

## Mancha Olho de Pássaro Causada por *Bipolaris heveae* em Clones de Seringueira no Acre, Brasil

Rivaldalve Coelho Gonçalves<sup>1</sup>, José Henrique Vallim<sup>2</sup> e Paulo Eduardo França de Macedo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Engenheiro florestal, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

<sup>2</sup>Bioquímico-farmacêutico, doutor em Biologia Funcional e Molecular, analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

<sup>3</sup>Engenheiro-agrônomo, mestre em Fitopatologia, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

**Resumo** – Uma doença foliar severa diferente daquelas reconhecidas anteriormente em árvores de seringueira no Acre foi observada e elegida para estudo. O objetivo deste trabalho é relatar a ocorrência de uma doença foliar em clones de *Hevea brasiliensis* em floresta no estado do Acre, Brasil. Folhas de seringueira no estágio D, com sintomas, foram coletadas em parcelas dos clones CHB01 e CHB02, de plantas bicompostas, *H. brasiliensis* + *H. brasiliensis* de 52 meses de idade, no município de Bujari, AC. No Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, Rio Branco, AC, as amostras foram analisadas a olho nu e em microscópios. O fungo foi isolado em tubo inclinado com meio de cultura BDA a 3,9% (m/v) com antibiótico. O isolado foi estudado quanto ao padrão de germinação conidial e micromorfologia. O teste de patogenicidade do isolado caracterizado foi feito em casa de vegetação em mudas do clone CHB01. A caracterização do fungo isolado das árvores permitiu concluir que pertence à espécie *Bipolaris heveae* (Petch) Arx. O teste de patogenicidade foi positivo, com a constatação de sintomas semelhantes àqueles observados em árvores no campo, porém com menor agressividade. Este é o primeiro relato da mancha olho de pássaro causada por *B. heveae* em *H. brasiliensis* no Acre.

Termos para indexação: patologia florestal, pneumáticos, caucho natural.

### Introdução

Fungos do gênero *Bipolaris* Schoemaker 1959 causam importantes doenças em plantas forrageiras, ornamentais, plantas utilizadas para a alimentação humana e árvores (Alcorn, 1983). O fungo *Bipolaris heveae* (Petch) Arx 1987 foi originalmente e primeiramente descrito como patógeno de seringueira, *Hevea brasiliensis* (Willdenow ex. Jussieu) Müller Argoviensis, 1865 (Euphorbiaceae), no Ceilão, em 1906, quando então foi classificado como *Helminthosporium heveae* Petch 1906, nos Anais do Jardim Botânico Real (Petch, 1906). Posteriormente, a espécie foi descrita como *Drechslera heveae* (Petch) Ellis 1971, e depois da descrição de Josef Adolf von Arx em 1987 em *Bipolaris heveae* (Petch) Arx 1987, descobriu-se o seu teleomorfo, classificado em *Cochliobolus heveicola* Tsukiboshi & Chung 2005, mas preservando-se como válido o nome científico do anamorfo dado por Josef Adolf von Arx em 1987.

Na pesquisa de literatura, os relatos de ocorrência de *D. heveae* no Brasil (Gasparotto et al., 1984; Mendes et al., 1998) e em outros vários países têm sido agrupados juntamente com relato de *B. heveae* e *H. heveae* em diversos hospedeiros no mundo (Farr; Rossman, 2016). *Drechslera heveae* tem sido reportada como espécie causal da doença mancha olho de pássaro (Ellis; Holliday, 1972; Gasparotto et al., 1984), ou “mancha ojo de pájaro”, de grande importância econômica na Ásia (Jaimes Suárez; Rojas, 2011).

Contudo, relatos consistentes de ocorrência de *Bipolaris heveae* em *H. brasiliensis* na Nigéria e na família Poaceae, *Zoysia japonica* Steudel, 1854 e *Cynodon dactylon* Persoon, 1805 no Japão, e *Distichlis spicata* var. *stricta* (Torrey) Scribner, 1894 nos Estados Unidos da América não deixam

dúvidas de que essa espécie é mesmo distinta e a maior parte das florestas de seringueira no Brasil é com clones asiáticos.

