

GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *MICROCYCLUS ULEI* E SUA SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS, "IN VITRO"

LUADIR GASPAROTTO¹, REINHARD LIEBEREI² & DINALDO R. TRINDADE¹

¹Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê – EMBRAPA, Caixa Postal 319, 69000 – Manaus, AM; ²Botanisches Institut, Technischen Univ., Postf. 3329, D-3300 Braunschweig, Rep. Fed. Alemanha

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

RESUMO

Estudou-se a germinação de conídios de *Microcyclus ulei*, agente causal do mal-das-folhas da seringueira, em tubos de ensaio de 5mm de diâmetro e placas de Petri de 32mm de diâmetro, nas concentrações de 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 conídios por mililitro. A melhor germinação ocorreu nas concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 conídios por mililitro, em placas de Petri. De quatorze fungicidas testados para avaliar a eficiência da inibição "in vitro", da germinação de conídios de *M. ulei*, às concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm, os fungicidas clorotalonil, dithianon e captafol foram, em ordem decrescente, os mais eficientes.

ABSTRACT

In vitro conidia germination of *Microcyclus ulei* and its sensitivity to fungicides

Conidia germination of *Microcyclus ulei*, causal agent of South American leaf blight on rubber tree, was studied in test tubes of 5mm diameter and Petri dishes of 32 mm diameter in concentrations of 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 and 1×10^6 conidia per milliliter. Best germination occurred in concentrations of 1×10^5 and 5×10^5 conidia per milliliter when Petri dishes were used. Of the fourteen fungicides tested to evaluate their effectiveness to inhibit conidia germination in vitro at dosages of 1, 5, 10, 25, 50 and 100 ppm, chlorothalonil, dithianon and captafol were the most effective.

INTRODUÇÃO

O mal-das-folhas, causado por *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx., é a doença de maior importância econômica para a seringueira (*Hevea* spp), no Brasil, constituindo um dos principais fatores que limitam a ex-

pansão da heveicultura nacional.

A doença causa a queda prematura das folhas jovens e sob condições favoráveis ao patógeno, a planta pode perder totalmente a folhagem. Nos viveiros e jardins clonais, a alta incidência do fungo determina redução de crescimento, diminuindo a percentagem de

plantas em condições de serem enxertadas e o aproveitamento de borbulhas para enxertia na época apropriada. Em seringais adultos, ataques sucessivos durante a troca anual das folhas debilitam as plantas, resultando na redução da produção de látex, e quando estas não conseguem reenfolhar, pode ocorrer "dieback" e mesmo a morte.

O *M. ulei* apresenta durante o ciclo evolutivo três tipos de esporos, os conídios, os picnidiosporos e os ascósporos. A fase conidial, *Fusicladium macrosporum* Kuyper, é a principal responsável pela incidência da doença, pois poucos dias após a penetração, o fungo produz grande quantidade de conídios que são disseminados através da água de chuva e pelo vento, sendo este último o maior responsável pela dispersão, tanto dentro da plantação como a longas distâncias, de uma área para outra.

A fase picnidial, *Aphosphaeria ulei* P. Henn., provavelmente não tem importância na disseminação do patógeno (Langford, 1945 e Chee, 1975). A fase ascógena, *M. ulei*, que ocorre nas folhas maduras provavelmente é responsável pela sobrevivência do patógeno em condições climáticas adversas e serve de inóculo primário da doença.

A única solução a curto e a médio prazo para controlar a doença é a utilização de fungicidas protetores e/ou sistêmicos. No momento os fungicidas mancozeb, benomil e tiofanato metílico controlam-na satisfatoriamente. No entanto, outros fungicidas devem ser testados, procurando estabelecer dosagens, intervalos e métodos de aplicação.

Em consideração ao reportado por Holliday (1979), em que altas concentrações de conídios inibem a sua germinação, procurou-se neste trabalho definir a concentração mais adequada para a germinação de conídios de *M. ulei* e selecionar fungicidas que inibam a sua germinação "in vitro".

