



Actinobactérias no controle do mal das folhas em mudas de seringueira

Actinobacteria in the control of leaf disease in rubber tree seedlings

Sousa, Carla da Silva¹; JESUS, Aline do Nascimento¹; LIMA, Francisco de Sousa¹; SOARES, Ana Cristina Fermino²; CARDOSO, Saulo Emílio Almeida³; CONCEIÇÃO, Luciano dos Santos³

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano: cssagro@yahoo.com.br; fsousalima@yahoo.com.br; alinenascimento06@hotmail.com; ²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas: ferminosoaes@gmail.com;

³Empresa Michelin: saulo.cardoso@br.michelin.com; luciano.conceição@br.michelin.com

Tema Gerador: Manejo de agroecossistemas e agricultura orgânica

Resumo

A seringueira (*Hevea* spp.), planta nativa da região Amazônica, é a maior Fonte de borracha natural. Entretanto, um dos principais problemas fitossanitários que acomete esta cultura, é o mal das folhas, causado pelo fungo *Pseudocercospora ulei*. Actinobactérias são micro-organismos que apresentam grande potencial como agentes de biocontrole de doenças em plantas, em virtude da produção de antibióticos e enzimas que atuam inibindo patógenos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de isolados de actinobactérias no controle do mal das folhas em mudas de seringueira. Os metabólitos dos isolados de actinobactérias reduziram em até 43,4% a germinação de esporos e em 77,1% o crescimento micelial do fungo *P. ulei*. Todos isolados quando aplicados via pulverização foliar reduziram a severidade da doença em mudas de seringueira em comparação a testemunha. Isolados de actinobactérias demonstraram potencial no controle do mal das folhas em mudas de seringueira.

Palavras-chave: biocontrole, *Pseudocercospora ulei*, *Hevea* spp.

Resumo

The rubber tree (*Hevea* spp.), Native to the Amazon region, is the largest source of natural rubber. However, one of the main phytosanitary problems that affects this crop, is the evil of the leaves, caused by the fungus *Pseudocercospora ulei*. Actinobacteria are microorganisms that present great potential as biocontrol agents of plant diseases, due to the production of antibiotics and enzymes that act to inhibit pathogens. The objective of this work was to evaluate the efficiency of actinobacteria isolates in the control of leaf disease in rubber tree seedlings. The metabolites of the actinobacteria isolates reduced the germination of spores by up to 43.4% and the mycelial growth of the fungus *P. ulei* by 77.1%. All isolates when applied via leaf spraying reduced the severity of the disease in rubber tree seedlings compared to control. Isolates of actinobacteria showed potential in the control of leaf disease in rubber tree seedlings.

Palavras-chave: biocontrole, *Pseudocercospora ulei*, *Hevea* spp.

Introdução

O Brasil, no início do século XX, se destacou no mercado mundial da borracha, servindo este produto oriundo do extrativismo de suporte à nossa receita cambial, participando com 98% da produção mundial (Bernardes et al.,1990), quando ainda a extração



era proveniente de seringais nativos da Amazônia (Costa et al., 2001). Entretanto, o insucesso da heveicultura nas áreas tradicionais de cultivo no Brasil começou principalmente em virtude do aparecimento do mal-das-folhas da seringueira, doença causada pelo *Pseudocercospora ulei*, fungo originário da Amazônia, e que se encontra presente em todas as regiões heveícolas do país (Gasparotto & Pereira, 2012). Essa doença, além de reduzir a produção de látex, debilita as plantas e as leva à morte após desfolhamentos sucessivos (Gasparotto & Ferreira, 1989).

Diversos estudos foram realizados na tentativa de controlar a doença e promover a expansão da heveicultura, contudo, sem Resultados satisfatórios. Foi realizado o melhoramento genético para a obtenção de clones de seringueira resistentes e produtivos, entretanto este método foi ineficiente, em virtude do fungo *P. ulei* possuir elevada capacidade de mutação, resultando em quebra de resistência (Sousa & Moraes, 2001; Mattos, 2003). Foram também realizados alguns trabalhos avaliando a substituição de copas susceptíveis por clones de copas resistentes, contudo, houve problemas como baixo índice de pegamento, queda na produtividade de borracha e aumento do custo de produção, com adoção da técnica de enxertia (Moraes & Moraes, 2008).