Uma nova espécie de *Bipolaris*, classificada em *Bipolaris setariae* (Sawada) Shoemaker, 1959 foi relatada na China, causando doença em folhas de seringueira no clone Yunyan77-4, em uma plantação em Jinghong, na província de Yunnan (Liu et al., 2016). O objetivo deste trabalho é relatar a ocorrência de uma severa doença em folhas de clones de *H. brasiliensis* em árvores de floresta experimental plantada, no estado do Acre, Brasil, em experimentos do tipo teste clonal destinados à seleção de clones resistentes a doenças para prover tecnologias aos produtores de borracha natural.

## Material e métodos

Folhas maduras e verdes de seringueira com sintomas de mancha foliar severa foram coletadas com podão e, manualmente, em abril de 2012, em duas árvores, ao acaso, de parcelas experimentais, localizadas no município de Bujari, Acre.

As coletas foram realizadas em plantas afetadas dos clones CHB01 e CHB02, em plantas zigóticas-clonais (*H. brasiliensis* + *H. brasiliensis*) com 52 meses de idade aproximadamente, altura média de 4,0 m, em plantio experimental com 14 clones, área de 4,8 ha, espaçamento de 6,0 m x 3,0 m, sem aplicação de fungicidas e com diversas espécies vegetais cobrindo o solo, a exemplo de *Urochloa maxima* (Jacquim) Webster, 1987 e *Urochloa brizantha* (Achille) Webster, 1987. As amostras foram analisadas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, em Rio Branco, AC, a olho nu, em microscópio estereoscópico Motic (SMZ168) e em microscópio de luz Motic (BA 310). Lâminas de microscopia foram preparadas com água limpa e analisadas, seguindo-se a elaboração da hipótese de se tratar do fungo *B. heveae*, já relatado em seringueira na Nigéria (Manamgoda et al., 2014).

O fungo foi isolado em tubo inclinado com meio de cultura BDA 3,9% (m/v), com 50 ppm de cloranfenicol utilizando o método de isolamento direto (Alfenas et al., 2007). Os tubos inclinados semeados foram armazenados a 25 °C em câmara BOD no escuro contínuo. Após o desenvolvimento das colônias escuras, o fungo foi repicado para placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo meio de cultura ágar-água (AA) a 2% (m/v) e placas de Petri com meio BDA (3,9%), ambos os meios com 50 ppm de cloranfenicol. As placas foram armazenadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas, em câmara BOD. A partir das colônias com abundante esporulação, em placas com AA (2%), preparou-se uma suspensão de esporos em água destilada estéril para a análise do padrão de germinação, bem como para o teste de patogenicidade considerando uma única espécie de fungo presente. As plantas de teste foram inoculadas com 10 mL de suspensão de esporos a  $1,0 \times 10^5$  esporos/mL por aspersão e as plantas testemunhas foram aspergidas com 10 mL de água destilada estéril. Todas as plantas, de aproximadamente 6 meses de idade, foram cobertas com sacolas plásticas transparentes por 48 horas. Uma alíquota de 100 µL da suspensão preparada foi espalhada sobre o meio AA (2%) + cloranfenicol a 50 ppm em placas de Petri utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram armazenadas em BOD a 25 °C com luz contínua por 6 horas, sendo avaliados o número de esporos germinados ( $n = 12$ ) e o padrão de germinação (monopolar ou bipolar).