MATERIAL E MÉTODOS

Os conídios foram coletados em jardim clonal, no início da manhã, de lesões es-

poruladas de coloração olivácea a negra sobre folíolos não tratados com fungicidas. Os esporos foram removidos das lesões com auxílio de um pincel de pelo de camelo úmido e suspensos em água deionizada. A concentração de esporos foi determinada usando um hemacitômetro. As concentrações de esporos desejadas foram ajustadas diluindo com água deionizada. O tempo entre a coleta dos esporos e início dos testes nunca excedeu a uma hora e meia.

Para evitar auto-inibição na germinação dos esporos, no teste de seleção dos fungicidas, foram estudados os efeitos de diferentes concentrações de conídios (5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 esporos/ml) e da utilização de tubos de ensaio de 5mm de diâmetro e placas de Petri de 32mm de diâmetro. Foram usados 2 ml da suspensão de esporos em cada tratamento, com três repetições. Nos tubos de ensaio, a altura da camada d'água foi de 25mm, e nas placas, de 2,5mm. O ensaio foi repetido duas vezes, a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e luz ambiente. Após 1, 3, 6 e 24 horas, os esporos germinados foram contados em três campos do microscópio, num total de 200 esporos, controlados por um aumento de 250 vezes.

Considerando os resultados deste ensaio, as condições para seleção dos fungicidas foram ajustadas utilizando-se uma concentração final de 0,8 a $1,0 \times 10^5$ esporos por mililitro, em placas de Petri de 32mm de diâmetro mantidas em câmara úmida por cinco horas, a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foram testados os seguintes fungicidas: ziram, triadimefon, tiofanato metílico, bitertanol, acetamida, carbendazin, iprodione, triforine, oxicarboxin, piracarbolid, diciclidine, clorotalonil, dithianon e captafol.

Uma solução estoque de cada fungicida foi preparada em água deionizada. Os fungicidas foram testados a 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm. Em cada placa foi acionado 1 ml da concentração do fungicida em água e 1 ml de suspensão de conídios.

O delineamento estatístico utilizado

foi inteiramente ao acaso, com três repetições por tratamento, cada placa de Petri constituindo uma repetição. Após cinco horas, a ação dos fungicidas foi avaliada como no teste anterior.

A ação do fungicida foi comparada com a testemunha correspondente não tratada com fungicida, calculando-se a percentagem de inibição de germinação adaptada pela fórmula de percentagem de inibição de crescimento (P.I.C.) (Edgington *et al.* 1971).

Como os dados estão em percentagem, para a análise de variância utilizou-se a transformação em arc seno $\sqrt{x_i\%}$, sendo empregado o teste de Tukey para comparação das médias.

RESULTADOS

A germinação dos conídios iniciou-se normalmente na célula próximal (p) (Fig. 1A) dentro de três horas após a incubação. A fase de germinação (Fig. 1B) ocorreu durante cinco horas de incubação e com maior tempo de incubação houve um rápido crescimento do tubo germinativo. Dentro de 24 horas as primeiras ramificações da hifa primária (Fig. 1C) puderam ser vistas.

Nas diferentes concentrações de esporos observaram-se diferenças distintas de germinação (Fig. 2). A germinação mais efetiva ocorreu nas concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 esporos/ml, enquanto que em concentrações menores e maiores ocorreu decréscimo na velocidade de germinação. Após cinco horas de incubação, mais de 89% do total de esporos germinados produziram tubo germinativo maior que a metade do conídio.

A influência da concentração de esporos na germinação foi mais pronunciada quanto a suspensão foi mantida em tubos de ensaio (Tabela 1). Em tubos de ensaio, usando uma concentração de 1×10^6 esporos/ml, apenas poucos esporos germinaram, e após cinco horas de incubação os

Tabela 1 — Influência da concentração e recipientes na germinação de conídios de *Mycrocycclus ulei*.