O interesse nos estudos com as actinobactérias tem aumentado devido ao seu potencial para produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, dentre eles antibióticos e enzimas extracelulares (Korn-Wendisch & Kutzer, 1992). Estudos demonstraram o potencial das actinobactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos em culturas de interesse econômico (Soares et al., 2006; Sousa et al., 2009). Contudo, inexistentes são os estudos avaliando o potencial de actinobactérias no biocontrole do fungo *P. ulei*, causador do mal-das-folhas, doença que é o principal fator limitante da expansão da heveicultura na região Amazônica e no Sul da Bahia.

Metodologia

Bioensaio 1: Metabólitos de actinobactérias na germinação de esporos de *P. ulei*

Foram adicionados 40 µL de suspensão de conídios de *P. uley* na concentração 2×10^5 conídios/ml, juntamente com 40 µL de metabólitos dos isolados de actinobactérias em lâminas escavadas. O tratamento controle consistiu de água destilada e conídios do fungo. A avaliação foi realizada com auxílio de um microscópio biológico binocular com aumento de 40 X, através da contagem aleatória de 100 esporos. Quando o tratamento controle apresentou 50% de esporos germinados, os demais tratamentos receberam 01 gota de lactofenol azul para paralisar a germinação dos esporos e se



iniciar a contagem dos esporos germinados e não germinados. Foi considerado como germinado, aquele esporo cujo tubo germinativo apresentou comprimento superior ao dobro do seu diâmetro.

Bioensaio 2: Metabólitos de actinobactérias no crescimento micelial de *P. ulei*

Inicialmente, os isolados de actinobactérias foram multiplicados na forma de risco no centro de placas de Petri contendo meio BDA com auxílio de alça de platina, e incubados a temperatura ambiente durante 5 dias. Após este período, dois discos de 7 mm do fungo *P. ulei* foram transferidos para os dois lados da placa, a uma distância de 1,5 cm da linha de crescimento do isolado de actinobactérias. O tratamento controle consistiu de placas contendo os discos do fungo sem o cultivo dos isolados de actinobactérias. Os discos foram retirados da borda de uma cultura do fungo *P. ulei* após 8 dias de crescimento. O crescimento micelial do fungo foi medido diariamente com auxílio de uma régua milimétrica. Quando no tratamento testemunha, o fungo cresceu em toda a placa, foi encerrada a medição do crescimento micelial das culturas.

Experimento em casa de vegetação: Metabólitos de actinobactérias no controle do mal das folhas em mudas de seringueira

O experimento foi instalado em casa de vegetação, em delineamento experimental inteiramente casualizado, esquema fatorial, 3 x 2, sendo três isolados de actinobactérias mais a testemunha e duas formas de inoculação (via pulverização foliar e irrigação do solo) com 15 repetições. Mudas de seringueira sadias do clone FX 3864 foram inoculadas com 100 ml de metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias (via pulverização foliar e irrigação do solo). Após 5 dias, as mudas foram inoculadas com uma suspensão aquosa contendo 2×10^5 conídios/ml de *P. ulei*. A inoculação foi realizada, com o auxílio de um atomizador, na face inferior dos folíolos jovens e de coloração violeta, correspondentes ao estágio B2 descrito por Hallé & Martin (1968), em câmara úmida com temperatura variando de 23 a 26° e umidade superior a 95%. Após a inoculação, as mudas permaneceram 24 horas no escuro, e posteriormente foram mantidas em regime de 12 horas no escuro e 12 horas no claro por 12 dias. Após 12 dias, foi utilizada Escala Diagramática Modificada (Gasparotto et al., 1989), para avaliação da severidade da doença nas mudas da seringueira, onde (0) Sem sintoma; (1) Lesões necróticas sem esporos; (2) Lesões não necróticas sem esporos; (3) Esporulação muito fraca sobre a face inferior da lesão; (4) Esporulação forte cobrindo parcialmente a face inferior da lesão; (5) Esporulação muito forte cobrindo toda a face da lesão; (6) Esporulação muito forte cobrindo toda a face inferior da lesão e forte na face superior.