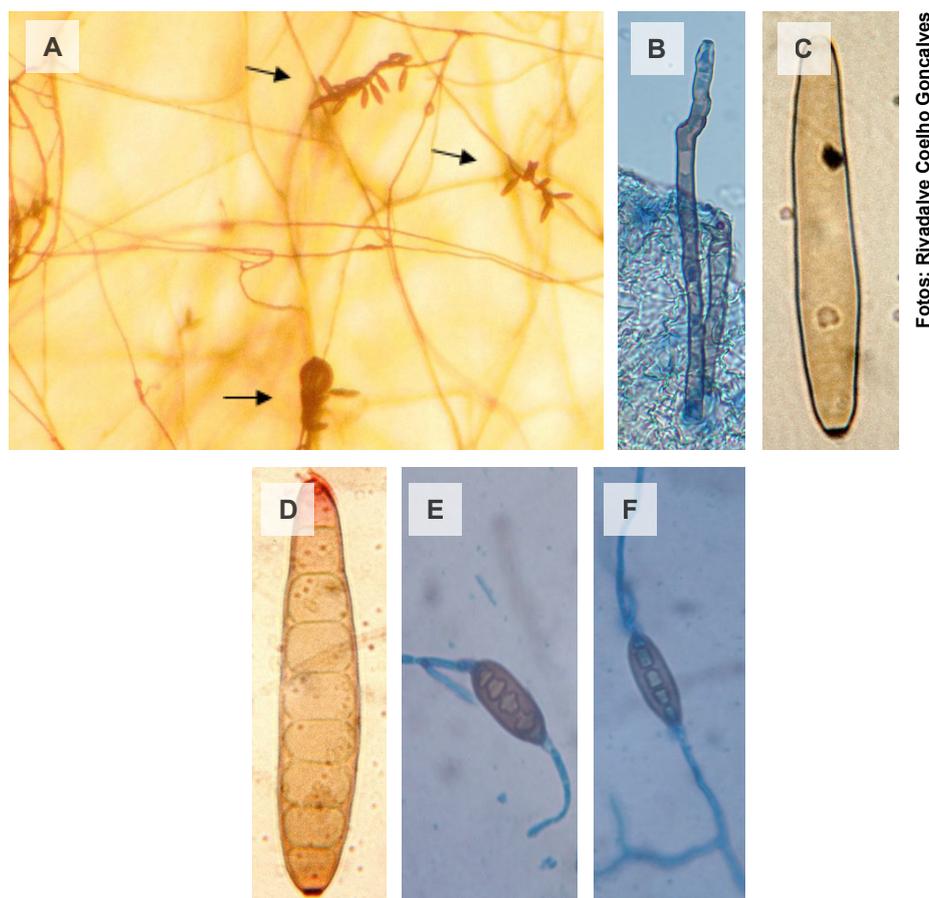
Resultados foram convertidos pela convenção positivo (+) = 1 e negativo (-) = 0 e calcularam-se a frequência acumulada absoluta (fa), frequência acumulada absoluta em porcentagem, fa (%), média aritmética de fa (%) e desvio-padrão associado a cada média. As medidas de estruturas do fungo foram obtidas com régua micrométrica fixa em ocular do microscópio de luz e o cálculo do valor real

com fator de conversão de régua calibrada. Os dados micromorfológicos foram expressos em (valor mínimo-) média aritmética  $\pm$  desvio-padrão (-valor máximo) (Manamgoda et al., 2014).

## Resultados e discussão

As lesões foliares associadas ao fungo caracterizado neste estudo, em sua forma assexuada, têm borda marrom, são aproximadamente circulares ou retangulares e delimitadas por nervura secundária. O fungo tem colônia cinza, hifa septada de cor marrom-clara mínima (Figura 1A). Os conidióforos do fungo são livres, retos a ligeiramente flexuosos, septados, lisos, geniculados, dematiáceos, de cor marrom-clara média, olivácea a marrom-clara mínima, ápice marrom-claro mínimo, com presença de cicatriz da conidiogênese evidente e de cor marrom-escura (Figura 1B), medindo (50-) 131,2  $\pm$  43,2 (-236,9)  $\mu\text{m}$  de comprimento por (7,5-) 7,5  $\pm$  0,0 (-7,5)  $\mu\text{m}$  de largura.

Na descrição de Petch (1906) consta o arranjo de conidióforos livres (hifas esparsas, não agregadas) e de comprimento variável contendo conídios septados. Os conídios são livres, retos a ligeiramente curvos ou cimbiformes, têm forma elipsoidal, dematiáceos de cor marrom-clara. Apresentam hilo inconspícuo ou ligeiramente protuberante na base (Figura 1C), com parede celular truncada, são septados, com oito distoseptos (Figura 1D), medindo (62,5-) 77,5  $\pm$  10,7 (-97,5)  $\mu\text{m}$  de comprimento por (12,5-) 12,7  $\pm$  0,8 (-15,0)  $\mu\text{m}$  de largura. A germinação dos conídios é do tipo monopolar ou bipolar (Figuras 1E e 1F).



