Aab	3,65 ABab	3,43 Ab
Galactose	2,5 Db	3,02 CDa	1,95 Ec	3,22 Aa
Sacarose	3,82 Aa	3,76 Aa	3,90 Aa	3,21 Ab
Maltose	3,85 Aa	3,32 Bb	3,62 Ba	3,37 Ab
Amido	3,40 Ba	3,25 BCab	3,15 Cb	2,75 Bc
Testemunha	2,53 Cb	2,8 Da	2,51 Db	2,36 Cb
CV= 4,03				

\*Diâmetro médio das colônias em cm. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula nas colunas e minúsculas na linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Observou-se, quanto à avaliação da esporulação em meio de cultura, interação significativa entre os fatores linhagens e fontes de carbono. Para todas as linhagens a testemunha foi o tratamento em que se verificou os níveis mais baixos de esporulação, demonstrando que o acréscimo de fontes de carbono é importante para aumentar a eficiência na esporulação das linhagens em meio de cultura. Para CEN 58, não foram constatadas diferenças para as diversas fontes utilizadas. Galactose e sacarose demonstraram ser as melhores fontes deste nutriente para a linhagem CEN 62. Para a

linhagem CEN 91, destacaram-se como fontes de carbono para a esporulação do fungo, a sacarose e o amido. Esta última é, também, a melhor fonte de carbono para a linhagem CEN 93 (Tabela 9).

**Tabela 9.** Esporulação de *Dicyma pulvinata* em meio de cultura suplementado com diferentes fontes de carbono.

Fontes de Carbono	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
Glicose	4,705 Aa*	4,727 Ba	4,752 Ba	3,632 BCa
Galactose	3,240 Ab	7,080 Aa	4,519 Bb	1,870 Dc
Sacarose	4,512 Ab	6,361 Aa	6,903 Aa	2,340 CDc
Maltose	3,755 Aa	4,484 Ba	5,103 Ba	3,855 Ba
Amido	4,061 Ac	3,762 Bc	7,276 Aa	5,520 Ab
Testemunha	1,060 Bb	1,055 Cb	2,662 Ca	1,435 Dab

CV= 17,79

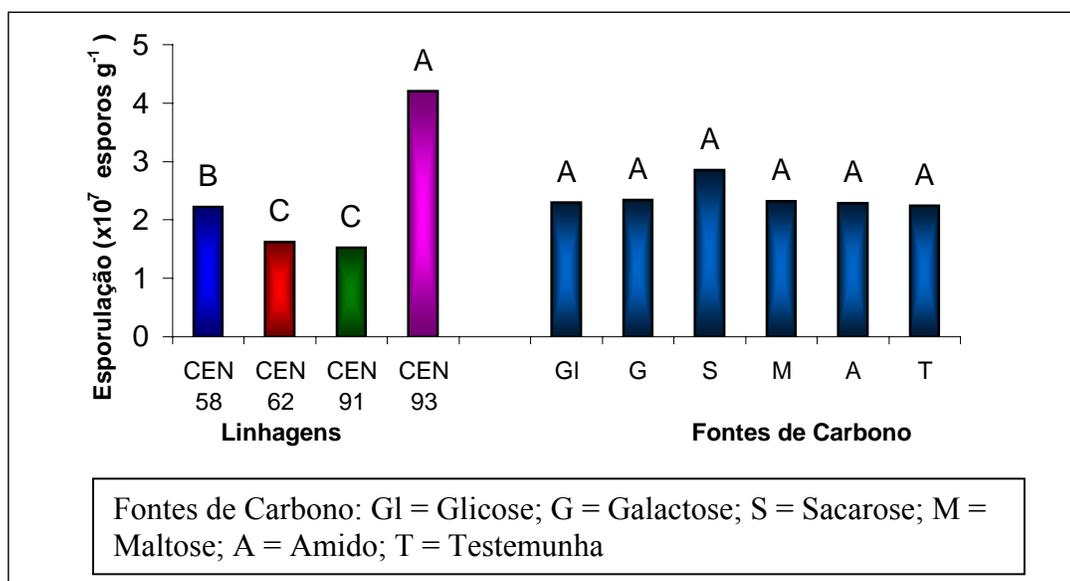
\*Esporulação média ( $\times 10^4$  esporos.ml<sup>-1</sup>). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados por SQRT ( $x + 0,5$ ). Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

Assim como neste ensaio, Barbosa *et al.* (2002) verificaram que existem diferenças nas necessidades de fontes nutricionais entre isolados de uma mesma espécie fúngica. Glicose é uma molécula prontamente utilizável. Portanto, muitos autores a consideram como a melhor fonte de carbono para o crescimento e esporulação de vários fungos. No presente ensaio, este resultado foi confirmado quanto ao crescimento micelial, embora, dependendo da linhagem, outras fontes tenham apresentado resultados parecidos.

Amido é uma fonte de carbono melhor do que a glicose, por ser um composto que se hidrolisa lentamente, fornecendo ao meio menor acúmulo de ácidos do que a glicose

(Barbosa *et al.*, 2002). Essa fonte destacou-se na esporulação das linhagens CEN 91 e CEN 93.

No que se refere à avaliação das fontes de carbono acrescentadas ao substrato arroz parboilizado, os tratamentos não diferiram estatisticamente para as linhagens utilizadas, destacando-se CEN 93 entre as demais quanto ao número de esporos produzidos (Figura 3). Tal resultado indica que, quando cultivado em arroz parboilizado, não há efeito da adição de outras fontes de carbono na produção de *D. pulvinata*. Isto tem um efeito significativo na diminuição dos custos de produção.



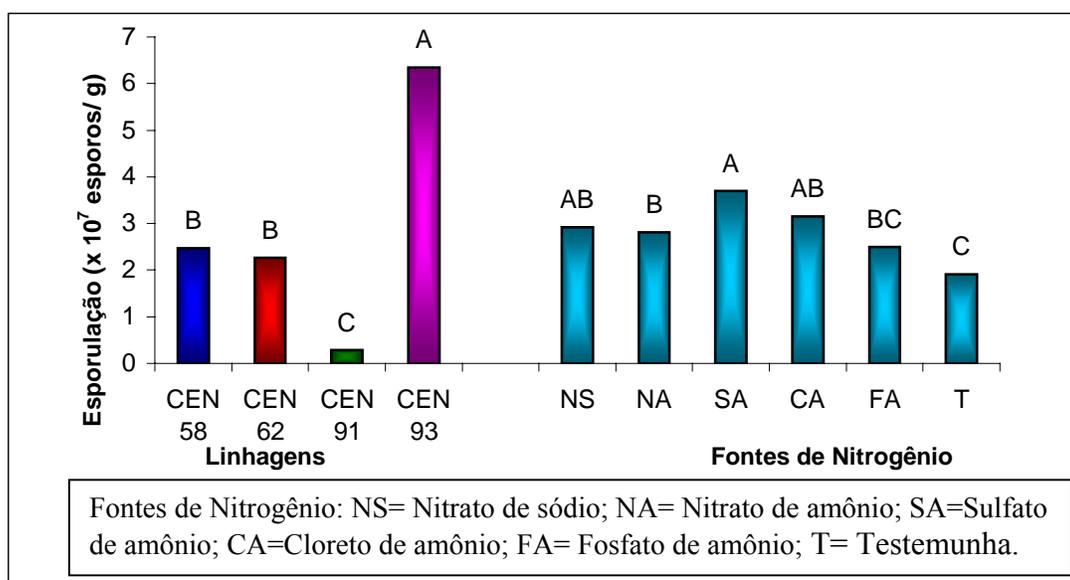
**Figura 3.** Esporulação de *Dicyma pulvinata* em arroz parboilizado suplementado de fontes de carbono. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV= 24,88.

#### 6) Efeito de fontes de nitrogênio na esporulação de *Dicyma pulvinata*, em arroz parboilizado

Na esporulação de linhagens de *Dicyma pulvinata*, a adição de fontes de nitrogênio ao arroz parboilizado não mostrou interação significativa entre as linhagens e as fontes

utilizadas. Para todas as linhagens, a utilização do sulfato de amônio permitiu um aumento na esporulação do fungo, entretanto não diferindo significativamente do cloreto de amônio e nitrato de sódio. A linhagem que mais se destacou foi CEN 93 produzindo maior quantidade de esporos (Figura 4).

Diferentes fontes de nitrogênio podem ter resultados semelhantes para a produção de esporos dos fungos. Em experimento realizado por Barbosa *et al.* (2002) um isolado de *Verticillium lecanii* teve maior crescimento radial quando se utilizou nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Quanto à esporulação para este mesmo isolado ao vigésimo dia de cultivo, nitrato de sódio, fosfato de amônio, cloreto de amônio, sulfato de amônio e nitrato de amônio não apresentaram diferença estatística.



**Figura 4.** Esporulação de *Dicyma pulvinata* em arroz parboilizado acrescido de fontes de nitrogênio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV= 30,01.

## 7) Efeito da secagem na germinação de *Dicyma pulvinata*

Através do cálculo da porcentagem de água retirada, em diferentes períodos, após o fungo e arroz serem colocados em dessecador, constatou-se que a partir do 6º dia, tanto para CEN 58 como para CEN 62, não foram observadas diferenças. Entretanto para a linhagem CEN 91, a perda de água foi semelhante a partir do 5º dia em dessecador, e para a CEN 93, esta manteve-se constante aos 7º e 8º dias. (Tabela 10).

**Tabela 10.** Porcentagem média de água retirada de linhagens de *Dicyma pulvinata* em substrato arroz parboilizado em diferentes períodos.

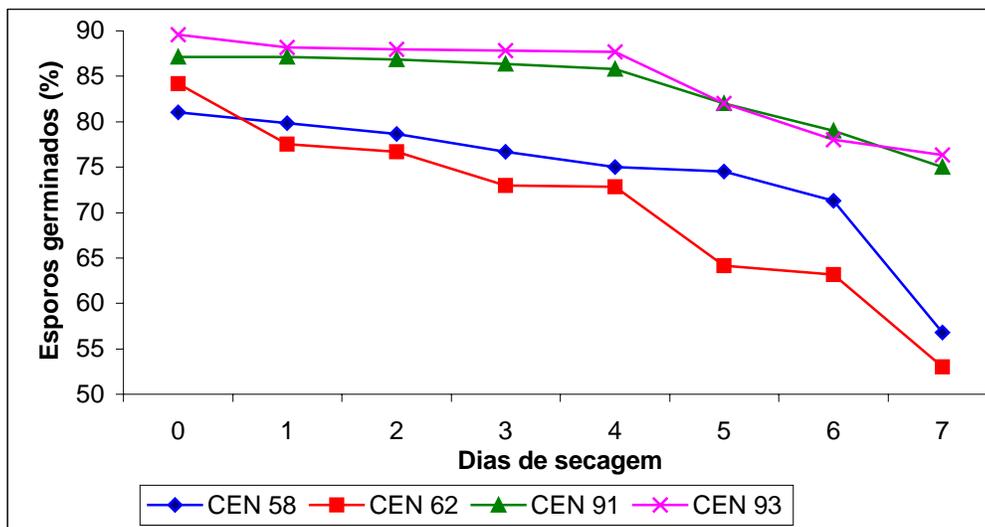
Dias em dessecador	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
1	11,09 Fb*	17,81 Ea	16,38 Ea	7,66 Gc
2	18,50 Ec	28,37 Da	25,31 Db	14,59 Fd
3	24,69 Dc	33,13 Ca	29,86 Cb	19,94 Ed
4	30,47 Cb	34,98 BCa	32,64 BCab	25,93 Dc
5	35,07 Ba	35,70 BCa	37,74 ABa	31,00 Cb
6	36,69 ABab	37,80 ABa	35,33 ABab	34,65 Bb
7	37,78 ABab	39,19 Aa	35,89 Ab	37,42 ABab
8	38,22 Aab	39,99 Aa	36,61 Ab	38,27 Aab

CV= 5,92

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas comparam as médias no sentido horizontal.

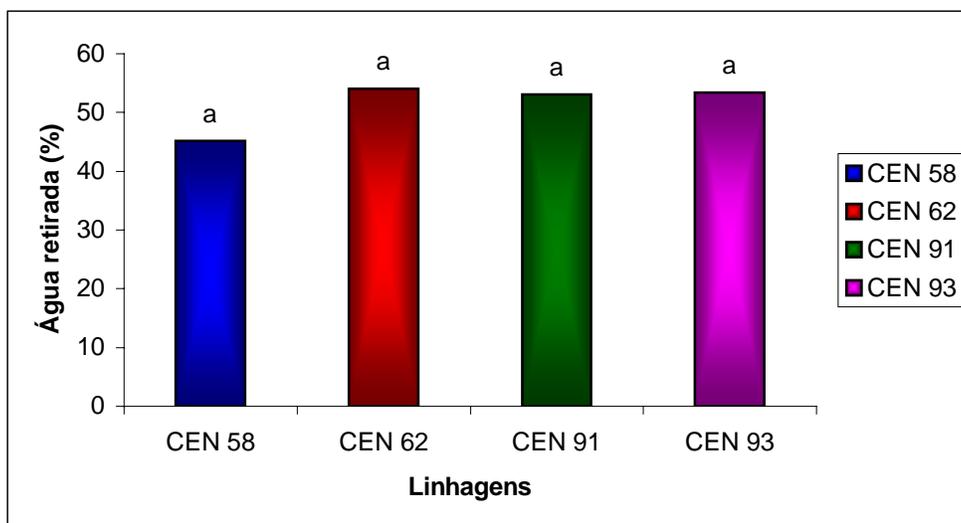
A germinação do fungo que é colocado a 4 % de umidade para secagem não foi afetada inicialmente. Comparados com a germinação do fungo antes de ser colocado no dessecador, verificou-se que até o 5º dia, para as linhagens CEN 58 e CEN 93, a germinação se manteve semelhante. Para CEN 62, a viabilidade do fungo decresceu mais rapidamente. Porém, com 1 e 2 dias no dessecador, a germinação não diferiu

estatisticamente comparado a do fungo fresco. Na linhagem CEN 91, as médias de germinação sofreram uma queda no 5 ° dia, mas apenas no 7 ° dia mostraram-se diferentes (Figura 5).



**Figura 5.** Porcentagem de esporos germinados para avaliar a viabilidade de linhagens de *Dickeya pulvinata* após secagem em dessecador a 4 %. CV= 5,91.

Quando colocados em estufa por 72 horas, todas as linhagens apresentam estatisticamente a mesma porcentagem de água retirada (Figura 6).



**Figura 6.** Porcentagem de água retirada de *Dickeya pulvinata* mais substrato após 72 horas em estufa. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV= 11,64.

A secagem de estruturas do fungo pode garantir um aumento na sua viabilidade por um período maior. Para a produção de biofungicidas é importante que a sobrevivência e germinação do agente de controle biológico seja alta e que ele possa reter a sua capacidade antagonística durante a estocagem. Para *D. pulvinata* um período de secagem em que a viabilidade do fungo não seja afetada significativamente depende da linhagem em uso.

Existem diferenças quanto às estruturas do fungo utilizadas para o controle biológico, considerando a necessidade de estocagem por um período mais prolongado. A forma mais adequada para o uso no controle biológico são os conídios, por serem mais resistentes às condições adversas do ambiente, podendo ser preservados por um período de até um ano (Abreu *et al.*, 1983). O micélio, após secagem, pode induzir o fungo a um estado de baixo metabolismo, permitindo seu armazenamento por alguns ou vários meses (Leite *et al.*, 2003). A tolerância à secagem é um fator que pode limitar o sucesso e a comercialização de biopesticidas, a exemplo do que acontece com os bioherbicidas (Montazeri & Greaves 2002).

#### **8) Germinação de conídios de *Dicyma pulvinata***

Quanto à germinação de conídios de *D. pulvinata*, verificou-se uma diferença na velocidade de germinação entre as linhagens. Com uma hora de incubação, observou-se a ocorrência de esporos germinados, e em até 2 horas as linhagens apresentam germinação semelhante. A partir de 3 horas, a linhagem CEN 93 destacou-se entre as demais, com uma germinação média acima de 70 %. Com 6, 7 ou 8 horas de incubação, constatou-se que a porcentagem de esporos germinados para as linhagens avaliadas, foi semelhante, todas acima de 90 %. Portanto não houve diferenças estatísticas entre esses períodos de incubação para a germinação de conídios (Tabela 11).