Concentração de conídios	% de conídios germinados após 5 horas de incubação	
	Placas de Petri diâmetro 32mm	Tubos de ensaio diâmetro 5mm
1×10^6	61,0	2,9
1×10^5	64,3	40,0
1×10^6	42,3	0,0
1×10^5	61,3	40,0

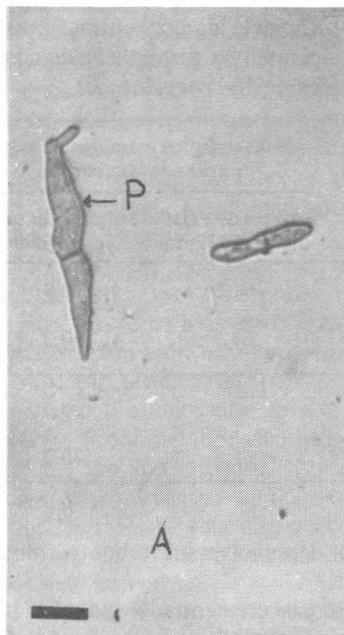
esporos não desenvolveram tubos germinativos normais.

Mesmo nas concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 esporos/ml, a germinação foi mais elevada quando os esporos foram colocados em placas de Petri de 32mm de diâmetro.

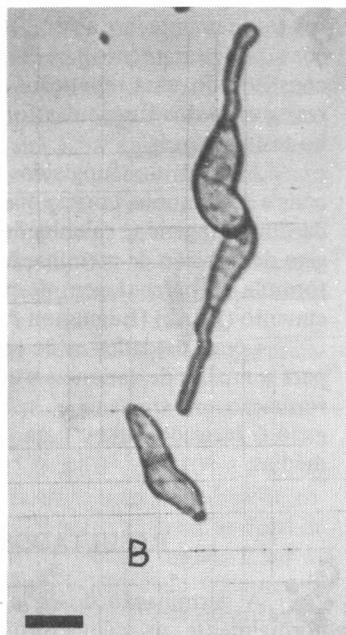
Os resultados da ação inibitória dos diferentes fungicidas na germinação dos conídios de *M. ulei* "in vitro" mostram que a germinação dos esporos foi totalmente inibida pelo clorotalonil a 1 ppm (Tabela 2). O dithianon propiciou resultados semelhantes, estatisticamente.

Os demais fungicidas apresentaram efeito de inibição crescente à medida que se aumentava a concentração, até atingirem a inibição completa, com exceção do acetamida, carbendazin, diciclidine e o bitertanol. Estes, apesar de mostrarem o mesmo efeito, não inibiram a germinação totalmente, mesmo à concentração de 100 ppm.

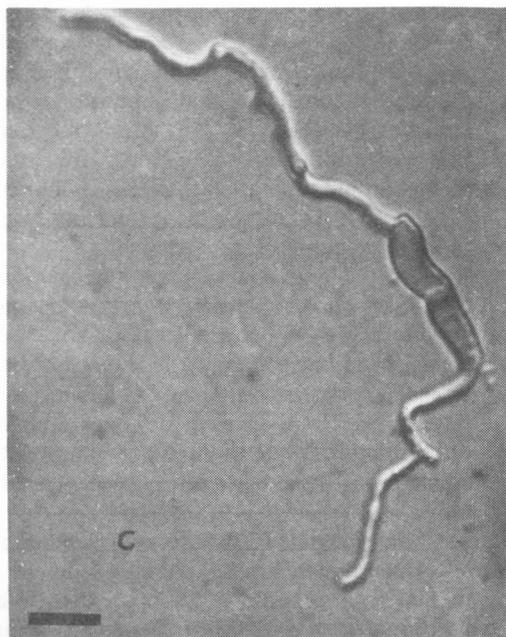
Os fungicidas sistêmicos triadimefon, triforine e piracarbolid inibiram completamente a germinação a 50 ppm, e o tiofanato metílico e oxicarboxin, a 100 ppm, enquanto que o acetamida e o carbendazin não apresentaram efeito inibitório total.



A = 3 horas



B = 5 horas



C = 24 horas

Figura 1 – Diferentes estádios de germinação de conídios de *Microcyclus ulei*. Manaus, CNPSD, 1982.