**Figura 1.** Hifas com conidióforos e conídios livres (setas) (A), conidióforo livre (B) e conídios de *Bipolaris heveae* de seringueira com hilo ligeiramente protuberante (C e D) e com distoseptos evidentes (D), conídios de *Bipolaris heveae* com germinação bipolar (E e F).

O fungo encontrado em seringueira no Acre apresenta elevada concordância simples entre os atributos descritos como marcadores para ordem, família, gênero e espécie, contudo, há diferenças entre valores mínimos ou máximos das medidas encontradas nas espécies (Tabela 1). As dimensões do fungo encontrado no Acre em árvores são menores em relação àquelas listadas na literatura, o que pode indicar variabilidade genética na espécie, tamanho amostral diferente, idade do órgão do hospedeiro ou substratos de crescimento e esporulação distintos.

O hospedeiro em que o fungo foi encontrado, os sintomas da doença, as características macromorfológicas e micromorfológicas são suficientes para classificar o espécime encontrado. Na atual árvore taxonômica, *B. heveae* encontra-se no reino: Fungi Bartling, 1830; sub-reino: Dikarya Hibbett James & Vilgalys, 2007; filo: Ascomycota Cavalier-Smith, 1998; classe: Dothideomycetes Erikss. & Winka, 1997; ordem: Pleosporales Luttr. ex Barr, 1998; família: Pleosporaceae Nitschke, 1869; gênero: *Bipolaris* Shoemaker, 1959; espécie: *B. heveae* (Petch) Arx 1987.

**Tabela 1.** Características micromorfológicas de *Bipolaris heveae* a partir de diferentes hospedeiros e posição geográfica com valores mínimo e máximo dos atributos quantitativos.