**Tabela 11.** Germinação de conídios de linhagens de *Dicyma pulvinata* em diferentes períodos de incubação.

Períodos de incubação	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
1 hora	1,33 Ea*	1,33 Ea	1,33 Ea	1,66 Da
2 horas	4,66 Ea	4,66 Ea	4,66 Ea	8,33 Da
3 horas	26,33 Dc	28,66 Da	41,66 Db	72,00 Ca
4 horas	47,00 Cbc	41,66 Cc	56,00 Cb	78,66 BCa
5 horas	75,33 Bb	64,66 Bc	82,66 Bab	88,00 ABa
6 horas	90,66 Aa	94,00 Aa	91,66 ABa	96,33 Aa
7 horas	97,66 Aa	97,33 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa
8 horas	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa	100,00 Aa

CV= 7,96

\*Porcentagem média de esporos germinados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

Existem diferenças quanto à germinação dos fungos de acordo com o microambiente usado. Em experimento realizado por Gasparotto *et al.* (1984), o fitopatógeno *Microcyclus ulei* foi incubado em tubos de ensaio e em placas com lâminas de água de 25 mm e 2,5 mm, respectivamente, usando uma concentração de  $10^6$  esporos.ml<sup>-1</sup>. Após cinco horas, verificou-se que, nas placas, 61 % dos esporos germinaram, enquanto nos tubos, poucos esporos germinaram e os mesmos não desenvolveram tubos germinativos normais.

No ensaio com *D. pulvinata*, antagônico ao *M. ulei*, a menor germinação média do fungo com cinco horas de incubação foi de 64,66 % para CEN 62, e a máxima, de 88 % para CEN 93, utilizando a mesma concentração de esporos do trabalho citado. Conforme os

dados obtidos, seis horas seria o tempo ideal para que mais de 90 % de esporos em todas as linhagens houvessem germinado. Esse curto período pode ser considerado como uma vantagem para o agente de controle biológico.

## 9) Armazenamento de *Dicyma pulvinata*

### 9.1) Armazenamento de *D. pulvinata* fresco, em temperatura de 4 °C

Com algumas linhagens, verificou-se decréscimo da viabilidade mais rapidamente, como foi o caso de CEN 58 e CEN 62, para as quais a porcentagem de esporos viáveis com sete dias não difere estatisticamente das porcentagens obtidas com o fungo antes de ser armazenado. Para CEN 91 e CEN 93 até 14 e 21 dias, respectivamente, não se observou queda significativa na germinação dos esporos (Tabela 12).

**Tabela 12.** Viabilidade de *Dicyma pulvinata* armazenado fresco à 4 °C em diferentes períodos de armazenamento.

Períodos de armazenamento	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
0	81,00 Ab*	84,16 ABab	87,16 Aab	89,50 Aa
7 dias	77,66 Ab	85,66 Aa	86,33 Aa	89,33 Aa
14 dias	70,00 Bc	77,00 BCb	82,16 Aab	84,33 ABa
21 dias	70,00 Bc	76,66 Cb	84,66 Bb	84,00 ABa
28 dias	62,66 Cc	76,66 Cbc	71,83 Ba	80,00 Bab

CV= 5,69

\*Porcentagem média de esporos germinados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

### 9.2) Armazenamento de *D. pulvinata* após secagem em dessecador

Verificou-se que a interação entre período de avaliação e linhagem não foi significativa, sendo 30 dias considerado o melhor período para manutenção da viabilidade em todas as linhagens. Com 60 e 90 dias a viabilidade tornou-se inferior a 50 %, ou seja inviável para a estocagem do fungo. Em relação à temperatura de armazenamento, observou-se que, exceto para CEN 93, nas outras linhagens avaliadas tanto 4 °C como 25 °C não interferiram na sobrevivência do fungo. Para CEN 93, 4 °C foi considerado a melhor temperatura (Tabela 13).

**Tabela 13.** Armazenamento de *Dicyma pulvinata* em diferentes temperaturas.

Temperaturas	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
4 °C	42,75 Ab*	49,25 Aa	49,91 Aa	53,75 Aa
25 °C	47,33 Aa	47,25 Aa	48,52 Aa	46,58 Ba

CV= 12,43

\*Porcentagem média de esporos germinados em todas as avaliações do fungo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

### 9.3) Armazenamento de *D. pulvinata* em suspensão

Observou-se germinação decrescente do fungo ao longo dos dias. Porém, verificou-se que o fungo pode ser mantido em suspensão de Tween 80 a 0,05% por algum tempo. Até 5 dias de armazenamento, não houve queda significativa na germinação para as linhagens CEN 58 e CEN 93. Para a linhagem CEN 62, a germinação, foi semelhantes até o 10<sup>o</sup> dia. Com CEN 91, a germinação diminuiu já após o a segunda avaliação (Tabela 14).

**Tabela 14.** Armazenamento de *Dicyma pulvinata* em suspensão em diferentes períodos de armazenamento.

Períodos de armazenamento	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN93
0	87,33 Aab*	81,00 Ab	88,66 Aab	94,00 Aa
5 dias	87,33 Aa	80,33 Aa	61,00 Bb	88,66 Aa
10 dias	76,66 Ba	75,00 Aa	53,33 BCb	77,00 Ba
30 dias	37,33 Cc	56,66 Ba	52,00 Cab	45,33 Cbc
CV= 5,55				

\*Porcentagem média de esporos germinados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas compara as médias no sentido vertical e letras minúsculas compara as médias no sentido horizontal.

O armazenamento de fungos agentes de controle biológico é bastante difícil. Por ser tratar de organismos vivos, sua viabilidade e capacidade infectiva decrescem muito rapidamente, além de serem muito influenciados pelas condições ambientais. Conídios de *Beauveria bassiana* causaram mortalidade na largata do pinheiro, *Dendrolimus* sp., de 69,7% e 28,3%, respectivamente, logo após a produção do patógeno. Entretanto, a mortalidade caiu para 46,6 % e 17,2 %, após duas semanas de armazenamento a 4 °C (Leite *et al.*, 2003). Esse mesmo fungo em forma de conídio superficial, conídio submerso e blastosporos, suspensos em água destilada e armazenados a – 70 °C, perderam 50 % da viabilidade 30,7; 15,2 e 5,2 semanas, respectivamente (Hegedus *et al.*, 1992).

Neste estudo verificou-se em todas as formas de armazenamento aplicada, que a viabilidade do fungo diminuiu em um período de tempo relativamente curto. Isto indica a necessidade de se obter uma formulação para esse microrganismo de modo a garantir o seu uso comercial.

## 10) Uso de Biodac em substrato para o cultivo de *Dicyma pulvinata*

Ao analisar as unidades formadoras de colônias por grama de substrato (UFC.g<sup>-1</sup>) observou-se que o Biodac, quando umedecido com o meio SDY, proporciona melhor desenvolvimento de colônias, destacando-se a linhagem CEN 58 entre os demais (Figura 7).

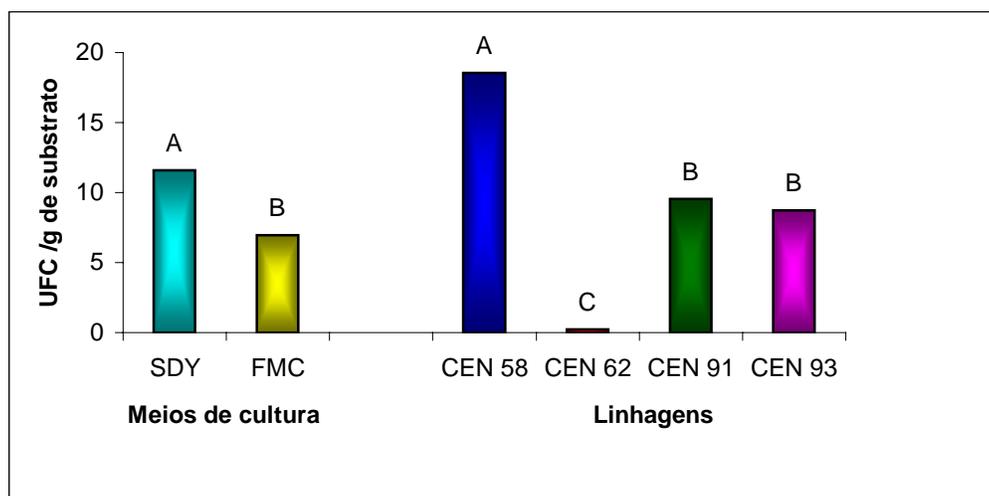
No tocante a germinação, ocorreu interação entre substratos e linhagens. CEN 58 e CEN 62 apresentaram viabilidade de esporos superior, quando armazenado em substrato com o meio FMC. Para as linhagens CEN 91 e CEN 93, não foram observadas diferenças quanto à viabilidade dos esporos nos dois meios de cultivo. Contudo, notou-se uma tendência de maior porcentagem de esporos germinados com a linhagem CEN 93 (Tabela 15).

Quanto à produção dos esporos cultivados em Biodac, não houve diferença entre os meios usados para as linhagens, com maior número de esporos.ml<sup>-1</sup> obtidos na linhagem CEN 58. A CEN 93 apresentou menor esporulação não diferindo estatisticamente de CEN 62. Verificou-se que *D. pulvinata* mantém a capacidade de esporulação após ser cultivado em substrato com Biodac (Figura 8).

Segundo Ilyna *et al.* (2000), Biodac não inibe o cultivo microbiano em meio de cultura líquido ou sólido e, em alguns casos, a sua presença acelera o crescimento dos microrganismos. Biodac vem sendo sugerido como carreador para a aplicação de microrganismos no solo.

O uso de Biodac pode ser significativamente vantajoso para o desenvolvimento de produtos comerciais de controle biológico. Seu uso em formulações com *Trichoderma* e *Gliocadium* tem demonstrado em estudos, a redução de doenças causadas por *Rhizoctonia solani* e por outros patógenos do solo (Lewis *et al.*, 1998). Neste trabalho, constatou-se que

seu uso poderá ser viável como suporte para cultivo de *D. pulvinata*. Em ambos meios de cultura avaliados em mistura com Biodac, este não inibiu o crescimento e germinação de nenhuma das linhagens do fungo. Devido ao seu baixo custo relatado por Lewis *et al.* (1998), o Biodac poderá representar uma alternativa eficiente e lucrativa na produção deste hiperparasita.



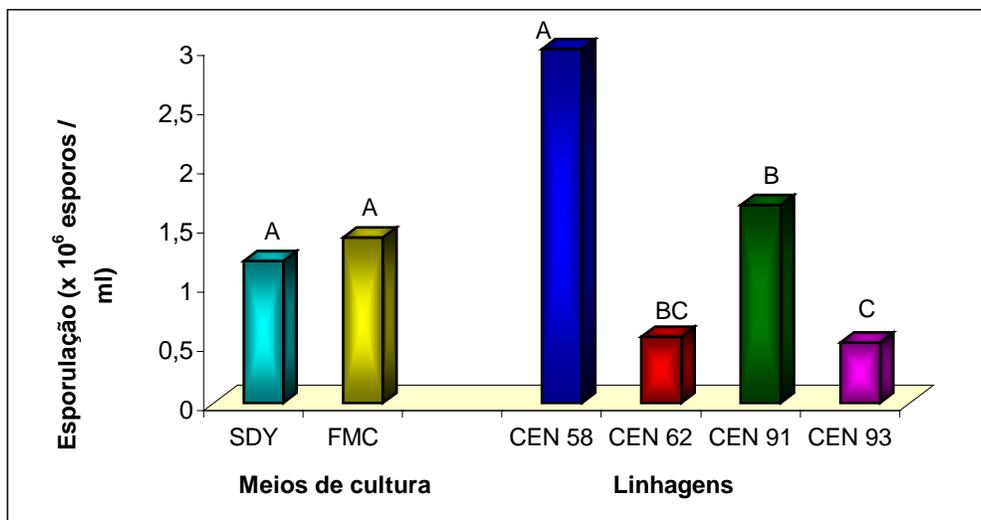
**Figura 7.** Desenvolvimento de *Dicyma pulvinata* em Biodac umedecido com os meios SDY e FMC. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV= 34,74.

**Tabela 15.** Germinação de linhagens de *Dicyma pulvinata*, cultivado em Biodac após 21 dias de armazenamento.

Linhagens	Meios cultivivos	
	SDY	FMC
CEN 58	64,00 Cb*	77,00 ABa
CEN 62	12,33 Db	36,00 Ca
CEN 91	75,66 Ba	69,00 Ba
CEN 93	88,00 Aa	81,33 Aa

CV= 6,20

\*Porcentagem média de esporos germinados. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na vertical e minúscula na horizontal) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 8.** Esporulação de *Dicyma pulvinata* após plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\text{SQRT}(x + 0,5)$ .  $\text{CV} = 19,36$ .

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O método mais eficiente para produção de *D. pulvinata* em larga escala seria a utilização do substrato arroz parboilizado em sacos de polipropileno com luz contínua favorecendo a esporulação das linhagens, admitindo temperaturas entre 19 e 25 °C. Não se faz necessário o uso de fontes de carbono para produção em arroz, porém sulfato de amônio eleva a esporulação do hiperparasita.
- Secagem por 3 dias em dessecador, diminuiria a porcentagem de água acumulada na produção do fungo em arroz e manteria viável os esporos em todas as linhagens. Obteve-se mais de 90% de esporos germinados com 6 horas de incubação a 25 °C.
- Com relação ao armazenamento, existe uma diferença significativa entre os períodos apropriados para o armazenamento e os isolados. As três formas de armazenagem utilizadas (fungo fresco a 4 °C, após secagem em dessecador e em suspensão) apresentaram baixa viabilidade de esporos, mesmo em curtos períodos de estocagem, demonstrando a necessidade de formulação para *D. pulvinata* com intuito de garantir uma maior vida útil do agente de controle biológico.
- Biodac mostrou-se como uma alternativa no suporte para o cultivo de *D. pulvinata*, embora haja necessidade de se aprofundar nos estudos para a adoção desta metodologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. K., EGGLEY, G.H. & PAUL, R.N. Effect of conidia production temperature on germination and infectivity of *Alternaria helianthi*. *Phytopathology* 85: 677-682. 1995.

ABREU, O.C., VALARINI, P.J., CRUZ, B.P.B., OLIVEIRA, D.A. & GABRIEL, D. Viabilidade e patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em função do período e condições de armazenamento. *Arquivos do Instituto Biológico* 50: 57-63. 1983.

ALLEN, S.J., BROWN, J.F. & KOCHMAN, J.K. Effects of temperature, dew period, and light on the growth and development of *Alternaria helianthi*. *Phytopathology* 73: 893-896. 1983.

ALMEIDA, A.M.R. Efeito de luz e meios de cultura, sobre crescimento micelial, formação e tamanho de picnídios e esporulação de isolados de *Phomopsis sojae* Leh. Anais, Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina. 1982. pp. 216-226.(Embrapa CNPSo. Documentos, 1).

ÁVILA, Z.R. Estudo de *Cercospora piaropi* como agente de controle biológico de *Eichhornia crassites* e sua associação com o herbicida 2,4 D. (Tese de Doutorado). Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista. 2002.

BARBOSA, C.C., MONTEIRO, A.C., CORREIA, A.C.B. & PEREIRA, G.T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecani* sob diferentes condições nutricionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 821-829. 2002.

BORGES NETO, C.R., GORGATI, C.Q. & PITELLI, R.A. Influência do fotoperíodo e da temperatura na intensidade de doença causada por *Fusarium graminearum* em *Egeria densa* e *E. najas*. *Fitopatologia Brasileira* 29: 252-258. 2004.

CELAR, F. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil. *Biological control* 28: 19-24. 2003.

GASPAROTTO, L., LIEBEREI, R. & TRINDADE, D.R. Germinação de conídios de *Microcyclus ulei* e sua sensibilidade a fungicidas “in vitro”. *Fitopatologia Brasileira* 9: 505-511. 1984.

GURGEL, L.M.S., MENEZES, M. & COELHO, R.S.B. Estudo comparativo de isolados de *Phomopsis anarcadii* e *Phomopsis mangiferae* através da patogenicidade e nutrição de C e N, em três regimes de luminosidade. *Summa Phytopathologica* 28:160-166. 2002.

HEGEDUS, D.D., BIDOCHKA, M.J., MIRANPURI, F.S. & KHACHATOURIANS, G.G. A comparison of the virulence, stability and cell- wall-surface characteristics of the spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 785-789. 1992.

ILYNA, A.D., VILLARREAL, S.J.A., RIVERA, R.E., GARZA, G.Y. & RODRIGUEZ, M.J. Using of biodac (absorbent granules produced from paper industry residues) as carrier to microorganisms for soil inoculation. *Biocatalysis, fundamentals & applications* 41: 135-138. 2000.

JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19: 180-187. 1997.

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. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 307-331.

JUNQUEIRA, N.T.V., ZAMBOLIM, L. CHAVES, G.M. & GASPAROTTO, L. Esporulação "in vitro" viabilidade dos conídios e patogenicidade de *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira* 11: 667-682. 1986.

LEITE, L. G., BATISTA FILHO, A., ALMEIDA, J. E. M & ALVES, S. B. Produção de fungos entomopatogênicos. Ribeirão Preto. A. S. Pinto. 2003.

LEWIS, J.A., LARKIN, R.P. & ROGERS, D.L. A formulation of *Trichoderma* and *Gliocadium* to reduce damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen ins soilless. *Plant Disease* 82: 501-506. 1998.

