

# Comunicado 104

---

## Técnico

ISSN 9192-0099  
Brasília, DF  
Novembro, 2003

### OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE *Dicyma pulvinata* EM MEIO LÍQUIDO E EM DIFERENTES SUBSTRATOS SÓLIDOS

João Batista Tavares da Silva<sup>1</sup>  
Sueli Corrêa Marques de Mello  
Débora Ferreira Melo  
Gabriel Lessa Catalão  
Heloísa da Silva Frazão

---

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Pq. Estação Biológica, W5 Norte, CEP 70770-900, Brasília, DF, e-mail: jtavares@cenargen.embrapa.br; smello@cenargen.embrapa.br



## INTRODUÇÃO

O fungo *Dicyma pulvinata* (Berk. & Curt.) Arx (= *Hansfordia pulvinata* [Berk. & Curt.] Hughes) tem sido relatado como micoparasita de algumas espécies de fungos (Mitchell *et al*, 1987) e por isso vem sendo estudado como uma alternativa no controle de fitopatógenos. No Brasil, foi encontrado colonizando estromas (fase ascógena) de *Microcyclus ulei* (P. Henn.) Arx, agente causal do mal-das-folhas da seringueira (*Hevea* spp.) e estromas de *Phyllachora huberi* P. Henn, e *Rosenscheldiella heveae* Junq. & Benz, causadores do complexo “crosta–negra”, desta mesma cultura (Junqueira & Gasparotto, 1991).

Diversos experimentos conduzidos em casa de vegetação destacaram a importância de *D. pulvinata* como agente de biocontrole para o *M. ulei*, por destruir as estruturas e, conseqüentemente, impedir reinfestações pelo patógeno (Santos *et al*, 2001). Considerando que o mal-das-folhas se constitui no principal fator limitante da produção de látex e expansão da cultura de seringueira no Brasil e na América Latina, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem desenvolvendo trabalhos no intuito de melhorar o processo de cultivo de *D. pulvinata* (Mello *et al*, 1999). Entretanto, há ainda necessidade de se encontrar nutrientes que promovam o crescimento e a esporulação do fungo e aumentem a eficiência em sua produção. Deve-se ressaltar a dificuldade de *D. pulvinata* produzir esporos em meio líquido, principalmente sob agitação.

Neste sentido, procurou-se avaliar componentes e concentrações ideais de nutrientes para otimização da produção

massal de micélio em meio líquido e de esporos em substratos sólidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção de inóculo de *D. pulvinata* em meios líquidos

O estudo foi desenvolvido com o isolado CG772, pertencente à Coleção de Culturas de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O inóculo semente foi preparado pela ativação de colônias em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

Na produção de micélio, foram utilizados meios contendo, como ingrediente básico, o caldo de batata, que é o resultado da água fervida contendo concentração de batata a 20%; este chá ou suco nutritivo de batata é misturado a determinadas concentrações de dextrose (BD) ou sacarose (BS). Nesses meios acrescentaram-se diferentes concentrações de peptona e extrato de levedura, componentes básicos do meio SDY que é tradicionalmente utilizado na produção de inóculo do fungo. Ao todo foram testadas 29 variações de meios líquidos básicos. Foram adicionados 50 mL de cada meio em erlenmeyers de 125 mL e depois autoclavados. Em cada um dos frascos inocularam-se 2,5 mL de uma suspensão com concentração de  $10^7$  esporos/mL. A incubação se deu a 28°C e fotoperíodo de 12 horas, sob agitação (150 rpm) durante sete dias. A determinação da massa micelial das amostras de cada frasco foi realizada após filtragem e secagem do material (estufa a 70°C).