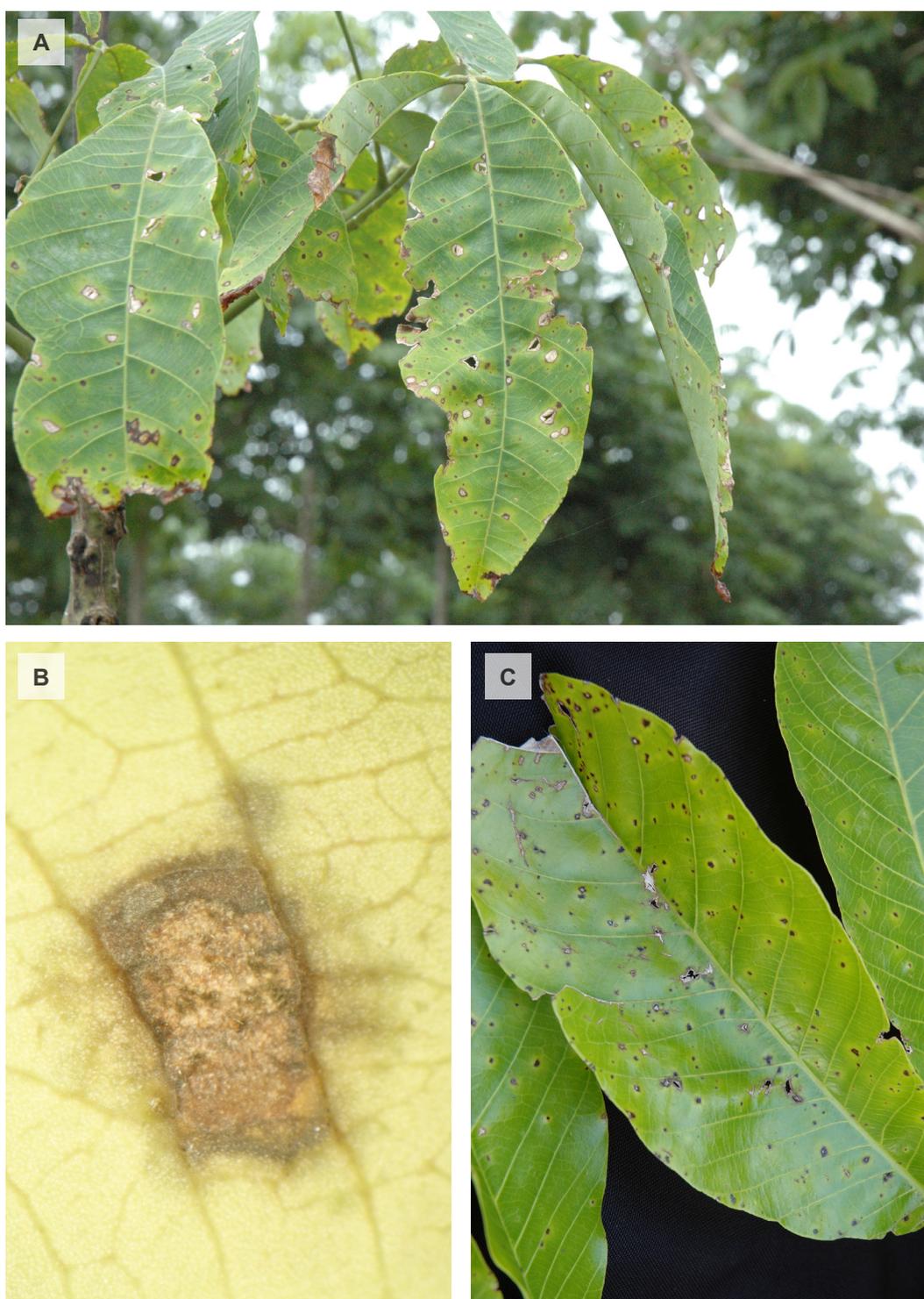
	Conidióforo		Conídio			Fonte
	Cor <sup>(1)</sup>	Tamanho (µm) <sup>(2)</sup>	Cor <sup>(1)</sup>	Tamanho (µm) <sup>(2)</sup>	NS <sup>(3)</sup>	
<i>Helminthosporium heveae</i> Petch, 1906	4	C = 80–200	3	C = 100–120 x L = 15–18	8–11	Petch (1906)
<i>Bipolaris heveae</i> (Elis, 1971)	1	C > 200 x L = 6–8	2	C = 90–130 x L = 15–21	6–11	Tsukiboshi et al. (2005)
<i>Bipolaris heveae</i> (Petch) Arx, 1987 <sup>(4)</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>Bipolaris heveae</i> (Petch) Arx emend. J.J. Muchovej & R.M.C. Muchovej	1	C = 65–223,2 x L = 5,2–10	2	C = 77,5–131,3 x L = 11,3–23,2	6–13	Tsukiboshi et al. (2005)
<i>Bipolaris heveae</i> (Petch) Arx, 1987	4	C = 92–335 x L = 4–9	5	C = 62–130 x L = 13–21	5–9	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bipolaris heveae</i> CHB01	1	C = 50–236,9 x L = 7,5	2	C = 62,5–97,5 x L = 12,5–15,0	6–11	-

<sup>(1)</sup>1 = Marrom-clara média a marrom-clara mínima. 2 = Dourada média a dourada mínima ou marrom-avermelhada. 3 = Marrom a marrom-escura e brilhosa à luz. 4 = Marrom-clara mínima a marrom olivácea. 5 = Dourada média a marrom olivácea (marrom-clara = castanho-clara, mínima = pálida). <sup>(2)</sup>C = Comprimento. L = Largura. <sup>(3)</sup>NS = Número de septos. <sup>(4)</sup>Não consultado.

O padrão de germinação dos esporos foi monopolar e bipolar sem nenhum conídio com germinação a partir de célula intermediária. A média aritmética da frequência acumulada absoluta em porcentagem, mfa (%), de conídios germinados indistintamente do padrão de germinação foi 100%. A mfa (%) ± dp de conídios com germinação do tipo monopolar foi 58% ± 8% e a mfa (%) ± dp de conídios com germinação do tipo bipolar foi 42% ± 8%. A germinação de conídios do gênero *Bipolaris* é principalmente monopolar ou ambos, monopolar e bipolar, conforme encontrado neste trabalho, mas não a partir de célula intermediária (Alcorn, 1983). Essa característica genética é suficientemente robusta para separar fungos desse gênero de fungos do gênero *Drechslera* Ito 1930 que apresentam germinação do tipo monopolar e de célula intermediária ou apenas germinação monopolar.