LOUREIRO, E.S., BATISTA FILHO, A. ALMEIDA, J.E.M., LEITE, L.G. & LAMAS, C. Efeito da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento do fungo *Sporothrix insectorium* (Hoog & Evans). *Arquivos do Instituto Biológico* 69: 79-83. 2002.

LUZ, C. & FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of na isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* 138: 117-125. 1997

MANANDHAR, J.B. Effect of light, temperature, and water potential on growth and sporulation of *Microdochium oryzae*. *Mycologia* 90: 995-1000. 1998.

MISAGHI, I.J., GROGAN, R.G., DUNIWAY, J.M & KIMBLE, K.A. Influence of enviroment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 68: 29-34. 1978.

MITCHELL, K.J. & TABER, R.A. Factors affecting the biological control of *Cercosporidium* leaf spot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. *Phytopathology* 76: 990-994. 1986.

MITCHELL, J.K., TABER, R.A. & PETTIT, R.E. Establishment of *Dicyma pulvinata* in *Cercosporidium personatum* leaf spot peanuts: effect of spray formulation, inoculation time and hours of leaf wetness. *Phytopathology* 76: 1168-1171. 1986.

MONTAZERI, M. & GREAVES, M.P. Effects of nutrition on desiccation tolerance and virulence of *Colletotrichum truncatum* and *Alternaria alternata* conidia. *Biocontrol Science and Technology* 12: 173-181. 2002.

OLUFOLAJI, D.B. Sporulation and growth of *Curvularia pallescens* as affected by media, temperature and nitrogen sources. *Phytopathology* 74: 260-263. 1984.

RODRIGUES, M.A. 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 e Curt)] in vitro. (Dissertação de Mestrado). Mato Grosso. Universidade Federal do Mato Grosso. 2002.

SILVA, M.D.D., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. & ZAUZA, A.V. Germinação de conídios de *Sphaeroteca pannosa* obtidos de eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 28: 674-677. 2003.

TANZINI, M.R. Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomatopatogênicos. (Tese de Doutorado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2002.

WOOD, R.K. S. & TVEIT, M. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. *The Botanical Review, Bronx* 21: 441-492. 1955.

## CAPÍTULO 3

---

---

### **Avaliação da eficiência de linhagens de *Dicyma pulvinata* no controle biológico de *Microcyclus ulei* sob condições de campo e efeito de agrotóxicos e adjuvantes no crescimento e esporulação do mesmo**

#### **INTRODUÇÃO**

O controle biológico é importante, pois reduz o problema de poluição do ambiente, resíduos de produtos, resistência de fungos a fungicidas e, provavelmente, custo de controle (Ghini, 1991).

Na seleção de microrganismos antagonistas a fitopatógenos, ensaios *in vitro* são insuficientes para se determinar o comportamento do antagonista *in vivo*, portanto esses testes devem ser complementares. Os ensaios em campo são fundamentais, já que os antagonistas dependem de sua competência ecológica. Este procedimento é indispensável para caracterizar o antagonista como potencial para o controle biológico, pois o mesmo será introduzido numa comunidade microbiana natural, na qual estará exposto às condições ambientais prevalentes, que devido a sua alta variabilidade constitui um problema considerável nos testes de campo (Bettiol, 1991).

Após a constatação de que o fungo *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & Curtis)] parasita *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, surgiu a possibilidade de controlar biologicamente esse patógeno em seringais de cultivo pelo uso desse micoparasita (Junqueira & Gasparotto, 1991), porém há necessidade de diferentes estudos relacionados à interação entre eles, à eficiência em campo, entre outros.

Uma das alternativas de controle de doenças de plantas que vem alcançando maior chance de sucesso, é a utilização de diferentes métodos integrados, no lugar do uso de um único procedimento de controle. Devido à complexidade do ecossistema, é necessária uma abordagem ampla dos problemas (Ghini, 1991).

O controle biológico de doenças foliares é um método altamente desejável para uso em conjunto com métodos químicos de controle (Mitchell *et al.*, 1986). Existem vários estudos que buscam verificar métodos de controle integrado entre micoparasitas e fungicidas (Tirilly, 1991).

A composição das formulações com o agente de controle biológico *D. pulvinata* é importante na capacitação do micoparasita para colonizar mais eficientemente os hospedeiros, sendo relevante à condição ambiental na aplicação, pois esta também afeta seu estabelecimento (Mitchell *et al.*, 1986).

A performance de agentes de biocontrole no campo é variável comparada com a performance de estudos em casa de vegetação (Kishore *et al.*, 2005). Junqueira & Gasparotto (1991), ressaltam que o uso de agentes veiculantes adequados para o inóculo de *D. pulvinata* poderia aumentar a eficiência e sobrevivência desse micoparasita.

Durante o desenvolvimento de produtos biológicos, diversos adjuvantes têm sido pesquisados, visando a melhor distribuição e adesão dos propágulos sobre a superfície foliar, proteção do patógeno contra dessecação e fornecimento de nutrientes requeridos na fase de germinação e crescimento das estruturas infectivas (Borges Neto *et al.*, 1997)

Neste trabalho avaliou-se a eficiência de linhagens de *D. pulvinata* em campo, bem como a possibilidade de seu uso integrado com fungicidas e adjuvantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

A produção de inóculo para o experimento de campo, os ensaios para a avaliação do efeito de agrotóxicos e adjuvantes no crescimento e esporulação de *D. pulvinata*, foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Núcleo Temático de Controle Biológico (NTCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O ensaio de campo procedeu-se em seringal das Plantações Michelin da Bahia Ltda., localizado no município de Ituberá – BA, onde a incidência do mal-das-folhas vem ocorrendo ao longo dos anos, com elevada severidade. Foram utilizadas as linhagens de *D. pulvinata*, CEN 58 (CG 679), CEN 62 (CG 683), CEN 91 (CG 772) e CEN 93 (CG 774) procedentes de Ouro Preto (RO), Belém (PA), Ituberá (BA) e Ponte de Lacerda (MT), respectivamente. Estas linhagens pertencem à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Plantas Daninhas e Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sendo que os números entre parênteses referem-se aos antigos códigos de acessos da coleção. A recuperação das colônias, mantidas em meio BDA (Batata 200g.l<sup>-1</sup>; Dextrose 20g.l<sup>-1</sup>; Agar 20g.l<sup>-1</sup>) em tubos inclinados e sob refrigeração, ocorreu no mesmo meio, a 25 °C.

Exceto em casos especificados, as colônias foram incubadas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Esse fotoperíodo foi simulado por meio de quatro lâmpadas fluorescentes de 20 W, luz do dia, instaladas na porta da BOD (Nova Técnica, modelo NT 708 –AT), onde as culturas foram mantidas em placas de Petri.

## **1) Avaliação de linhagens de *Dicyma pulvinata* para o biocontrole do mal-das-folhas da seringueira sob condições de campo**

### **1.1) Caracterização do experimento**

Este trabalho foi conduzido em área de jardim clonal de seringueira das Plantações Michelin da Bahia Ltda. O jardim clonal representa uma etapa relevante em um programa heveícola, pois fornece material botânico (hastes) contendo gemas em dormência para enxertia em viveiro (Carmo & Gomes, 1985).

O delineamento experimental realizado foi em blocos ao acaso com 6 tratamentos e 4 repetições, utilizando os clones IRCA 41, IRCA 109, IRCA 111 e IRCA 230, de *Hevea brasiliensis*, todos suscetíveis a *Microcyclus ulei*, sendo que cada clone foi considerado como um bloco. A parcela experimental foi composta de 5 a 7 fileiras de plantas por tratamento em cada bloco (pois havia filas com quantidades variáveis de plantas). Em média cada fila possuía 7 plantas com 1,5 m de comprimento, em espaçamento de 1 metro entre plantas e de 2 metros entre as fileiras, constituindo-se a área útil a ser avaliada, apenas 2 fileiras centrais, as demais serviram de bordadura.

Os seis tratamentos foram compostos por:

Tratamento 1: pulverização de suspensão preparada com a linhagem CEN 91.

Tratamento 2: pulverização de suspensão preparada com a linhagem CEN 93.

Tratamento 3: pulverização de suspensão preparada com a linhagem CEN 58.

Tratamento 4: pulverização de suspensão preparada com a linhagem CEN 62.

Tratamento 5: aplicação de produto químico rotineiramente utilizado para combate da doença na região, seguindo a dosagem usual (5 ml de Tilt + 50 gramas de Manzate + 75 ml de Natur'1 óleo para 15 litros de água).

Tratamento 6: sem nenhum controle da doença.

## **1.2) Produção do inóculo para pulverização em campo**

A produção de inóculo foi realizada a partir da repicagem de cada uma das quatro linhagens citadas para placas de Petri contendo 25 ml do meio BDA. Após 10 dias de incubação em BOD, foram transferidos 5 discos de 9 mm de diâmetro para erlenmeyers de 125 ml de capacidade contendo 75 ml de meio líquido SDY (peptona  $10\text{g.l}^{-1}$ ; dextrose  $40\text{g.l}^{-1}$ ; extrato de levedura  $10\text{g.l}^{-1}$ , autoclavados por 20 minutos a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), que foram colocados sob agitação em agitador orbital (Lab-line- incubator-shaker modelo NT 711) à 150 rpm e  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 7 dias para a produção de micélio.

Do micélio produzido em SDY, 20 ml foram transferido para sacos plásticos autoclaváveis de 42 cm de comprimento por 28 cm de largura contendo 200 gramas de arroz parboilizado umedecidos com 120 ml de água destilada, autoclavados por 20 minutos a  $120^{\circ}\text{C}$ . O cultivo ocorreu em sala de incubação à temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas alternados claro/escuro. Essa iluminação foi obtida por meio de lâmpadas fluorescentes de 22 W instaladas a longo de prateleiras distantes 30 cm entre si, fornecendo luminosidade média de 1.063 lux. O ambiente escuro foi atingido por luminosidade máxima de 10 lux. Após 17 dias de crescimento, os sacos foram abertos para secagem em incubadora tipo BOD à  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 dias.

## **1.3) Aplicação e avaliação**

O fungo produzido no arroz parboilizado foi extraído em solução de Tween 80 à 0,05%, lavando-se duas vezes, por peneiramento, e a suspensão foi ajustada à concentração de  $3.10^5$  esporos. $\text{ml}^{-1}$  e aspergida na superfície foliar das plantas.

As aplicações foram realizadas com pulverizador costal manual com capacidade para 20 litros. Foram feitas 6 aplicações quinzenais, sempre ao entardecer entre as 17:00 e 18:00 horas.

As avaliações foram iniciadas 45 dias após a primeira aplicação dos tratamentos, repetindo-se a cada 45 dias em todas as plantas que apresentaram lançamentos com folhas no estágio C ou CD (Hallé *et al.*, 1978), totalizando 3 avaliações. Para avaliar o experimento foi utilizada a Escala Diagramática Modificada (Gasparotto *et al.*, 1989a), baseada na área foliar lesionada, anotando-se a severidade da doença de 9 folíolos por planta (Figura 1). Avaliou-se 10 plantas por tratamento em cada bloco ao acaso.

A presença de *D. pulvinata* sobre as lesões de *M. ulei* foi visualizada com o auxílio de uma lupa manual com aumento de 10 vezes e, para a confirmação do agente de biocontrole, foram coletadas amostras de folhas, que eram acondicionadas em sacos de papel e posteriormente examinadas ao microscópio. Avaliou-se 4 folíolos em cada tratamento quanto à porcentagem de estromas de *M. ulei* colonizados pelo hiperparasita. Também foram feitas 3 avaliações em intervalos de 45 dias.

Cada leitura realizada foi anotada em uma planilha de campo, os dados foram tabulados e submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

CLASSE	SUB-CLASSE	DIAGRAMA	ÁREA FOLIAR LESIONADA (%)	CLASSE	SUB-CLASSE	DIAGRAMA	ÁREA FOLIAR LESIONADA (%)
1	1		0	3	1		6
	2		0,2		2		8
	3		0,4		3		10
	4		0,6		4		12
	5		0,8		5		15
2	1		1	4	1		18
	2		2		2		21
	3		3		3		24
	4		4		4		27
	5		5		5		30
				5	1		40
					2		50
					3		65
					4		80
					5		100

**Figura 1.** Escala Diagramática Modificada ilustrando lesões do mal-das-folhas em folíolos de seringueira (Fonte: Gasparotto *et al.*, 1989a).

## 2) Avaliação de agrotóxicos sobre o crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de agrotóxicos no crescimento e esporulação das 4 linhagens de *D. pulvinata* em meio de cultura.

Em frascos contendo o meio BDA devidamente esterilizado ainda líquido, à temperatura de aproximadamente 40 °C, adicionou-se os agrotóxicos, utilizando-se 1/3 das concentrações recomendadas (Tabela 1), sendo posteriormente distribuídos em placas de Petri. Como testemunha empregaram-se placas contendo apenas BDA. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Discos de micélio do fungo com 10 dias de idade e 9 mm de diâmetro foram colocados no centro da placa, com o micélio voltado para baixo. O cultivo do fungo ocorreu em incubadora, tipo BOD, a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 16 dias de cultivo, procedeu-se a determinação do diâmetro das colônias. As medidas dos diâmetros foram tomadas em duas linhas perpendiculares, passando pelo centro da placa, com auxílio de uma régua milimetrada. A esporulação foi avaliada aos 17 dias após inoculação. Adicionou-se 10 ml de solução de Tween 80 à 0,05% por placa e procedeu-se raspagem das colônias com a alça de Drigalski para homogeneização dos esporos. Retiraram-se alíquotas para contagem de esporos em câmara de Neubauer.

Os dados obtidos foram submetidos a análise fatorial (linhagens x agrotóxicos) aplicando-se o teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

**Tabela 1.** Descrição de agrotóxicos avaliados quanto aos seus efeitos no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*.

<b>Nome comercial</b>	<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Grupo químico</b>	<b>Classe</b>	<b>Dose utilizada/500ml de meio de cultura</b>
Benlate	Benomyl	Benzimidazol	Fungicida	0,12 g
Derosal	Carbendazim	Benzimidazol	Fungicida	0,05 ml
Dithane	Mancozeb	Alquilenobis (ditiocarbamato)	Fungicida e Acaricida	0,3 g
Malathion	Malationa	Organosforado	Acaricida e Inseticida	0,5 ml
Manzate	Mancozeb	Alquilenobis (ditiocarbamato)	Fungicida e Acaricida	5,5 g
Thiodan	Endosulfan	Clorociclodieno	Acaricida e Inseticida	5 ml
Tilt	Propiconazol	Triazol	Fungicida	0,7 ml

### 3) Efeito de adjuvantes no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*

Neste trabalho avaliaram-se oito produtos quanto aos seus efeitos sobre o crescimento micelial e esporulação das quatro linhagens de *D. pulvinata*.

Foram utilizadas placas de Petri com meio BDA, cada uma recebendo 1 disco de micélio de colônia com 9 mm de diâmetro e 10 dias de idade das linhagens em estudo. Estes discos foram previamente mergulhados por 24 horas em soluções preparadas com 20 ml de água destilada estéril em tubos “falcon” de 50 ml de capacidade, contendo os respectivos adjuvantes nas dosagens recomendadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Descrição dos adjuvantes avaliados quanto aos seus efeitos no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata* e dose comercial indicada.

Nome comercial	Composição	Dose/100 l de calda
Agral	Nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol 200 g/l	30 ml <sup>1</sup>
Assist	Óleo mineral parafínico 756 g/l	1000 ml <sup>1</sup>
Extravon	Aquil-fenol poliglicoleter 250 g/l	10 ml <sup>1</sup>
Iharaguen's	Polioxietileno alquifenol éter 200g/l	5 ml <sup>1</sup>
Natur'l óleo	Ésteres de ácidos graxos com glicerol (930 ml/l)	1000 ml <sup>1</sup>
Tween 80	Polioxietileno monolaurático	20 ml <sup>2</sup>
Tween 20	Polioxietileno monolaurático	20 ml <sup>2</sup>
Sacarose	Sacarose	2 kg <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Organização Andrei Editora Ltda. 1999.

<sup>2</sup>Ávila, 2002.

<sup>3</sup>Borges Neto *et al.*, 1997.

Foram preparadas 2 tipos de testemunha: em uma, os discos de micélio ficaram mergulhado somente em água destilada durante 24 horas e posteriormente foram colocados

em placas com BDA; e na outra, os discos foram retirados diretamente das colônias do fungo e depositados na placa.

A incubação e avaliação foram realizadas da mesma maneira do experimento anterior.