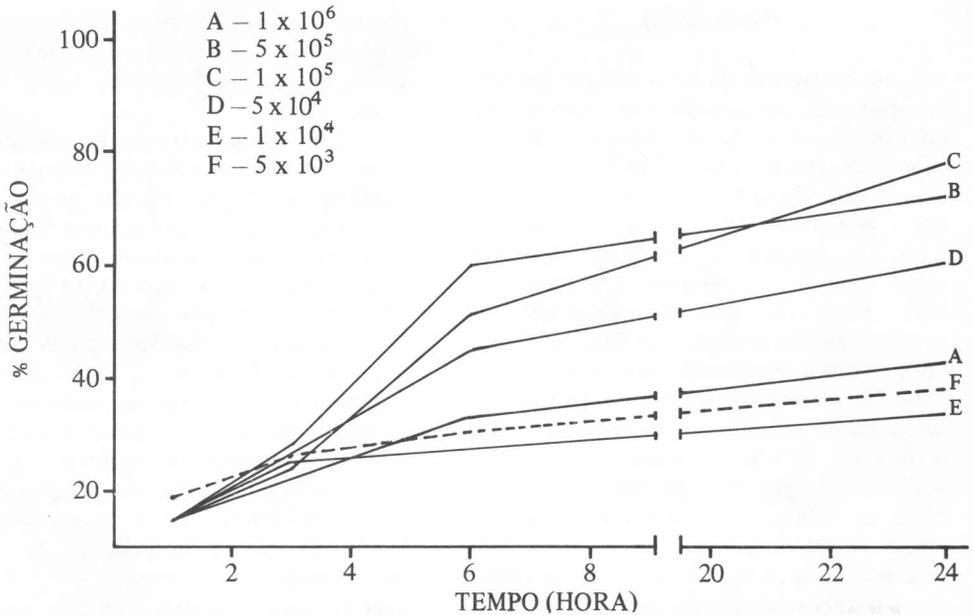


Figura 2 – Germinação de conídios de *Microcyclus ulei* em placas de Petri, em água deionizada.
 Tabela 2 – Efeitos de fungicidas e dosagens na percentagem de inibição da germinação de conídios de *Microcyclus ulei* “in vitro”.

Tratamentos	Concentrações					
	1 ppm	5 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
Ziram	17,28 d e f g	19,92 d e	74,88 a b	90,00 a	90,00 a	90,00 a
Triadimefon	4,92 g	14,22 e	42,98 d e	51,97 c d e	90,00 a	90,00 a
Tiofanato metílico	41,85 b c	59,18 b	67,90 b c	75,03 a b	84,39 a b	90,00 a
Bitertanol	22,80 c d e f g	18,65 d e	30,82 e	39,15 e	58,71 c d e	63,29 b
Acetamida	32,18 c d e	38,33 c d	43,45 d e	59,06 b c d e	59,32 c d e	68,61 b
Carbendazin	17,12 d e f g	18,44 d e	42,11 d e	48,12 d e	54,49 d e	61,93 b
Iprodione	11,64 e f g	61,69 b	66,52 b c	72,01 a b c	76,60 a b c	90,00 a
Triforine	39,94 b c	38,03 c d	58,22 b c d	69,43 a b c	90,00 a	90,00 a
Oxicarboxin	11,07 f g	36,34 c d	48,66 c d e	63,74 b c d	68,56 b c d	90,00 a
Piracarbolid	40,76 b c	50,03 b c	57,54 b c d	69,26 a b c	90,00 a	90,00 a
Diciclidine	26,24 c d e f	23,10 d e	36,54 e	46,75 d e	43,67 e	66,02 b
Clorotalonil	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
Dithianon	84,62 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
Captafol	59,77 b	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a