Resultados e discussão

Observa-se na Tabela 1, que o tratamento testemunha apresentou maior percentagem de esporos germinados, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Nos tratamentos utilizando metabólitos dos isolados de actinobactérias 3, 2 e 5 houve redução de 56,6%, 52,5% e 25% na germinação de esporos do fungo *P. uley* em comparação ao tratamento testemunha. Quando avaliada a percentagem de esporos não germinados, observa-se que não houve diferença estatística entre os isolados 2 (38,6%) e isolado 5 (46,4%), que foram superiores ao tratamento controle, onde foram registrados apenas 20,4% de esporos não germinados.

Tabela 1. Efeito de metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias na germinação de esporos e no crescimento micelial do fungo *P. uley*.

Isolados	Número de esporos		Crescimento micelial (%)
	Germinados	Não germinados	
Testemunha	39,2a	20,4c	2,42a
Isolado 2	18,6b	35,8b	1,92b
Isolado 3	17,0b	38,6a	2,30a
Isolado 5	29,4b	46,4a	2,02b

Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade

O cultivo pareado com os isolados de actinobactérias 5 e 2, resultou em redução no crescimento micelial do fungo *P. uley*. Não houve efeito significativo do isolado 3 sobre crescimento micelial do fungo. Diversos são os mecanismos utilizados pelos isolados de actinobactérias que podem atuar inibindo a germinação de esporos e/ou o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Dentre estes mecanismos, pode-se citar a produção de enzimas líticas como quitinases e 1,3 β glucanases. A parede celular dos fungos é composta principalmente de quitina e glucana, de modo que a produção destas enzimas por agentes de biocontrole atuam na degradação da mesma, impedindo o crescimento fúngico, colonização do tecido vegetal e progresso da doença. Além da produção destas enzimas, são também produzidas outras substâncias antimicrobianas a exemplo dos antibióticos que impedem que o fitopatógeno colonize o tecido vegetal e ocasione o surgimento da doença (Tabela 1).

É demonstrada na Figura 1, a severidade do mal das folhas em mudas de seringueira inoculadas com metabólitos dos isolados de actinobactérias. Observa-se que entre as mudas inoculadas via pulverização foliar, todos os isolados foram eficientes em reduzir a severidade da doença em comparação à testemunha. Entretanto, quando observado



o efeito da inoculação via irrigação dos metabólitos no solo, o isolado 5 **não diferiu estatisticamente da testemunha, portanto, não tendo efeito significativo em reduzir a severidade do mal das folhas nas mudas de seringueira. Mudanças inoculadas com os isolados 2 e 3** apresentaram menor severidade da doença em comparação às mudas do tratamento testemunha.