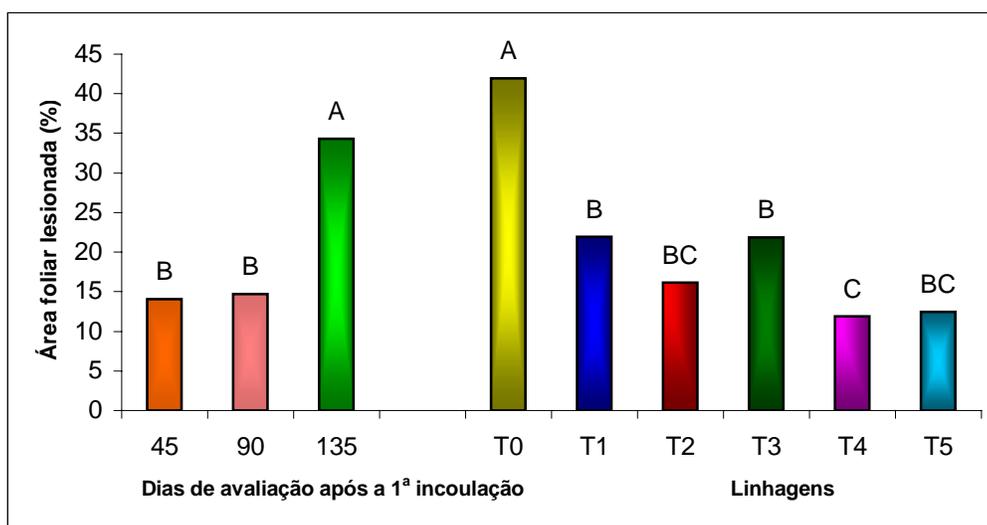
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **1) Avaliação de linhagens de *Dicyma pulvinata* para o biocontrole do mal-das-folhas da seringueira sob condições de campo**

Nas avaliações de severidade da doença observa-se que não ocorreu interação entre as três avaliações realizadas e as linhagens utilizadas no ensaio. Até os 90 primeiros dias do experimento, a severidade da doença permaneceu estatisticamente semelhante, porém na terceira avaliação com 135 dias, esta foi bem mais elevada. Tal fator poderia ser explicado por ter chegado ao final do efeito residual dos tratamentos aplicados, aumentando consideravelmente a quantidade de inóculo do patógeno no campo. Resultados semelhantes foram observados por Delmadi (2002), onde após o 35º dia de avaliação não existiam diferenças entre os tratamentos com *D. pulvinata*, com o fungicida e testemunha, e a porcentagem de incidência de *M. ulei* em seringueiras, em resposta aos tratamentos químicos e biológicos em condições de campo, tinha aumentado.

Em todas as avaliações, a porcentagem de área foliar lesionada foi superior no tratamento testemunha, onde não se fez nenhum tipo de aplicação, demonstrando a necessidade de controle do mal-das-folhas na região. A linhagem CEN 62 mostrou-se mais eficiente no controle da doença apresentando plantas com folíolos menos lesionados pelo *M. ulei*. Porém este tratamento não diferiu estatisticamente dos tratamentos 2 e 5 nos quais

se utilizou o CEN 93 e o produto químico, respectivamente. Quando aos tratamentos onde se fez o uso das linhagens CEN 58 e CEN 91, os mesmos apresentaram baixa quantidade de área foliar lesionada, se comparadas com a testemunha, embora esse valor tenha sido elevado em comparação com os demais tratamentos que apresentaram maior controle do mal-das-folhas (Figura 2).



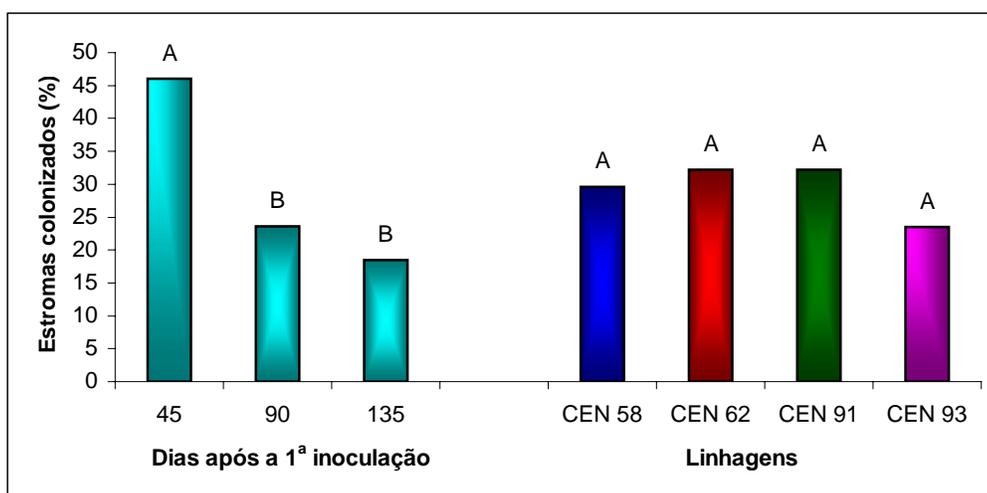
**Figura 2.** Porcentagem de incidência de *Microcyclus ulei* em seringueira em resposta aos tratamentos, em condições de campo. T0= Testemunha; T1= CEN 91; T2= CEN 93; T3= CEN 58; T4= CEN 62; T5= Fungicida. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV= 37,87.

Quanto à porcentagem de estromas colonizados por *D. pulvinata* verificou-se que não houve interação significativa entre os fatores períodos de avaliação e linhagens. Para todas as linhagens testadas, 45 dias após a primeira aplicação apresentou maior porcentagem de colonização de estromas de *M. ulei* pelo hiperparasita. Essa porcentagem foi decrescendo nas avaliações posteriores (Figura 3).

Em experimento realizado em casa de vegetação com 20 linhagens de *D. pulvinata* por Mello *et al.* (2005), verificou-se que CEN 93 destacou-se entre as demais, mostrando-se extremamente agressivo ao *M. ulei*. No presente trabalho, essa linhagem apresentou a

mesma eficiência das demais testadas sob condições de campo, em termos de colonização dos estromas do patógeno.

Bettiol (1991), coloca como característica importante na seleção de microrganismos atuantes como agente de controle biológico, a presença deste no local onde o controle será aplicado. Neste ensaio, foi demonstrado que nem sempre essa característica é fundamental, já que a linhagem CEN 91 procedente de Ituberá (BA), onde a aplicação foi realizada, embora tenha sido eficiente no controle se comparada à testemunha, não se destacou entre os outros tratamentos.



**Figura 3.** Porcentagem de estromas de *Microcyclus ulei* colonizados por *Dicyma pulvinata* em diferentes períodos de avaliação, após a 1ª inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV= 26,58.

O controle biológico de patógenos foliares pode apresentar baixa eficiência em campo, geralmente devido a falta de um bom agente veiculante de inóculo, à tecnologias desfavoráveis para a aplicação ou pelo impacto causado pelo ambiente (Mitchell & Taber, 1986; Mitchell *et al.*, 1986).

Conforme Rocha & Vasconcelos Filho (1978) o sudeste da Bahia é classificado no nível de incidência intermediária, onde o clima é altamente favorável a doença. Segundo Gasparotto *et al.* (1989b), a temperatura e o período de molhamento foliar influenciam significativamente a infecção de folíolos de seringueira por *M. ullei*.

No presente estudo, verificou-se uma umidade relativa média de 97 % e temperatura com máxima de 26 °C e mínima de 19,5 °C nos dias de aplicação dos tratamentos em campo. Além disso, foi observada durante todo o período de realização dos ensaios, uma alta pluviosidade na região. Estas condições são altamente favoráveis ao aumento da incidência de *M. ullei* e podem ter afetado o controle da doença, sob elevada pressão de inóculo.

O sucesso parcial do controle biológico tem sido mostrado em testes de campo com alguns agentes de controle biológico, os quais abrem conhecimento para relatar os impactos no ambiente e desenvolver a aplicação de tecnologias (Mitchell *et al.*, 1986).

Em ensaio de campo conduzido por Delmadi (2002), utilizou-se tratamentos com 3 concentrações cada, de aplicação de *D. pulvinata* ( $4,05 \times 10^6$ ,  $8,10 \times 10^6$  e  $1,21 \times 10^7$  conídios.ml<sup>-1</sup>), e dois tratamentos com fungicidas (mancozeb e benomyl) em seringal adulto. Estas concentrações mostraram um comportamento semelhante, com redução na porcentagem de incidência de *M. ullei*, nos primeiros 20 dias de leitura. Mancozeb não atuou como controlador para a doença e benomyl reduziu a porcentagem do mal-das-folhas aproximadamente 15 dias após a sua aplicação. Ocorreu um aumento na porcentagem de incidência de *M. ullei* a partir dos dias 28 e 35, o que pode ser justificado pelos altos índices pluviométricos neste período, contribuindo assim para uma possível lavagem das folhas onde foram aplicados os tratamentos com o hiperparasita.

Segundo Ghini (1991), o controle biológico sofre diversas influências. Devido à sua constante dependência de fatores bióticos e abióticos, pode ser considerado como complemento para outras medidas de controle.

Em trabalho realizado por Junqueira & Gasparotto (1991), estes admitem que o controle do mal-das-folhas com o micoparasita *D. pulvinata*, associado com outros métodos de controle como o controle por resistência genética e/ou com o controle cultural, poderá ter muito valor prático nas regiões úmidas e quentes, como no Estado do Amazonas e Sul do Estado da Bahia.

Gasparotto *et al.* (1989c), verificaram que não houve controle do mal-das-folhas com aplicação de *D. pulvinata* no clone IAN 717 (altamente suscetível ao patógeno). Em jardim clonal e em seringal policlonal, o hiperparasita reduziu a incidência da doença mesmo em clones altamente susceptíveis. Nesses plantios, *D. pulvinata* sobreviveu até três anos após a sua aplicação, colonizando em alguns clones até 95 % dos estromas.

Em viveiro e em plantios definitivos ainda jovens (cerca de 4 a 5 anos) o controle biológico do mal-das-folhas tem-se mostrado eficiente, já que a presença do *M. ulei* tem permitido uma multiplicação de *D. pulvinata*, reduzindo conseqüentemente a densidade do patógeno na área de plantio (Junqueira *et al.*, 1986).

Os antagonistas que falham no teste de campo não devem ser considerados sem valor e não devem ser descartados. Uma rápida morte no filoplano pode levar ao fracasso do agente *in vivo*. Esse agravante poderá ser corrigido por manipulações que possam proteger o inóculo da dessecação, promovendo a adesão entre outros. Quando o antagonista não consegue se estabelecer no filoplano, este pode ser melhorado quanto à característica de colonização (Bettioli, 1991).

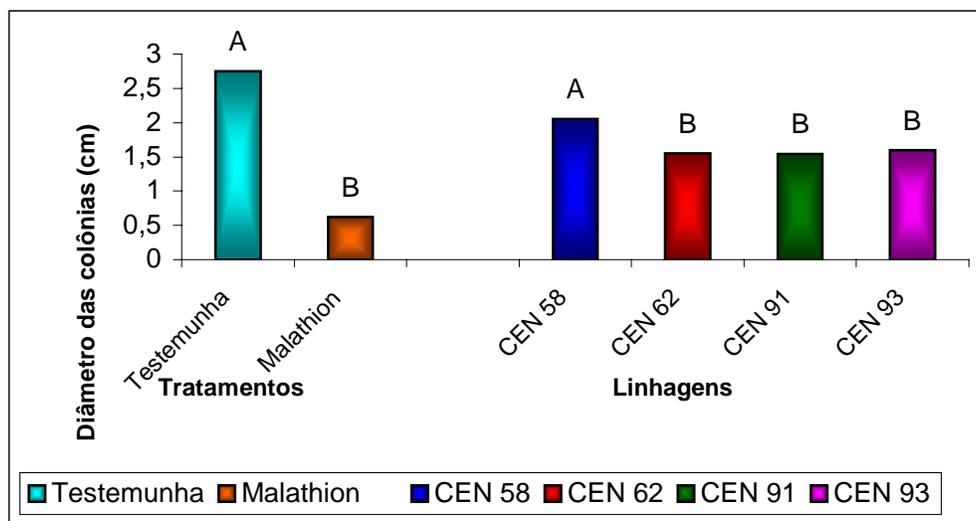
Delmadi (2002), aponta que o controle biológico não apresenta efeito imediato e espetacular e seu uso isoladamente pode estar abaixo do necessário para evitar danos à produção. Desta forma, há necessidade de integração entre diferentes métodos e o controle biológico deve atuar em um contexto de equilíbrio ecológico (Bettiol & Ghini, 1995).

Com este estudo, comprovou-se que linhagens de *D. pulvinata* possuem potencial para o controle do mal-das-folhas em campo. Portanto o seu uso integrado com outras formas de controle poderia ser indicado para a redução dos danos causados pela doença.

## **2) Avaliação de agrotóxicos sobre o crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata***

Verificou-se inibição do crescimento, para todas as linhagens, com todos os produtos avaliados, exceto em Malathion, onde se constatou desenvolvimento de *D. pulvinata*.

Na observação do crescimento micelial do diâmetro das colônias aos 16 dias de idade, verifica-se que não houve interação entre os fatores linhagens e agrotóxicos. A testemunha apresentou maior crescimento, destacando-se a linhagem CEN 58 entre as demais avaliadas (Figura 4).



**Figura 4.** Crescimento micelial de *Dicyma pulvinata* aos 16 dias em meio de cultivo BDA (testemunha) e meio acrescido de Malathion. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV= 18,09.

A esporulação de *D. pulvinata* foi constatada em Malathion, porém as médias apresentaram menor quantidade de esporos.ml<sup>-1</sup> quando comparadas às testemunhas nas linhagens CEN 58 e CEN 91. Nas demais as médias foram semelhantes para os dois tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Esporulação de *Dicyma pulvinata* em BDA (testemunha) e meio acrescido de Malathion.

Tratamentos	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
Malathion	1,82 Ba*	0,27 Ab	0,77 Bab	0,55 Ab
Testemunha	5,25 Aa	0,80 Ac	3,72 Ab	1,20 Ac

CV= 13,18

\*Esporulação média (x10<sup>5</sup> esporos.ml<sup>-1</sup>). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na vertical e minúscula na horizontal) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Neste estudo, buscou-se o crescimento e esporulação de *D. pulvinata* em dosagens de agrotóxicos inferiores as comerciais, com intuito de averiguar o potencial para um

controle integrado do mal-das-folhas. Ghini (1991), aponta que a integração entre controle químico e biológico pode ser alcançada por aplicações de doses relativamente baixas dos produtos químicos, com o propósito de estressar o patógeno, tornando-o vulnerável aos microrganismos antagônicos.

A busca por métodos conjuntos de controle é considerada uma alternativa promissora no controle de doenças. O uso contínuo e exclusivo de um fungicida em uma determinada doença pode promover o desenvolvimento de linhagens resistentes e atrapalhar a eficiência do controle (Ghini, 1991). Isolados de *M. ulei* resistentes ao fungicida benomyl já foram detectados por Hashim (1988).

Os resultados obtidos neste ensaio demonstram incompatibilidade de *D. pulvinata* com os demais agrotóxicos avaliados, mesmo em baixas concentrações das dosagens comerciais. Este fator demonstra que devem ser estruturadas estratégias de uso destes produtos para que não ocorra interferência dos mesmos na eficiência do antagonista.

Em ensaio realizado por Mitchell & Taber (1986), foram testados agrotóxicos utilizados no controle da mancha-tardia-foliar causada por *Cercosporidium personatum* em amendoim, com a finalidade de verificar se os mesmos provocavam inibição no crescimento de *D. pulvinata*. Benomyl, Mancozeb e Triphenyltin foram testados em concentrações similares as das usadas em doses comerciais em aplicações no campo e impediram completamente a germinação de *D. pulvinata*.

Foi observada uma diminuição no crescimento de *D. pulvinata* quando alguns fungicidas são aplicados simultaneamente ao hiperparasita. Porém, este fungo já foi reisolado de lesões colonizadas por *Cladosporium fulvum*, depois de serem tratadas com fungicidas (Peresse & Picard, 1983).