– dados transformados em $\text{arc seno} \sqrt{x_i\%}$
 cv: 10,56% DMS: 20,82

Médias em cada coluna, seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO

A ocorrência da auto-inibição na germinação em suspensões concentradas de esporos é conhecida em diferentes fungos (Van der Plank, 1975). Holliday (1970), usando conídios de *M. ulei*, verificou-se que a germinação chegou a quase 90% com $2,3 \times 10^5$ esporos/ml, enquanto que $4,5 \times 10^5$ esporos/ml resultou em total inibição. Estes resultados são válidos para esporos incubados em tubos de ensaio. O comportamento é totalmente diferente para esporos incubados em placas de Petri, revelando maior germinação. As diferenças não podem ser devidas ao número de esporos sedimentados por área, porque, como mostrado na Tabela 1, a alta concentração em placas de Petri tem a mesma quantidade de esporos por área que a baixa concentração em tubos de ensaio (cerca de 125000 por cm^2). Isto pode ser devido às trocas gasosas facilitadas usando placas de Petri ou a difusão dos inibidores de germinação.

A avaliação do efeito fungitóxico de diferentes princípios ativos tem sido observada pelo emprego de diferentes métodos. O método de seleção de fungicidas "in vitro" apresenta algumas restrições, mas é um dos mais comumente empregados,

por ser o menos laborioso (Cochrane, 1958; Edgington et al., 1971; Tomazelo et al., 1973; Krugner & Sacchetti, 1973; Menten et al., 1976).

Desde que o fungicida sistêmico tiofanato metílico tem sido recomendado para controle do *M. ulei* (Rocha et al., 1978), no presente estudo procurou-se compará-lo com vários outros produtos. Segundo Marsh et al. (1977), os fungicidas sistêmicos podem apresentar ação fungitóxica diferente dos produtores, não evidenciando ação direta contra o patógeno. Estes podem ser transformados em outros compostos que afetem o patógeno ou atuar indiretamente inativando toxinas ou enzimas do fungo, provocando alterações de pectinas, níveis de carboidratos, fenóis e morfologia do tecido da planta hospedeira, ou, ainda, modificando o crescimento da planta tratada tal como encurtando a fase suscetível de desenvolvimento. Talvez isto explique o fato de o tiofanato metílico ter apresentado efeito inibitório apenas à concentração de 100 ppm.

Os resultados demonstraram que clorotalonil, dithianon, captafol, piracarbolid, iprodione e triforine são produtos promissores no controle do mal-das-folhas causado pelo *M. ulei* em seringueira.

LITERATURA CITADA

- CHEE, K.H. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: spore behaviour and screening for disease resistance. In: INTERNATIONAL RUBBER CONFERENCE, Kuala Lumpur, 1975. Kuala Lumpur, RRIM, 1975. p. 1-8.
- COCHRANE, W.V. Physiology of fungi. New York, John Wiley & Sons, 1958. 526 p.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61: 42-4, 1971.
- HOLLIDAY, P. South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. Farhm Royal, CAP, 1970. 31p. (CAB. Phytopathological papers, 12).
- KRUGNER, T.L. & SACCHETTI, D. Avaliação em patógenos de eucalipto. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 7., Pelotas, 1973. Anais.
- LANGFORD, M.H. South American leaf blight of *Hevea* rubber trees. Washington, USA, 1945. (USDA. Technical bulletin, 882).
- MARSH, O.B.E.; BYRDE, R.J.W. & WOODCOCK, D. Systemic fungicides. 2ª ed. London, Logman, 1977. 401p.

- MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C. & KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Gold "in vitro". Fitopatologia Brasileira 2: 57-66. 1976.
- ROCHA, H.M.; MEDEIROS, A.G. & VASCONCELOS Fº, A.P. Comparação de fungicidas para controle do mal-das-folhas de seringueira (*Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx) em viveiro. Fitopatologia Brasileira 3: 163. 1978.
- TOMAZELO, M.; KRUGNER, T.L. & CANEVA, R.A. Nota sobre a ocorrência e controle químico de *Fusarium* sp. em cedro (*Cedula odorata* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 7., Pelotas. 1973. Anais.
- VAN DER PLANK, J.E. Principles of plant infection. New York, Academic Press, 1975. 215p.