Outra característica genética que se soma ao padrão de germinação, para a diferenciação dos gêneros oriundos de *Helminthosporium* Link 1809, é o tipo de hilo dos conídios, o qual é fortemente protuberante em *Exserohilum* Leonard & Suggs, 1974, levemente protuberante com parede celular truncada em *Bipolaris* e não protuberante, inserido em um contorno basal arredondado (*hilum atrium type*) no gênero *Drechslera* (Alcorn, 1983).

No padrão sintomatológico da doença mancha olho de pássaro em árvores no campo as manchas foliares são ocreas, castanhas a marrom-escuras e angulares ou aproximadamente circulares (Figuras 2A e 2B). No estudo de patogenicidade, com inoculação de conídios em folíolos novos foram observados sintomas semelhantes àqueles encontrados em árvores no campo, contudo, os folíolos apresentaram lesões menores (Figura 2C), sem esporulação, provavelmente devido à condição ambiental da casa de vegetação não ter sido muito favorável à doença. Estudos em condições ambientais favoráveis padronizadas são necessários para avaliar melhor o efeito de *B. heveae* em *H. brasiliensis* e em outras plantas de interesse.



Fotos: Rivadaine Coelho Gonçalves

**Figura 2.** Folíolos maduros de *Hevea brasiliensis* com lesões da mancha olho de pássaro causada por *Bipolaris heveae*: clone CHB02 (A), clone CHB01 (B) e folíolos de seringueira no estágio D, clone CHB01 com sintomas da mancha olho de pássaro após 60 dias de inoculação e manutenção em casa de vegetação na Embrapa Acre (C).

## Conclusões

O fungo *Bipolaris heveae*, agente causal da mancha olho de pássaro, provoca severas manchas foliares em dois clones de *Hevea brasiliensis* no estado do Acre. Esta pesquisa indica a necessidade de atenção quanto à sanidade de mudas para segurança biológica, ampliação da estratégia de melhoramento genético da seringueira e estudos epidemiológicos visando ao controle da doença.

## Agradecimento

Os autores agradecem a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), por ter permitido e apoiado este estudo dentro do projeto inscrito no Sistema Embrapa de Gestão (SEG), número 02.13.07.002.00.06.001.

## Referências

- ALCORN, J. L. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. **Mycotaxon**, v. 17, n. 1, p. 1-86, 1983.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (org.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. V. 1, p. 53-90.
- ELLIS, M. B.; HOLLIDAY, P. *Drechslera heveae*. **CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, n. 343. London: United Kingdom. Commonwealth Agricultural Bureaux, 1972.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory ARS USDA**. 2016. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- GASPAROTTO, L., TRINDADE, D. R.; SILVA, E. M. **Doenças da seringueira**. Manaus: Embrapa-CNPDS. 1984. 71 p. (Embrapa-CNPDS. Circular técnica, 4). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/665222>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- JAIMES SUÁREZ, Y.; ROJAS J. M. Enfermedades foliares del caucho (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) establecido en un campo clonal ubicado en el Magdalena Medio Santandereano (Colombia). **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 12, n. 1, p. 65-76, 2011. DOI: [https://doi.org/10.21930/rcta.vol12\\_num1\\_art:216](https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num1_art:216).
- LIU, Y. X.; SHI, Y. P.; DENG, Y. Y.; CAI, Z. Y. First report of leaf spot caused by *Bipolaris setariae* on rubber tree in China. **Plant Disease**, v. 100, n. 6, p. 1240, June 2016. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1281-PDN>.
- MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A. Y.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1, p. 221-288, Sept. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L. da; DIANESE, J. C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. 555 p.
- PETCH, T. Descriptions of new Ceylon fungi. *Helminthosporium heveae* Petch. **Annals of the Royal Botanic Gardens Peradeniya**, v. 3, n. 1, p. 8, 1906.
- TSUKIBOSHI, T.; CHUNG, W. H.; YOSHIDA, S. *Cochliobolus heveicola* sp. nov. (*Bipolaris heveae*) causes brown stripe of bermudagrass and zoysia grass. **Mycoscience**, v. 46, n. 1, p. 17-21, Feb. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/S10267-004-0204-X>.