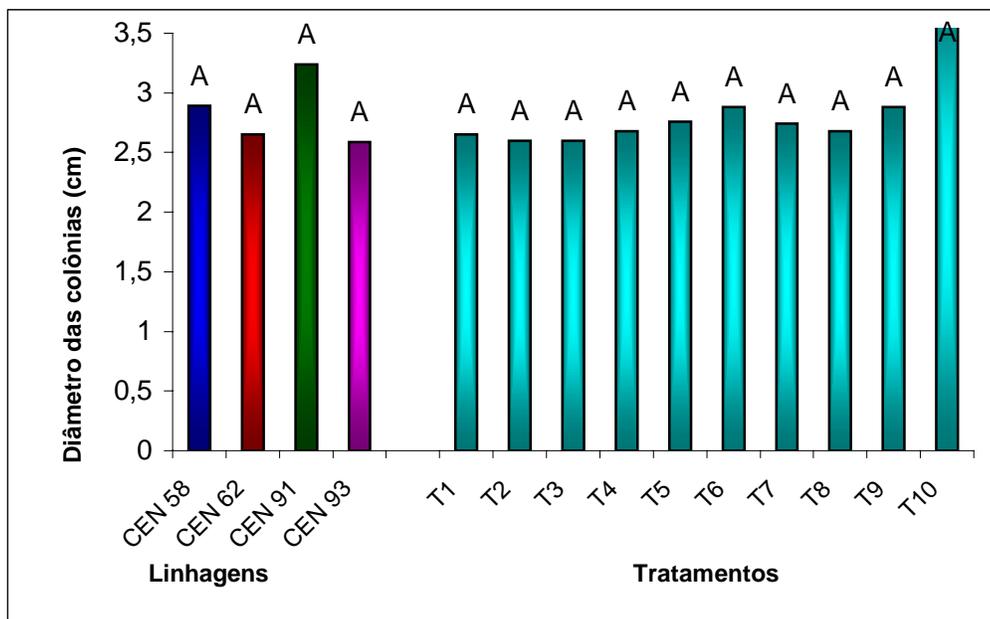
No experimento realizado por Tirilly (1991), com *D. pulvinata* utilizando a pulverização de uma solução contendo 500 mg.l<sup>-1</sup> do fungicida sistêmico fosetyl-Al, este não afetou a colonização de lesões de *Cladosporium fulvum* pelo hiperparasita. No método de controle integrado, o agente de controle biológico diminuiu o inóculo potencial do patógeno por morte dos esporos e colonização das lesões, e o fungicida preveniu reinfecções por resíduos viáveis de esporos de *Cladosporium fulvum*. Porém com a adição de 500 ou 1000 mg.l<sup>-1</sup> deste fungicida em meio de cultura o mesmo causou inibição do crescimento de *D. pulvinata* in vitro.

Os métodos de controle químico e biológico podem ser utilizados de maneira integrada, quando a população do antagonista for menos afetada pelo fungicida do que o patógeno, ou quando os antagonistas forem capazes de colonizar a superfície de plantas após o tratamento químico numa velocidade maior do que o patógeno (Ghini, 1991).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, há necessidade de se avaliar a compatibilidade de linhagens de *D. pulvinata* com outros químicos, visando o uso integrado do fungo com fungicidas.

### **3) Efeito de adjuvantes no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata***

Na Figura 5, estão apresentados os resultados referentes ao diâmetro das colônias de *D. pulvinata*, cultivadas por 16 dias, em BDA após ser mergulhado por 24 horas nos diferentes adjuvantes. De acordo com os dados obtidos, os adjuvantes não interferiram no crescimento do fungo e não houve diferenças estatísticas entre as linhagens avaliadas.



**Figura 5.** Crescimento micelial de *D. pulvinata* aos 16 dias em diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados por SQRT ( $x + 0,5$ ). Tratamentos: T1 = Agral; T2= Assist; T3 = Extravon; T4 = Iharanguen's; T5= Natur'l óleo; T6 = Tween 80; T7 = Tween 20; T8 = Sacarose; T9= Fungo + água; T10 = Fungo não tratado. CV= 13,59.

Estes dados são semelhantes ao trabalho de Borges Neto *et al.* (1997), onde os adjuvantes avaliados não interferiram no crescimento de *Cercospora caricis*, candidato ao controle biológico de uma espécie daninha (*Cyperus rotundus* L.).

Quanto à esporulação, em todos adjuvantes avaliados independente da linhagem observou-se produção de esporos. Para a linhagem CEN 58, os tratamentos com Tween 80 e Tween 20 não diferiram-se das testemunhas, apresentando os maiores valores de esporos.ml<sup>-1</sup>. Na linhagem CEN 62 ocorreu uma redução na quantidade de esporos produzidos quando se fez o uso dos adjuvantes Assist e Extravon, para os demais tratamentos não constatou-se diferenças significativas. Para a linhagem CEN 91 e CEN 93, em todos os tratamentos, foram observadas semelhanças na esporulação não diferindo-se entre si (Tabela 4).

**Tabela 4.** Esporulação de colônias de *Dicyma pulvinata* tratadas com diferentes adjuvantes em meio BDA

Tratamento	Linhagens			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
Agral	1,38 Bca*	1,05 ABab	1,23 Aab	0,85 Aa
Assist	1,24 BCa	0,89 Ba	1,22 Aa	0,92 Aa
Extravon	1,31 BC a	0,91 Bb	0,84 Ab	0,90 Ab
Iharanguen's	1,13 Ca	1,14 Aba	1,20 Aa	1,05 Aa
Natur'l óleo	1,44 BCa	1,13 ABab	1,26 Aab	0,95 Ab
Tween 80	1,93 Aa	1,19 Abb	1,03 Ab	0,92 Ab
Tween 20	1,56 ABCa	0,99 Abb	1,16 Ab	1,05 Ab
Sacarose	1,34 BC	1,10 ABab	0,91 Ab	0,94 Ab
Fungo + água	1,62 ABa	1,44 Aab	1,22 Abc	1,05 Ac
Fungo **	1,70 ABa	1,39 Aab	1,22 Ab	1,04 Ab

CV= 17,61

\*Esporulação média ( $\times 10^5$  esporos.ml<sup>-1</sup>). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na vertical e minúscula na horizontal) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados por SQRT (x + 0,5). \*\*Discos de micélio não tratado.

Os fungos podem diferir quanto sua reação, ao serem utilizados em conjunto com adjuvantes (Ávila, 2002). Isto ressalta a importância da realização de estudos que avaliem estes aspectos.

Daigle & Cotty (1991), constataram em ensaios com o fungo *Alternaria cassiae*, que Tween 80 favoreceu a germinação dos conídios e melhorou sua infecção sobre a planta. Neste experimento com *D. pulvinata*, Tween 80 e Tween 20, mostraram-se compatíveis com todos as linhagens em estudo.

Em trabalho realizado por Mitchell *et al.* (1986), verificou-se a importância de se utilizar produtos que possam favorecer a sobrevivência do fungo após sua aplicação. *D. pulvinata* foi pulverizado em água e em formulação com diferentes produtos e utilizando duas condições ambientais (iniciando a pulverização com a planta seca ou molhada) em

lesões causadas por *Cercosporidium personatum* em amendoim. Observou-se uma colonização mais rápida do patógeno na planta, quando os esporos de *D. pulvinata* foram suspensos em água. Dos produtos avaliados, o CMC (metilcelulose), exibiu uma menor variabilidade entre as duas condições testadas. Este fato demonstra que quando não há formulação o fungo fica desprotegido, podendo ser lavado pela água.

Mitchell & Taber (1986), sugerem que, para o uso comercial de *D. pulvinata*, é importante determinar o tipo de formulação na qual os esporos sobrevivam melhor. Em ensaio realizado por esses autores, quando os esporos foram suspensos em Tween 80, glicerol (ambos em diferentes tipos de concentrações) e 0,4 e 0,8 % CMC (metilcelulose) foi observada baixa concentração de *D. pulvinata*.

O desenvolvimento de formulações que promovam não somente a distribuição e adesão de partículas fúngicas sobre a superfície foliar, mas também garantam a proteção do fungo contra a dessecação, amenizando os efeitos ambientais adversos, são aspectos a serem avaliados com diferentes produtos que poderão ser adicionados ao inóculo (Ávila, 2002), garantindo assim a eficácia do controle biológico.

## CONCLUSÕES

Conforme as condições de realização deste trabalho e de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A eficiência do controle biológico por *D. pulvinata* foi comprovada destacando-se as linhagens CEN 62 e CEN 93 com controle semelhante à aplicação do fungicida. Novos experimentos deverão ser conduzidos em diferentes condições ambientais (alta e baixa pressão da doença), testando-se outras linhagens do fungo e clones adultos de seringueira.
- O hiperparasita demonstrou incompatibilidade com os agrotóxicos avaliados, à exceção para o acaricida e inseticida Malathion.
- Quanto ao efeito dos adjuvantes em uso com *D. pulvinata*, não se observou inibição do crescimento e esporulação das linhagens utilizadas com os diferentes produtos avaliados. Estes adjuvantes devem ser testados em adição a suspensões de *D. pulvinata* em futuros experimentos de campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, Z.R. Estudo de *Cercospora piaropi* como agente de controle biológico de *Eichhornia crassites* e sua associação com o herbicida 2,4 D. (Tese de Doutorado). Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista. 2002.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: Bettiol, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 1-5.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIM FILHO, A., KIMATI, H. A. & AMORIM, L. (Ed) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo. pp. 717-728. 1995.
- BORGES NETO, C.R., MELLO, S.C.M., RIBEIRO, Z.M.A. & FONTES, E.M.G. Efeito de adjuvantes no crescimento e infectividade do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole da tiririca. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Pesquisa em Andamento, 8: 1-4. 1997.
- CARMO, C.A.F.S. & GOMES, R. Formação de mudas e instalação de seringal. Belo Horizonte. Informe Agropecuário - EPAMIG. 1985. pp. 22.
- DAIGLE, D.J. & COTTY, P.J. Factors that influence germination and mycoherbicidal activity of *Alternaria cassiae*. Weed Technology, Champaign 5: 82-86. 1991.
- DELMADI, L.C. Avaliação do potencial de uso do hiperparasita *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) no controle biológico do mal-das-folhas [*Microcyclus ulei* (P. Henn v. Arx.) de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss) Muell. Arg] em São José do Rio Claro - MT. (Dissertação de Mestrado). Mato Grosso. Universidade Federal do Mato Grosso. 2002.
- GASPAROTTO, L., ZAMBOLIM, L., RIBEIRO DO VALE, F.X., MAFFIA, L.A. & JUNQUEIRA, N.T.V. Epidemiologia do mal das folhas da seringueira. I- Ponte Nova- MG. Fitopatologia Brasileira 14(1): 65-70. 1989a.
- GASPAROTTO, L., ZAMBOLIM, L., MAFFIA, L.A., RIBEIRO DO VALE, F.X. & JUNQUEIRA, N.T.V. Efeito da temperatura e umidade sobre a infecção de seringueira (*Hevea* spp.) por *Microcyclus ulei*. Fitopatologia Brasileira 14: 38-41. 1989b.
- GASPAROTTO, L., LIMA, M.I.P.M., LIEBEREI, R. & NORMANDO, M.C.S. Potencial do fungo *Hansfordia pulvinata* no controle biológico do mal-das-folhas da seringueira. Fitopatologia Brasileira 14:158 (Resumo 271). 1989c.
- GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 201-217.

HALLÉ, F., OLDEMAN, R.A. & TOMLINSON, P.B. Tropical trees and forest. Berlin: Springer – Verlag. 1978.

HASHIM, I. Detection and characterisation of benomyl resistant strains of *Microcyclus ulei*. Journal of Natural Rubber Research 3: 155-162. 1988.

JUNQUEIRA, N.T.V., SILVA, S.E.L., SILVA, H.M. & SILVA, M.A.M. Controle biológico do “mal-das-folhas” da seringueira por *Hansfordia pulvinata*. Embrapa- CNPDS, 1986 (Pesquisa em andamento, n ° 40).

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. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 307-331.

KISHORE, G.K., PANDE, S. & PODILE, A.R. Management of late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogae*) with chlorothalonil-tolerant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Plant Pathology 54: 401-408. 2005.

MELLO, S.C.M., FRAZÃO, H.S. & SILVA, J.B.T. Capacidade germinativa e infectiva de isolados de *Dicyma pulvinata* antagonísticos a *Microcyclus ulei* mantidos em coleção de cultura. Agrociência 9: 421-426. 2005.

MITCHELL, J.K. & TABER, R.A. Factors affecting the biological control of *Cercosporidium* leaf spot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. Phytopathology 76: 990-994. 1986.

MITCHELL, K.J., TABER, R.A. & PETTIT, R.E. Establishment of *Dicyma pulvinata* in *Cercosporidium personatum* leaf spot of peanuts: effect of spray formulation, inoculation time, and hours of leaf wetness. Phytopathology 76: 1168 – 1171. 1986.

ORGANIZAÇÃO ANDREI. Compêndio de defensivos agrícolas: Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 6ª ed. São Paulo. 1999.

PERESSE, M. & PICARD, D.L.E. *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. Mycopathologia 71: 23-30. 1980.

ROCHA, H.M. & VASCONCELOS FILHO, A.P. Epidemiology of the South American leaf blight of rubber in the region of Ituberá, Bahia, Brazil. Turrialba 28: 325-329. 1978.

TIRILLY, Y. The role of fosetyl-al in the potential integrated control of *Fulvia fulva*. Canadian Journal of Botany 69: 306-309. 1991.

## **CAPÍTULO 4**

---

---

### **Estabilidade genética de linhagens do micoparasita *Dicyma pulvinata***

#### **INTRODUÇÃO**

Diversos isolados e linhagens de microrganismos com potencial para o controle biológico são mantidos em estoque de modo a serem preservados convenientemente, garantindo um valioso banco de germoplasma. Essa preservação é de fundamental relevância para que as formas isoladas da natureza ou modificadas através do melhoramento genético possam estar disponíveis quando necessárias, para o desenvolvimento de biopesticidas (Azevedo, 1991).

A avaliação da estabilidade dos isolados e linhagens de fungos agentes de controle biológico, mantidos em culturas, utilizados na produção de unidades infectivas e durante o uso no campo, é imprescindível para garantir sua eficiência patogênica. No desenvolvimento de produtos comerciais, o sucesso durante o processo de produção e estocagem está relacionado à garantia da estabilidade genética dos organismos (Inglis *et al.*, 2003). Segundo Fargues & Roberts (1983), a estabilidade genética de diferentes fungos vem sendo analisada e observa-se que, para algumas espécies, ocorre um declínio na patogenicidade após subcultivo seriado.

Durante o cultivo de fungos, muitas vezes, observa-se que setores são comumente formados e que estes diferem morfológicamente das culturas parentais (Ryan *et al.*, 2002). Kirk *et al.* (2001), descrevem a formação de setores como a mutação ou seleção em meio de cultivo em placa, que resulta em um ou mais setores que mudam sua forma de

crescimento. Prosser (1993), conclui que a formação de setores poderia ser resultado de um crescimento atípico, embora o mecanismo responsável por isso não pudesse ser explicado.

Alguns estudos sugerem a formação de setores como resultado de uma degeneração cultural causada pela idade da colônia, métodos de propagação ou tipo de meio de cultura (Shah & Butt, 2005). Os setores podem diferir da cultura parental em características morfológicas e fisiológicas, incluindo o declínio na produção de esporos e de certos metabólitos (Chu *et al.*, 2002; Gúzman-de-Penã & Ruiz-Herrera, 1997).

Formação de setores em culturas de agentes de controle biológico pode ter sérias implicações comerciais, como, por exemplo, a redução na produção de esporos e conseqüente elevação dos custos de produção, podendo tornar o fungo menos efetivo comparado aos agentes competidores, sob o ponto de vista comercial (Shah & Butt, 2005).

Técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas para a caracterização de isolados e linhagens de fungos com potencial de uso no controle de pragas. A variabilidade genética de isolados de *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & Curtis)] obtidos a partir de lesões de *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, procedentes do Brasil foi estudada usando marcadores RFLP, RAPD, AFLP e baseados na região IGS (Tavares *et al.*, 2004), demonstrando a existência de variabilidade entre linhagens de diferentes regiões. Dentre as técnicas mais comumente usadas, destacam-se o RAPD e RFLP. O RAPD, ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, utiliza oligonucleotídeos iniciadores de seqüências arbitrárias, que amplificam fragmentos de DNA anônimo, gerando bandas polimórficas. Esta técnica tem grande utilidade na diferenciação, reclassificação e estudos de diversidade genética de diversos fungos (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990; Boysen *et al.*, 1996; Tavares, 2004). O RFLP (polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição) detecta diferenças através de

digestão por enzimas de restrição do DNA genômico ou de uma região específica (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Devido às implicações potenciais da estabilidade na eficiência de uso de *D. pulvinata* para o controle de *M. ulei*, o presente trabalho teve por objetivo analisar as variações de linhagens monospóricas deste fungo, mantidas em coleção e durante o processo de produção, utilizando técnicas moleculares de RAPD e RFLP.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1) Linhagens utilizadas**

Este estudo foi realizado a partir da análise de 41 linhagens de culturas monósporas de *Dicyma pulvinata* cultivadas em meio BDA (Batata 200g.l<sup>-1</sup>; Dextrose 20g.l<sup>-1</sup>; Agar 20g.l<sup>-1</sup>), isoladas de lesões estromáticas de *M. ulei* desenvolvidas sobre folhas de seringueira, procedentes de diferentes regiões do Brasil. Essas linhagens pertencem à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Plantas Daninhas e Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que embora sejam preservadas na coleção de base em nitrogênio líquido e sob ultracongelamento (-80 °C), mantém-se em duplicata em tubos contendo meio BDA, a 4 °C.