## **Produção de conídios de *D. pulvinata* em diferentes substratos**

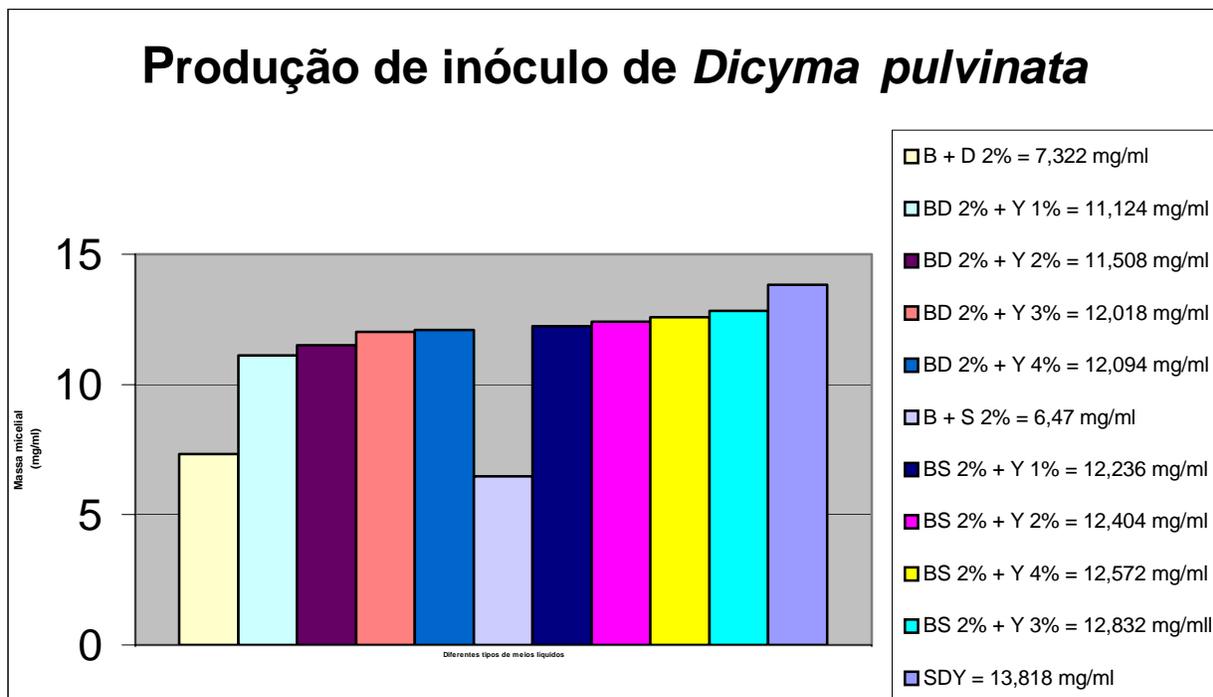
Para a produção de esporos, foram avaliados: arroz parboilizado, quirela de arroz, palha de arroz, grãos de milho e quirela de milho. Na palha de arroz, 15 gramas da mesma foi umedecida com 15 mL de caldo resultante do cozimento de batata. Em relação aos outros substratos, 100 gramas foram umedecidos com 60 mL de água destilada. Após, os substratos foram colocados em erlenmeyers de 500 mL e autoclavados. Para cada substrato foram montados dois ensaios: no primeiro utilizaram-se, como inóculo, 10 mL de micélio de *D. pulvinata* cultivado em meio SDY, e no segundo, 10 mL de suspensão de esporos ( $10^6$  esporos/mL) produzidos em meio BDA. Foram realizadas avaliações quanto à esporulação aos 8, 16, 24 e 32 dias de crescimento. O número de esporos/g de substrato foi determinado com o auxílio de câmara de Neubauer.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os meios líquidos SDY (1% peptona; 4% dextrose e 1% extrato de levedura) e BSY (20% batata; 3% sacarose e 1% extrato de levedura) foram os mais eficientes na produção de micélio (Fig. 1). Dos nutrientes testados, somente o extrato de levedura não pode ser substituído nos diferentes meios empregados. A dextrose pode ser substituída pela sacarose e a peptona, uma fonte protéica, pelo caldo de batata. Neste sentido, para a obtenção de micélio de *D. pulvinata* e utilizá-lo como inóculo em substratos sólidos na produção de esporos, pode-se empregar o meio BSY que é menos dispendioso do que o SDY e de fácil manuseio.