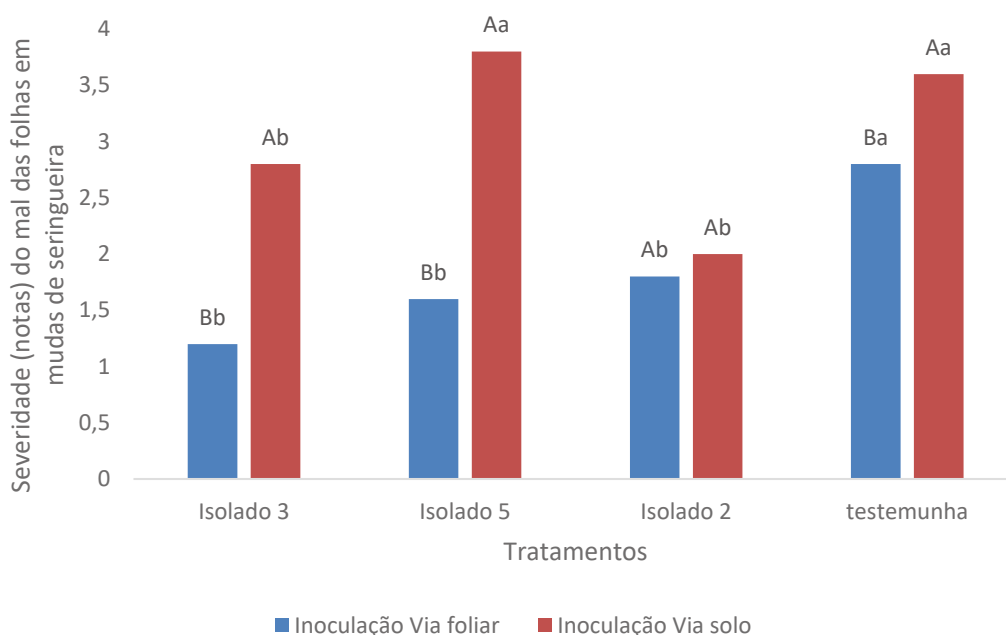


Figura 1. Severidade do mal das folhas em mudas de seringueira inoculadas com isolados de actinobactérias. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Não houve diferença entre os Métodos de inoculação nas mudas inoculadas com o isolado 2. Contudo, a inoculação via pulverização foliar dos isolados 3 e 5 foi mais eficiente no controle da doença em comparação à inoculação via irrigação do solo. Diante desses dados, é possível apontar as actinobactérias como uma tecnologia alternativa para controle do mal das folhas em mudas de seringueira. De um modo geral, os melhores Resultados foram obtidos via pulverização foliar dos metabólitos produzidos pelos isolados em comparação com a inoculação via irrigação do solo.

Conclusões

1. Metabólitos produzidos pelos isolados 2 e 5 reduz a germinação de esporos e o crescimento micelial do fungo *Pseudocercospora ulei*.
2. A pulverização foliar de metabólitos produzidos pelos isolados 3 e 5 reduz a severidade do mal da folhas em mudas de seringueira.



Referências

- BERNARDES, M. S.; VEIGA, A.S.; FONSECA FILHO, H. Mercado brasileiro de borra-cha vegetal. In: Bernardes, M. S. (Ed.). **Sangria da seringueira**. Piracicaba: ESALQ / USP / FEALQ, 1990, p. 179-205.
- COSTA, R.B. Melhoramento e conservação genética aplicados ao desenvolvimento local – o caso da seringueira (Hevea SP) **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, n.2, p.51-58, 2001.
- 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**, v.14, p.38-41, 1989.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2012. 255p.
- HALLÉ, F.; MARTIN, R. Étude de lacroissancerythmique chez l'hévéa (Hevea brasiliensis Müll. Arg., Euphorbiacées, Crotonoïdées). **Adansonia**, v.8, p.475-503. 1968.
- KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H.J. The family Streptomicetaceae. In: BALOWS, A; TRUPER, H.G; SWORKIN, M.; HARDER, W & SCHULEIFER, K.H. (Eds). **The prokaryotes**. New York: Springer Verlag, 1992. 1027p.
- MATTOS, C.R.R.; GARCIA, D.; PINARD, F.; LE GUEN, V. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.502-507, 2003.
- MORAES, V.H.F.; MORAES, L.A.C. Desempenho de clones de copa de seringueira resistentes ao mal-das-folhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.11, p.1495-1500, 2008.
- SOARES, A.C.F.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S.; PEREZ, J.O.; ALMEIDA, N.S. Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.456 - 461, 2006.
- SOUZA, N.R.; MORAES, V.H.F. Recursos genéticos de Hevea. In: SOUSA, N.R.; SOUZA, A. das G.C. (Ed.). **Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental; conservação, pesquisa e utilização**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p.189-199.
- SOUZA, C. S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. Estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em túberas de inhame. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, p.486 - 491, 2009.