As linhagens selecionadas para prosseguir os estudos foram: CEN 58 e CEN 62, procedentes de Ouro Preto (RO) e Belém (PA), respectivamente. A linhagem CEN 58 foi considerada como morfológicamente estável por conter crescimento uniforme e a CEN 62 como instável, por apresentar setores.

### **2) Cultivo do fungo e análise da estabilidade morfológica**

As linhagens mantidas na coleção foram cultivadas em meio BDA e incubadas a 25°C. Para a análise da estabilidade das colônias, procedeu-se repicagem em meio BDA, de inóculos retirados do centro das colônias isoladas. A incubação ocorreu a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante aproximadamente 40 dias, para verificação da presença de setores e seleção de linhagens. Foram selecionadas duas linhagens: uma que apresentou setorização e outra aparentemente estável, sem formação de setores.

Amostras da borda da colônia da linhagem CEN 58, foram retiradas para repicagem em novo meio, sendo que este processo repetiu-se por quatro gerações consecutivas (Tabela 1). A cada geração, amostras do centro da colônia eram utilizadas para inoculação em meio líquido SDY (peptona 10g.l<sup>-1</sup>; dextrose 40g.l<sup>-1</sup>; extrato de levedura 10g.l<sup>-1</sup>; previamente autoclavados por 20 minutos a 120 °C) e incubadas em agitador orbital (Lab-line incubator-shaker modelo NT 711), a 150 rpm e 25 °C para posterior extração de DNA. Os centros das colônias foram retirados e divididos em duas partes, ou seja, uma metade foi repicada para meio de cultura BDA (que serviu para posterior inoculação do fungo em arroz parboilizado) e outra metade, utilizada para crescimento de micélio em meio líquido, segundo descrito acima, e extração de DNA. Este processo foi repetido por quatro gerações, sendo as amostras utilizadas para análise da estabilidade genética.

Para a inoculação da linhagem no substrato arroz parboilizado foram utilizados 5ml da suspensão, na concentração de  $1,0 \times 10^6$  esporos.ml<sup>-1</sup>, preparada a partir de colônias desenvolvidas em meio BDA. O substrato foi preparado em frascos do tipo erlenmeyers de 500 ml de capacidade contendo 50 g de arroz parboilizado, umedecidos com 30 ml de água destilada e autoclavados à 120 °C durante 20 minutos. A incubação foi mantida por 15 dias à 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período foi preparada uma suspensão dos esporos para inoculação em SDY líquido, obtendo-se assim, micélio para extração de DNA e reinoculação em arroz. Esse processo repetiu-se por quatro gerações e as amostras foram utilizadas para análise molecular.

A mesma metodologia foi utilizada com a linhagem CEN 62, exceto por se terem retirado amostras de setores oriundos das colônias, no lugar de amostras da borda para a repicagem, como se fez com a linhagem CEN 58 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Descrição das amostras utilizadas para a realização das análises de estabilidade morfológica e genética.

<b>Amostra</b>	<b>Código da amostra</b>	<b>Especificação dos códigos</b>
1.	CEN58-1 <sup>a</sup> G	Amostra parental da linhagem CEN 58- 1 <sup>a</sup> geração
2.	CEN58B1-2 <sup>a</sup> G	2 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda 1 da amostra 1
3.	CEN58B1S1-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir do setor 1 da amostra 2
4.	CEN58B1S1B1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda da amostra 3
5.	CEN58B1S2-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir do setor 2 da amostra 2
6.	CEN58B1S2B1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda da amostra 5
7.	CEN58B1S3-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir do setor 3 da amostra 2
8.	CEN58B1S3B1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda da amostra 7
9.	CEN58B2-2 <sup>a</sup> G	2 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda 2 da amostra 1
10.	CEN58B2S1-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir do setor 1 da amostra 9
11.	CEN58B2S1B1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda 1 da amostra 10
12.	CEN58B3-2 <sup>a</sup> G	2 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda 3 da amostra 1
13.	CEN58B3B1-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda 1 da amostra 12
14.	CEN58B3B1B1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 repicada à partir da borda 1 da amostra 13
15.	CEN58-1 <sup>a</sup> G em arroz	Amostra parental da linhagem CEN 58 cultivada em arroz- 1 <sup>a</sup> geração
16.	CEN58-2 <sup>a</sup> G em arroz	2 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 cultivada em arroz repicada à partir da amostra 15
17.	CEN58-3 <sup>a</sup> G em arroz	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 cultivada em arroz repicada à partir da amostra 16
18.	CEN58-4 <sup>a</sup> G em arroz	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 58 cultivada em arroz repicada à partir da amostra 17
19.	Cultura monospórica 1-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 1 da linhagem CEN 58 repicada à partir da amostra 18
20.	Cultura monospórica 2-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 2 da linhagem CEN 58 repicada à partir da amostra 18
21.	Cultura monospórica 3-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 3 da linhagem CEN 58 repicada à partir da amostra 18
22.	Cultura monospórica 4-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 4 da linhagem CEN 58 repicada à partir da amostra 18

**Tabela 1.** Continuação.

<b>Amostra</b>	<b>Código da amostra</b>	<b>Especificação dos códigos</b>
23.	Cultura monospórica 5-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 5 da linhagem CEN 58 repicada à partir da amostra 18
24.	CEN62-1 <sup>a</sup> G	Amostra parental da linhagem CEN 62- 1 <sup>a</sup> geração
25.	CEN62B1-2 <sup>a</sup> G	2 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir da borda 1 da amostra 24
26.	CEN62B1S1-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir do setor 1 da amostra 25
27.	CEN62S1.1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir do setor 1 da amostra 26
28.	CEN62S1-2 <sup>a</sup> G	2 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir do setor 1 da amostra 24
29.	CEN62S1B1-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir da borda da amostra 28
30.	CEN62S1B1S1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir do setor 1 da amostra 29
31.	CEN62S2-2 <sup>a</sup> G	2 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir do setor 2 da amostra 24
32.	CEN62S2.1-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir do setor 1 da amostra 31
33.	CEN62S2.1B1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir da borda da amostra 32
34.	CEN62S2.2-3 <sup>a</sup> G	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir do setor 2 da amostra 31
35.	CEN62S2.2B1-4 <sup>a</sup> G	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 repicada à partir da borda da amostra 34
36.	CEN62-1 <sup>a</sup> G em arroz	Amostra parental da linhagem CEN 62 cultivada em arroz- 1 <sup>a</sup> geração
37.	CEN62-2 <sup>a</sup> G em arroz	2 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 cultivada em arroz repicada à partir da amostra 36
38.	CEN62-3 <sup>a</sup> G em arroz	3 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 cultivada em arroz repicada à partir da amostra 37
39.	CEN62-4 <sup>a</sup> G em arroz	4 <sup>a</sup> geração da linhagem CEN 62 cultivada em arroz repicada à partir da amostra 38
40.	Cultura monospórica 1-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 1 da linhagem CEN 62 repicada à partir da amostra 39
41.	Cultura monospórica 2-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 2 da linhagem CEN 62 repicada à partir da amostra 39
42.	Cultura monospórica 3-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 3 da linhagem CEN 62 repicada à partir da amostra 39
43.	Cultura monospórica 4-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 4 da linhagem CEN 62 repicada à partir da amostra 39
44.	Cultura monospórica 5-a partir da 4 <sup>a</sup> G em arroz	Cultura monospórica 5 da linhagem CEN 62 repicada à partir da amostra 39

### **3) Extração de DNA**

O micélio foi coletado por filtração à vácuo em papel filtro, submetidos à lavagem em água destilada estéril e posterior secagem sobre papel filtro.

A extração de DNA genômico foi realizada segundo o método de Rogers & Bendich (1988) modificado. Cerca de 4 gramas de micélio foram triturados em nitrogênio líquido e mantidos a -20 °C. Ao macerado, foram adicionados 5 ml de CTAB 2X (2 % de CTAB; 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 20 mM de EDTA pH 8,0; 1,4 M de NaCl e 1 % de PVP) pré-aquecido a 65 °C, seguindo-se incubação durante 20 minutos a 65 °C. Adicionou-se um volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) frio e a mistura foi homogeneizada por meio de agitação em vortex e posteriormente centrifugada a 4400 rpm por 4 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 0,1 volume de CTAB 10 % (10 % de CTAB e 0,7 M de NaCl) pré-aquecido a 65 °C, procedendo-se mais uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). À fase aquosa, coletada em novo tubo, foi adicionado 1 volume de isopropanol e misturado por inversão, para precipitação do DNA. A amostra foi então centrifugada a 4400 rpm durante 10 minutos e adicionada de 3 ml de etanol 70 %. Procedeu-se nova centrifugação a 4400 rpm por 5 minutos e em seguida descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido a secagem ao ar livre, ressuspenso em 499 µl de TE (10mM de Tris- HCL pH 8,0; 1mM de EDTA pH 8,0 ) e tratado com 1 µl de RNase A (ribonuclease A) por uma hora a 37 °C. A remoção e desnaturação da RNase e de outras proteínas foi feita por extração com um volume de fenol/clorofórmio (1:1), sendo a amostra agitada em vortex e centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para eppendorf estéril, onde adicionou-se um volume de isopropanol e 1/10 de volume de 5M de NaCl, procedendo-se nova centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi descartada, e o DNA lavado

em 500 µl de etanol 70 % e precipitado por centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e realizou-se nova centrifugação a 13000 rpm por alguns segundos. O DNA precipitado foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 200 µl de TE. A concentração final de DNA foi determinada em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio, através de comparação com concentrações conhecidas de DNA do bacteriófago lambda.

#### **4) RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)**

As reações de RAPD foram realizadas em volume de 25 µl contendo 2,5 µl de tampão para PCR (1X); 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); 0,5 µl de dNTP's (0,2 mM); 1,25 µl de oligonucleotídeos (0,5 µM); 0,3 µl de *Taq* DNA polimerase (1,5 U); 17,7 µl de água estéril e 2 µl de DNA (10 ng.µl<sup>-1</sup>) genômico. Cinco primers decâmeros, conforme apresentado na Tabela 2, foram selecionados para a análise. A reação foi coberta com 50 µl de óleo mineral.

O termociclador (MJ Research), foi programado para desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de anelamento e extensão a 94 °C por 1 minuto, 35 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Aos produtos de amplificação foram adicionados 2,5 µl de tampão de amostra 10 X (0,3 % de bromofenol, 0,3 % de xilenolol, 65 % de sacarose, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 10 mM de EDTA), seguindo-se de análise em gel de agarose 1,5 % contendo brometo de etídeo (0,5 µg.ml<sup>-1</sup>). Como marcador, foi utilizado 100 bp-DNA Ladder (Amershan), o qual serviu como parâmetro para determinar o tamanho dos fragmentos de amplificação. Para visualização dos produtos de amplificações, o gel foi examinado sobre luz ultravioleta no sistema Eagle Eye II Still System<sup>TM</sup> (Stratagene).

**Tabela 2.** Seqüência de primers decâmeros (10pb) utilizados nos ensaios de RAPD.

Primers	Seqüência
P1.	CAATCGCCGT
P2.	CAGCACCCAC
P3.	GGTGACGCAG
P4.	CTGCTGGGAC
P5.	GTGTGCCCCA

A análise dos resultados foi realizada por comparação do padrão de bandas obtidos na geração parental com as gerações subseqüentes de cada linhagem. Do total de bandas resultantes, foi calculada uma porcentagem das que se diferenciaram da primeira geração do fungo em cada um dos primers. Obteve-se uma média dessa porcentagem, para os cinco primers utilizados.

##### **5) RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)**

Para RFLP, foi feita a digestão do DNA genômico com as enzimas de restrição, *Eco* RI e *Hind* III. Cada sistema de digestão de 30 µl, continha 1 µg de DNA genômico, 3 µl de tampão apropriado para cada enzima (10X), 1 µl de enzima de restrição (10 U. µl) e água milli-Q estéril para completar o volume. Os sistemas de digestão foram incubados a 37 °C durante 16 horas.

Foram adicionados 3,5 µl de tampão de amostra (0,3 % de bromofenol, 0,3 % de xilenocianol, 65 % de sacarose, 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 10 mM de EDTA) aos sistemas de digestões e, a seguir, estes foram analisados em gel de agarose 0,75 % com

brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e visualizado sobre luz ultravioleta. A documentação fotográfica foi feita no sistema Eagle Eye II Still System™ (Stratagene). Os Southern blots foram preparados através de transferência alcalina (NaOH 0,4 M) para a membrana Hybond-XL (Amershan), seguindo-se recomendações do fabricante. Após a transferência, as membranas foram lavadas com uma solução SSC 2X (NaCl 0,3 M e citrato trissódico 30 mM pH7,0) sendo, a seguir, secas e mantidas à temperatura ambiente.

Uma seqüência telomérica fúngica (TTAGGG)<sub>n</sub>, foi sintetizada por PCR (Ijdo *et al.*, 1991) e P<sup>32</sup>α- dCTP incorporado usando o kit Rediprime II (Amershan). A hibridização procedeu-se por cerca de 16 horas à 65 °C em uma solução contendo 0,25 M de fosfato de sódio (pH 7,2), 1mM de EDTA e 7 % de SDS. A membrana hibridizada foi lavada por 3 vezes à 65 °C por 20 minutos cada, com solução de 3 X SSC, 0,1 % SDS, sendo a membrana exposta a filme de raio X.

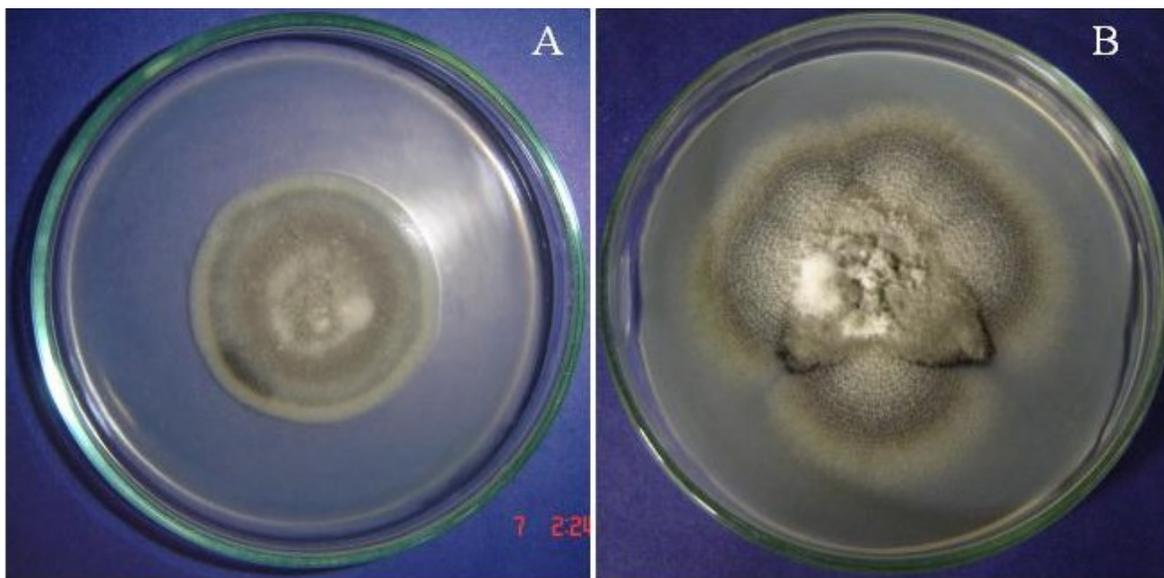
O filme foi revelado durante 1 minuto na solução reveladora (Kodak-Deltol), lavado em água, emergido em uma solução fixadora (Kodak), lavado novamente em água e seco em temperatura ambiente.

A análise dos resultados foi feita pela comparação do padrão de bandas obtidos entre as diferentes gerações do fungo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foi observada formação de setores em colônias de *D. pulvinata* em laboratório, nas duas linhagens avaliadas, os quais variaram em coloração, crescimento e densidade de esporulação. As maiores taxas de formação de setores ocorreram na linhagem selecionada

previamente como instável (CEN 62), por apresentar já na primeira repicagem diferenciação da colônia. Para CEN 58, supostamente estável morfologicamente, gerações subseqüentes da parental também apresentaram formação de setores (Figura 1).



**Figura 1.** A – 1ª Geração da linhagem CEN 58 selecionada como morfologicamente estável. B – 1ª Geração da linhagem CEN 62 apresentando setorização.

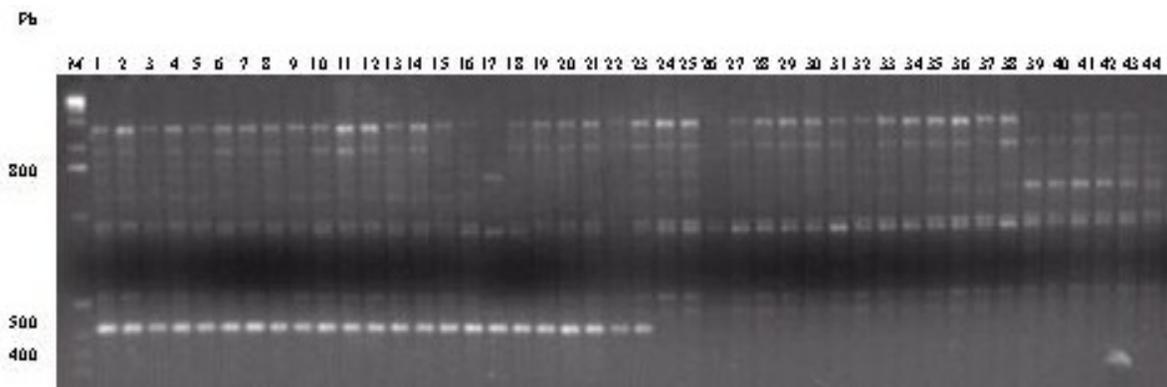
A setorização de colônias de fungos é frequentemente observada. Em culturas de *Fusarium oysporum* f. sp. *niveum*, por exemplo, observou-se que após repicagens sucessivas, setores foram formados e exibiram variação morfológica e de pigmentação (Kim, 1997). Ryan *et al.*, (2002) verificaram a formação de setores em culturas de *Metarhizium anisopliae*, que diferiram da cultura parental na morfologia, produção de enzimas, metabólitos secundários e redução da esporulação, ou seja, neste caso a degeneração da morfologia da cultura esteve associada a trocas na estabilidade fisiológica. Entretanto, o mecanismo responsável pela formação de setores e troca da integridade fisiológica, observada em linhagens de *Metarhizium* não foi determinado.

Em um estudo realizado por Shah & Butt (2005), observou-se que a formação de setores é específica para linhagens e influenciada pela condição nutricional, fatores comprovados em *Metarhizium anisopliae*. No presente estudo, as linhagens foram mantidas sob as mesmas condições de cultivo, não se observando o efeito da condição nutricional na produção de setores.

Alterações de características morfológicas de fungos comercialmente importantes poderiam estar relacionadas a outras características, resultando em diversos problemas como a perda da patogenicidade de um isolado utilizado em programa de controle biológico (Ryan *et al.*, 2002). No entanto, não existem relatos envolvendo alterações em linhagens morfológicamente instáveis e nem modificações genômicas relacionadas à estas variações.

Em análise de RAPD, notou-se diferenciações entre gerações das linhagens de *D. pulvinata*, tanto em colônias cultivadas em meio de cultura BDA, quanto em gerações produzidas no arroz parboilizado.

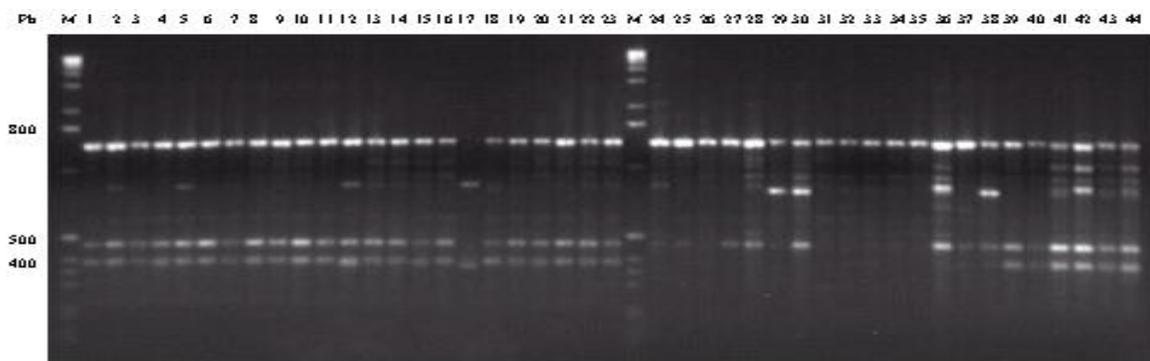
Nos resultados com o primer P1, foi possível observar um padrão de bandas bastante semelhantes entre as gerações de uma mesma linhagem e entre as duas linhagens avaliadas, apresentando pouco polimorfismo. A linhagem CEN 58 apresenta uma banda muito evidente em todas as suas amostras, tanto nas cultivadas em BDA como em arroz parboilizado. Esta banda diferencia as linhagens, pois a mesma está ausente em CEN 62 (Figura 2).



**Figura 2.** RAPD de linhagens de *Dicyma pulvinata* com primer P1. 1.CEN58-1<sup>a</sup>G, 2.CEN58B1-2<sup>a</sup>G, 3.CEN58B1S1-3<sup>a</sup>G, 4.CEN58B1S1B1-4<sup>a</sup>G, 5.CEN58B1S2-3<sup>a</sup>G, 6.CEN58B1S2B1-4<sup>a</sup>G, 7.CEN58B1S3-3<sup>a</sup>G, 8.CEN58B1S3B1-4<sup>a</sup>G, 9.CEN58B2-2<sup>a</sup>G, 10.CEN58B2S1-3<sup>a</sup>G, 11.CEN58B2S1B1-4<sup>a</sup>G, 12.CEN58B3-2<sup>a</sup>G, 13.CEN58B3B1-3<sup>a</sup>G, 14.CEN58B3B1B1-4<sup>a</sup>G, 15.CEN58-1<sup>a</sup>G em arroz, 16.CEN58-2<sup>a</sup>G em arroz, 17.CEN58-3<sup>a</sup>G em arroz, 18.CEN58-4<sup>a</sup>G em arroz, 19.Cultura monospórica 1-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 20.Cultura monospórica 2-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 21.Cultura monospórica 3-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 22.Cultura monospórica 4-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 23.Cultura monospórica 5-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 24.CEN62-1<sup>a</sup>G, 25.CEN62B1-2<sup>a</sup>G, 26.CEN62B1S1-3<sup>a</sup>G, 27.CEN62B1S1.1-4<sup>a</sup>G, 28.CEN62S1-2<sup>a</sup>G, 29.CEN62S1B1-3<sup>a</sup>G, 30.CEN62S1B1S1-4<sup>a</sup>G, 31.CEN62S2-2<sup>a</sup>G, 32.CEN62S2.1-3<sup>a</sup>G, 33.CEN62S2.1.B1-4<sup>a</sup>G, 34.CEN62S2.2-3<sup>a</sup>G, 35.CEN62S2.2B1-4<sup>a</sup>G, 36.CEN62-1<sup>a</sup>G em arroz, 37.CEN62-2<sup>a</sup>G em arroz, 38.CEN62-3<sup>a</sup>G em arroz, 39.CEN62-4<sup>a</sup>G em arroz, 40.Cultura monospórica 1-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 41.Cultura monospórica 2-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 42.Cultura monospórica 3-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 43.Cultura monospórica 4-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 44.Cultura monospórica 5-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz.

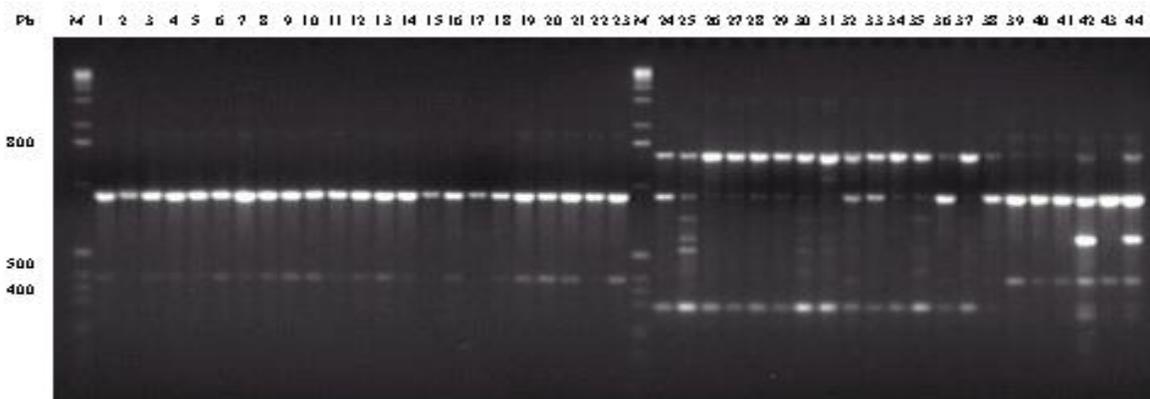
Na avaliação utilizando o primer P2, em todas as amostras, tanto em CEN 58 quanto em CEN 62, praticamente não foram detectadas variações no perfil obtido. A diferença mais notável ocorreu na amostra 17, referente a terceira geração da linhagem CEN 58 cultivada em arroz parboilizado. Nesta foi detectada uma banda bastante expressiva que não esteve presente em nenhuma outra amostra.

Quando se empregou o primer P3 para análise de RAPD, observou-se maior diferença no padrão de bandas entre as amostras da linhagem CEN 62. Em CEN 58 ocorreram algumas variações, porém em menor quantidade. Novamente a amostra 17 apresentou-se mais diferenciada, porém neste caso uma banda presente nesta, também foi observada nas amostras 5 e 12 (Figura 3).



**Figura 3.** RAPD de linhagens de *Dicyma pulvinata* com primer P3. 1.CEN58-1<sup>a</sup>G, 2.CEN58B1-2<sup>a</sup>G, 3.CEN58B1S1-3<sup>a</sup>G, 4.CEN58B1S1B1-4<sup>a</sup>G, 5.CEN58B1S2-3<sup>a</sup>G, 6.CEN58B1S2B1-4<sup>a</sup>G, 7.CEN58B1S3-3<sup>a</sup>G, 8.CEN58B1S3B1-4<sup>a</sup>G, 9.CEN58B2-2<sup>a</sup>G, 10.CEN58B2S1-3<sup>a</sup>G, 11.CEN58B2S1B1-4<sup>a</sup>G, 12.CEN58B3-2<sup>a</sup>G, 13.CEN58B3B1-3<sup>a</sup>G, 14.CEN58B3B1B1-4<sup>a</sup>G, 15.CEN58-1<sup>a</sup>G em arroz, 16.CEN58-2<sup>a</sup>G em arroz, 17.CEN58-3<sup>a</sup>G em arroz, 18.CEN58-4<sup>a</sup>G em arroz, 19.Cultura monospórica 1-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 20.Cultura monospórica 2-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 21.Cultura monospórica 3-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 22.Cultura monospórica 4-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 23.Cultura monospórica 5-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 24.CEN62-1<sup>a</sup>G, 25.CEN62B1-2<sup>a</sup>G, 26.CEN62B1S1-3<sup>a</sup>G, 27.CEN62B1S1.1-4<sup>a</sup>G, 28.CEN62S1-2<sup>a</sup>G, 29.CEN62S1B1-3<sup>a</sup>G, 30.CEN62S1B1S1-4<sup>a</sup>G, 31.CEN62S2-2<sup>a</sup>G, 32.CEN62S2.1-3<sup>a</sup>G, 33.CEN62S2.1.B1-4<sup>a</sup>G, 34.CEN62S2.2-3<sup>a</sup>G, 35.CEN62S2.2B1-4<sup>a</sup>G, 36.CEN62-1<sup>a</sup>G em arroz, 37.CEN62-2<sup>a</sup>G em arroz, 38.CEN62-3<sup>a</sup>G em arroz, 39.CEN62-4<sup>a</sup>G em arroz, 40.Cultura monospórica 1-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 41.Cultura monospórica 2-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 42.Cultura monospórica 3-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 43.Cultura monospórica 4-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 44.Cultura monospórica 5-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz.

O padrão de bandas obtido com o primer P4 foi semelhante ao obtido com o P3, para a linhagem CEN 58, demonstrando menos variações do que CEN 62. Entretanto, nas amostras com arroz parboilizado, verificou-se maior alteração entre as amostras (Figura 4).



**Figura 4.** RAPD de linhagens de *Dicyma pulvinata* com primer P4. 1.CEN58-1<sup>a</sup>G, 2.CEN58B1-2<sup>a</sup>G, 3.CEN58B1S1-3<sup>a</sup>G, 4.CEN58B1S1B1-4<sup>a</sup>G, 5.CEN58B1S2-3<sup>a</sup>G, 6.CEN58B1S2B1-4<sup>a</sup>G, 7.CEN58B1S3-3<sup>a</sup>G, 8.CEN58B1S3B1-4<sup>a</sup>G, 9.CEN58B2-2<sup>a</sup>G, 10.CEN58B2S1-3<sup>a</sup>G, 11.CEN58B2S1B1-4<sup>a</sup>G, 12.CEN58B3-2<sup>a</sup>G, 13.CEN58B3B1-3<sup>a</sup>G, 14.CEN58B3B1B1-4<sup>a</sup>G, 15.CEN58-1<sup>a</sup>G em arroz, 16.CEN58-2<sup>a</sup>G em arroz, 17.CEN58-3<sup>a</sup>G em arroz, 18.CEN58-4<sup>a</sup>G em arroz, 19.Cultura monospórica 1-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 20.Cultura monospórica 2-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 21.Cultura monospórica 3-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 22.Cultura monospórica 4-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 23.Cultura monospórica 5-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 24.CEN62-1<sup>a</sup>G, 25.CEN62B1-2<sup>a</sup>G, 26.CEN62B1S1-3<sup>a</sup>G, 27.CEN62B1S1.1-4<sup>a</sup>G, 28.CEN62S1-2<sup>a</sup>G, 29.CEN62S1B1-3<sup>a</sup>G, 30.CEN62S1B1S1-4<sup>a</sup>G, 31.CEN62S2-2<sup>a</sup>G, 32.CEN62S2.1-3<sup>a</sup>G, 33.CEN62S2.1.B1-4<sup>a</sup>G, 34.CEN62S2.2-3<sup>a</sup>G, 35.CEN62S2.2B1-4<sup>a</sup>G, 36.CEN62-1<sup>a</sup>G em arroz, 37.CEN62-2<sup>a</sup>G em arroz, 38.CEN62-3<sup>a</sup>G em arroz, 39.CEN62-4<sup>a</sup>G em arroz, 40.Cultura monospórica 1-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 41.Cultura monospórica 2-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 42.Cultura monospórica 3-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 43.Cultura monospórica 4-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz, 44.Cultura monospórica 5-a partir da 4<sup>a</sup>G em arroz.

Com o primer P5, a amostra 11 da linhagem CEN 58 foi a única que apresentou diferenças em relação as demais, quando se fez o cultivo em meio BDA. Em arroz parboilizado foram detectadas diferenças com as amostras 17, 20, 22 e 23. Na linhagem CEN 62, sete das 12 amostras (cultivadas em BDA) e cinco das nove amostras (cultivadas em arroz paboilizado) foram observados padrões de bandas diferentes da linhagem parental.

Comparando-se as linhagens parentais e suas gerações subseqüentes, observa-se que CEN 58 apresentou menor variabilidade genética no decorrer das sucessivas repicagens com uma média de 2,53 %, quando se utilizou o meio BDA e 14,74 %, quando se utilizou gerações em arroz parboilizado. A linhagem CEN 62 apresentou uma variação média de 10,55 % em meio BDA e de 18,52 %, no substrato arroz parboilizado.

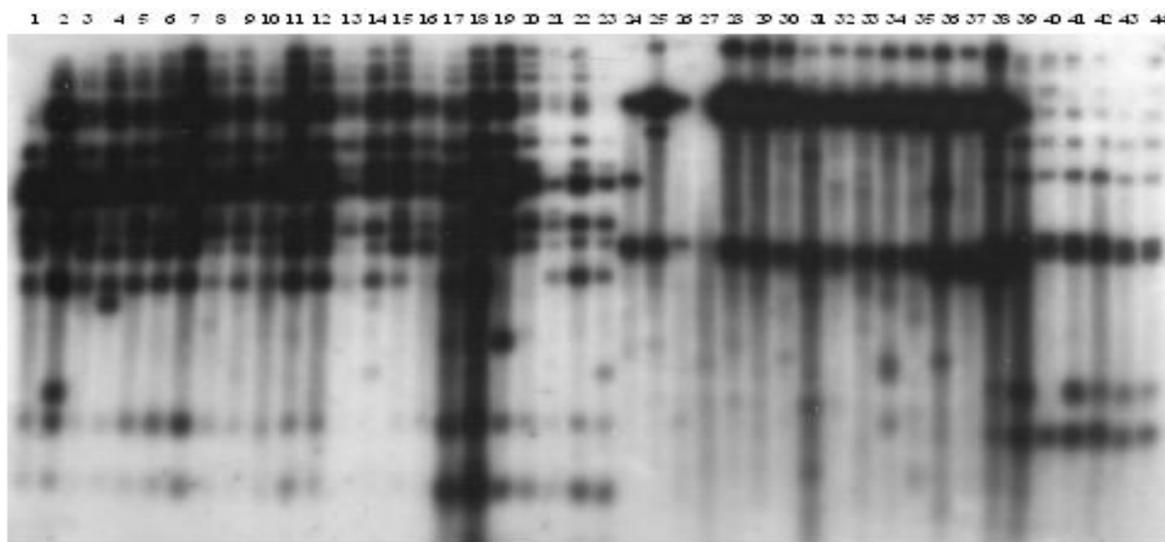
De maneira geral, a linhagem CEN 58 apresentou-se mais estável do que a linhagem CEN 62. Observa-se entretanto, que em ambos, ocorreu mais variações quando o substrato para o desenvolvimento do fungo foi arroz parboilizado.

Os microrganismos podem ser conservados em coleções por diferentes métodos. A maioria das coleções de trabalho, entretanto, é mantida através de repiques sucessivos em meio de cultura. Esse processo permite a manutenção da viabilidade de estoques, porém as múltiplas transferências impedem a manutenção da integridade genética e muitas características podem ser modificadas ou perdidas por mutações (Azevedo, 1991).

Análise por RFLP mostrou que na região subtelomérica, a linhagem CEN 58 apresentou variações entre as colônias monospóricas, bem como entre os setores e a linhagens parental quando utilizada a enzima *Eco* RI (Figura 5). No que se refere a desenvolvimento de colônias da linhagem CEN 58 em arroz nas quatro gerações analisadas, bem como nas cinco amostras de cultura monóspóricas provenientes da 4<sup>a</sup> geração, observou-se variação de bandas de hibridização com o aparecimento ou desaparecimento

de bandas homólogas, o que denota um provável rearranjo nesta região, quando utilizada a enzima *Eco* RI.

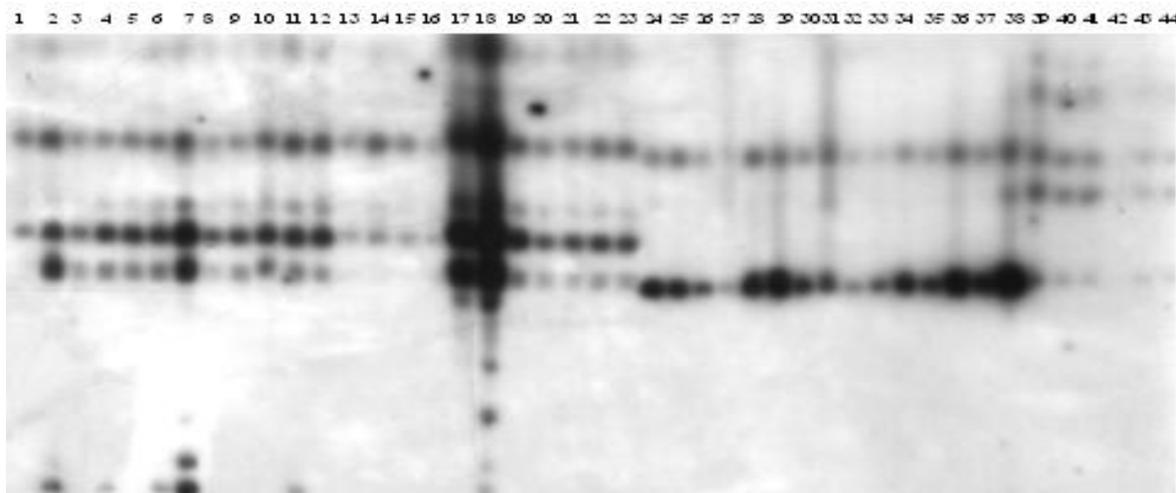
Na avaliação da linhagem CEN 62, verificou-se com a enzima *Eco* RI que existem variações entre as amostras, com aparecimento e desaparecimento de bandas homólogas semelhantemente ao observado com a linhagem CEN 58, tanto em colônias cultivadas em BDA como em arroz parboilizado. Já as colônias monospóricas provenientes da linhagem CEN 62 apresentaram menor variação entre elas, sendo que das cinco colônias monospóricas avaliadas, somente uma apresentou ausência de banda (Figura 5).



**Figura 5.** RFLP com sonda telomérica de linhagens de *Dickeya pulvinata* com a enzima *Eco* RI. 1.CEN58-1<sup>o</sup>G, 2.CEN58B1-2<sup>o</sup>G, 3.CEN58B1S1-3<sup>o</sup>G, 4.CEN58B1S1B1-4<sup>o</sup>G, 5.CEN58B1S2-3<sup>o</sup>G, 6.CEN58B1S2B1-4<sup>o</sup>G, 7.CEN58B1S3-3<sup>o</sup>G, 8.CEN58B1S3B1-4<sup>o</sup>G, 9.CEN58B2-2<sup>o</sup>G, 10.CEN58B2S1-3<sup>o</sup>G, 11.CEN58B2S1B1-4<sup>o</sup>G, 12.CEN58B3-2<sup>o</sup>G, 13.CEN58B3B1-3<sup>o</sup>G, 14.CEN58B3B1B1-4<sup>o</sup>G, 15.CEN58-1<sup>o</sup>G em arroz, 16.CEN58-2<sup>o</sup>G em arroz, 17.CEN58-3<sup>o</sup>G em arroz, 18.CEN58-4<sup>o</sup>G em arroz, 19.Cultura monospórica 1-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 20.Cultura monospórica 2-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 21.Cultura monospórica 3-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 22.Cultura monospórica 4-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 23.Cultura monospórica 5-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 24.CEN62-1<sup>o</sup>G, 25.CEN62B1-2<sup>o</sup>G, 26.CEN62B1S1-3<sup>o</sup>G, 27.CEN62B1S1.1-4<sup>o</sup>G, 28.CEN62S1-2<sup>o</sup>G, 29.CEN62S1B1-3<sup>o</sup>G, 30.CEN62S1B1S1-4<sup>o</sup>G, 31.CEN62S2-2<sup>o</sup>G, 32.CEN62S2.1-3<sup>o</sup>G, 33.CEN62S2.1.B1-4<sup>o</sup>G, 34.CEN62S2.2-3<sup>o</sup>G, 35.CEN62S2.2B1-4<sup>o</sup>G, 36.CEN62-1<sup>o</sup>G em arroz, 37.CEN62-2<sup>o</sup>G em arroz, 38.CEN62-3<sup>o</sup>G em arroz, 39.CEN62-4<sup>o</sup>G em arroz, 40.Cultura monospórica 1-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 41.Cultura monospórica 2-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 42.Cultura monospórica 3-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 43.Cultura monospórica 4-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 44.Cultura monospórica 5 – a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz.

Com a enzima *Hind*III, o padrão de bandas foi diferente entre as linhagens de *D. pulvinata*. Porém para ambas as linhagens avaliadas, ocorreram variações entre as gerações

nas duas formas de cultivo. Entretanto as culturas monóspóricas mostraram-se idênticas (Figura 6).



**Figura 6.** RFLP com sonda telomérica de linhagens de *Dicyma pulvinata* com a enzima *Hind* III. 1.CEN58-1<sup>o</sup>G, 2.CEN58B1-2<sup>o</sup>G, 3.CEN58B1S1-3<sup>o</sup>G, 4.CEN58B1S1B1-4<sup>o</sup>G, 5.CEN58B1S2-3<sup>o</sup>G, 6.CEN58B1S2B1-4<sup>o</sup>G, 7.CEN58B1S3-3<sup>o</sup>G, 8.CEN58B1S3B1-4<sup>o</sup>G, 9.CEN58B2-2<sup>o</sup>G, 10.CEN58B2S1-3<sup>o</sup>G, 11.CEN58B2S1B1-4<sup>o</sup>G, 12.CEN58B3-2<sup>o</sup>G, 13.CEN58B3B1-3<sup>o</sup>G, 14.CEN58B3B1B1-4<sup>o</sup>G, 15.CEN58-1<sup>o</sup>G em arroz, 16.CEN58-2<sup>o</sup>G em arroz, 17.CEN58-3<sup>o</sup>G em arroz, 18.CEN58-4<sup>o</sup>G em arroz, 19.Cultura monóspórica 1-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 20.Cultura monóspórica 2-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 21.Cultura monóspórica 3-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 22.Cultura monóspórica 4-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 23.Cultura monóspórica 5-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 24.CEN62-1<sup>o</sup>G, 25.CEN62B1-2<sup>o</sup>G, 26.CEN62B1S1-3<sup>o</sup>G, 27.CEN62B1S1.1-4<sup>o</sup>G, 28.CEN62S1-2<sup>o</sup>G, 29.CEN62S1B1-3<sup>o</sup>G, 30.CEN62S1B1S1-4<sup>o</sup>G, 31.CEN62S2-2<sup>o</sup>G, 32.CEN62S2.1-3<sup>o</sup>G, 33.CEN62S2.1.B1-4<sup>o</sup>G, 34.CEN62S2.2-3<sup>o</sup>G, 35.CEN62S2.2B1-4<sup>o</sup>G, 36.CEN62-1<sup>o</sup>G em arroz, 37.CEN62-2<sup>o</sup>G em arroz, 38.CEN62-3<sup>o</sup>G em arroz, 39.CEN62-4<sup>o</sup>G em arroz, 40.Cultura monóspórica 1-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 41.Cultura monóspórica 2-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 42.Cultura monóspórica 3-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 43.Cultura monóspórica 4-a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz, 44.Cultura monóspórica 5 – a partir da 4<sup>o</sup>G em arroz.

Segundo Shah & Butt (2005), o tipo e a frequência de setorização varia de acordo com as diferentes espécies e linhagens do fungo e podem ser atribuídas a fatores como mutações, transposons e rearranjos genômico. No presente trabalho, as diferenças ocorridas durante as quatro gerações, nas duas linhagens utilizadas e em análises tanto de RAPD como RFLP, poderiam ser causadas por esses fatores.

Variabilidade genética foi observada entre setores produzidos a partir de cultura monóspórica de *D. pulvinata* mantida em óleo mineral e congelada a – 80 °C,

demonstrando a existência de instabilidade genética em linhagens mantidas sob diferentes condições de armazenamento (Pinho, *et al.*, 2005).

Muitos outros fungos apresentam instabilidade fenotípica, a qual é característica de organismos contendo transposons. Por exemplo, diversos patógenos de plantas produzem micélio estéril, não patogênico, quando cultivados *in vitro*. Porém, pela passagem através da planta hospedeira, essa situação pode ser alterada (McHale *et al.*, 1992). Vários transposons são relatados em fungos filamentosos como os *grasshopper* de *Magnaporthe grisea* (Dobinson *et al.*, 1992) e Fot1 de *Fusarium oxysporum* (Daboussi *et al.*, 1992).

Em muitos fungos filamentosos verifica-se que existe grande polimorfismo nas seqüências associadas aos telômeros e atualmente este polimorfismo tem sido usado na identificação (fingerprinting) de linhagens de fungos agentes de controle biológico (Inglis *et al.*, 1999).

Telômeros são regiões de seqüências repetitivas, responsáveis pela proteção dos cromossomos e envolvidas no processo que garante a fidelidade na replicação (Zakian, 1998). Sondas teloméricas também têm sido usadas para estudo com linhagens de *Beauveria*, verificando novas bandas teloméricas em recombinantes, diferentes do perfil de linhagens parentais, sugerindo que mutações, recombinações ou rearranjos podem estar envolvidos no processo (Viaud *et al.*, 1998).

De acordo com recente pesquisa, na qual genes de virulência ou avirulência foram localizados em regiões subteloméricas do fungo *Magnaporthe grisea* (Gao *et al.*, 2002), a dinâmica subtelomérica em fungos é de relevante importância para sua eficiência, tanto como patógenos quanto como antagonistas.

A compreensão dos mecanismos relacionados à estabilidade genética de fungos agentes de controle biológico é essencial para o desenvolvimento de produtos comerciais de

campo, pois a aplicação bem sucedida requer uma formulação apropriada que garanta a viabilidade e estabilidade ao fungo durante o estoque do inóculo e produção. A estabilidade genética também tem sérias implicações com relação a patentes. Organismos de importância industrial e principalmente organismos objeto de patente são mantidos congelados, uma vez que o cultivo seriado pode levar a perda de viabilidade (Homa, *et al.*, 2003).

## CONCLUSÕES

Segundo os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Linhagens de *D. pulvinata* mantidas em coleção apresentam instabilidade morfológica (com formação de setores) e genética (com diferentes padrões de bandas).
- Análises de RAPD e RFLP mostraram diferentes perfis entre gerações consecutivas de uma mesma linhagem de *D. pulvinata* tanto em CEN 58 como em CEN 62.
- De maneira geral, gerações cultivadas em arroz parboilizado apresentaram maiores diferenciações do que as cultivadas em meio BDA, porém as amostras de culturas monósporas provenientes da 4<sup>a</sup> geração em arroz, mostraram-se bastante semelhantes.
- Estudos de eficiência patogênica devem ser conduzidos, em gerações que apresentam variações morfológicas e genéticas, visando identificar as variações de características de interesse comercial e desenvolver um possível mecanismo de seleção ou método de estabilizar as linhagens.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J.L Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. Embrapa - CNPDA. 1991. pp. 237-251.

BOYSEN, M., SKOUBOE, P., FRISVAD, J. & ROSSEN, L. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology* 142: 541-549.

CHU, Y.M., JEON, J.J., UEA, S.J., KIM, Y.H., YUN, S.H., LEE, Y.W. & KIM, K.H. Double stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2529-2534. 2002.

DABOUSSI, M.J. LANGIN, T. & BRYGOO, Y. Fot1 a new family of fungal transposable elements. *Molecular General Genetics* 232: 12-16. 1992.

DOBINSON, K.F., HARRIS, R.E. & HAMER, J.E. Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 114-126. 1993.

FARGUES, J.F., ROBERT, P.H. Effects of passage through scarabeid hosts on virulence and specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 576-583. 1983.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3<sup>a</sup> ed. Brasília. Editora Embrapa. 1998. 220p.

GAO, W. KHANG, C.H., PARK, S.Y. LEE, Y.H. & KANG, S. Evolution and organization of a highly dynamic, subtelomeric helicase gene family in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genetics* 169: 103-112. 2002.

GÚZMAN-DE-PENÃ, D. & RUIZ-HERRERA, J. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet. Biol.* 21: 198-205. 1997.

HOMA, T., IWAHASHI, H. & KOMATSU, Y. Yeast gene expression during growth at low temperature. *Cryobiology* 46: 230-237. 2003.

IJDO, J.W. WELLS, R.A., BALDINI, A & REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780. 1991.

INGLIS, P.W., MAGALHÃES, B.P. & VALADARES-INGLIS, M.C. Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* revealed by telomeric fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters* 179: 49-52. 1999.

INGLIS, P.W., MELLO, L.V., RIGDEN, D.J. & VALADARES-INGLIS, M.C. Isolamento de seqüência associada a telômero de *Metarhizium anisopliae* e monomorfismo no locus subtelomérico de fungos agente de controle biológico. Embrapa –CENARGEN, 2003. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n° 51).

KIM, D.H. Induced change in DNA methylation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* due successive transfer. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 30: 216- 221. 1997.

KIRK, P.M., CANNON, P.F. DAVID, J.C. & STALPERS, J.A. Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi. Wallingford, UK: CAB International.

MCHALE, M.T.I, ROBERTS, I.N., NOBLE, S.M., BREAUMONT, C. WHITEHEAD, M.P. SETH, D. & OLIVER, R.P. *Cft-1*: an LTR retrotransposon in *Cladosporium fulvum*, a fungal pathogen of tomato. Molecular and General Genetics 233: 337-347. 1992.

PINHO, D.S., INGLIS, P.W., MELLO, S.C.M., GAVIÃO, C.F.C. & VALADARES-INGLIS, M.C. Instabilidade genética em linhagens de *Dicyma pulvinata* mantidas em coleções de cultura. Anais – 9º Simpósio de Controle Biológico (Resumo 86). 2005.

PROSSER, J.I. Growth kinetics of mycelial colonies and aggregations of ascomycetes. Mycological Research 97: 513-528. 1993.

ROGERS, M. & BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual 6:1-10. 1988.

RYAN, M.J., BRIDGE, P.D., SMITH, D. & JEFFRIES, P. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. Journal of Applied Microbiology 93: 163-168. 2002.

SHAH, F.A. & BUTT, T.M. Influence of nutrition on the production and physiology of sectors produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters 250: 201-207. 2005.

TAVARES, E.T., TIGANO, M.S., MELLO, S.C.M., MARTINS, I. & CORDEIRO, D.M.T. Molecular characterization of brasilian *Dicyma pulvinata* isolates. Fitopatologia Brasileira 29:148-154. 2004.

VIAUD, M. COUTEAUDIER, Y & RIBA, G. Molecular análisis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. Applied and Environmental Microbiology 64: 88-93. 1998.

ZAKIAN, V.A. Structure and function of telomeres. Annual Review Genetic 23: 579-604. 1998.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18: 7213-7218.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R.,LIVAK, K.J. RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V.  
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic  
Acids Research* 18: 6531-6535. 1990.