De modo geral, o fungo produziu esporos nos substratos sólidos avaliados. No experimento em que se realizou a inoculação com micélio, o substrato à base de milho proporcionou o maior rendimento de esporos (Tab. 1). Entretanto, quando se realizou a inoculação com suspensão de esporos, o substrato à base de arroz mostrou-se mais eficiente (Tab. 2). Verificou-se, ainda, maior produção de esporos nos tratamentos onde se utilizou micélio como fonte de inóculo do que com suspensão de esporos. Com oito dias de cultivo a produção de esporos já alcançava a  $10^8$  esporos/g de substrato, utilizando-se o milho como substrato, enquanto ao utilizar suspensão de esporos como inóculo, a produção só alcançou o máximo de  $10^6$  esporos/g de substrato aos 32 dias de incubação.

Houve aumento da esporulação até o vigésimo quarto dia após a inoculação excetuando-se no milho que já no 16º dia a esporulação era igual ao do 24º dia de incubação. Nas avaliações posteriores constatou-se redução da quantidade de esporos nos substratos avaliados. Pela disponibilidade e pelo custo relativamente barato, o emprego de meio líquido BSY e de substratos sólidos como milho e arroz, pode ser uma das alternativas na produção de micélio e de esporos do fungo. A procura de fontes nutrientes que proporcionem aumento e qualidade da esporulação de *D. pulvinata* a baixo custo é importante para o estabelecimento de padrões que possam otimizar a sua produção em maior escala.



**Figura 1. Produção de inóculo de *Dicyma pulvinata* em diferentes meios líquidos, tendo como componente básico o caldo de batata.**

**Tabela 1. Número de esporos de *D. pulvinata* produzidos em diferentes substratos sólidos, inoculados com suspensão de micélio.**

Substrato	Nº de esporos/g de substrato			
	8 dias	16 dias	24 dias	32 dias
<b>Quirela de milho</b>				
	$1,47 \times 10^8$	$5,31 \times 10^8$	$1,11 \times 10^9$	$3,17 \times 10^8$
<b>Milho</b>				
	$3,82 \times 10^8$	$1,11 \times 10^9$	$1,07 \times 10^9$	$2,98 \times 10^8$

**Palha de arroz**

1,29 X 10<sup>8</sup>  
1,13 X 10<sup>8</sup>  
2,06 X 10<sup>8</sup>  
2,37 X 10<sup>8</sup>

**Quirela de arroz**

1,77 X 10<sup>7</sup>  
2,22 X 10<sup>8</sup>  
1,98 X 10<sup>8</sup>  
7,85 X 10<sup>7</sup>

**Arroz parbolizado**

3,15 X 10<sup>7</sup>  
3,31 X 10<sup>8</sup>  
3,43 X 10<sup>8</sup>  
1,72 X 10<sup>8</sup>

**Tabela 2. Número de esporos de *D. pulvinata* produzidos em diferentes substratos sólidos, inoculados com suspensão de esporos.**

**Substrato**      N° de esporos/g de substrato

**8 dias**

**16 dias**

**24 dias**

**32 dias**

**Quirela de milho**

-X-

-X-

-X-

-X-

**Milho**

1,25 X 10<sup>6</sup>  
5,00 X 10<sup>5</sup>  
4,17 X 10<sup>5</sup>  
6,67 X 10<sup>5</sup>

#### Palha de arroz

5,00 X 10<sup>5</sup>  
5,00 X 10<sup>5</sup>  
1,42 X 10<sup>6</sup>  
1,67 X 10<sup>5</sup>

#### Quirela de arroz

1,42 X 10<sup>6</sup>  
1,33 X 10<sup>6</sup>  
1,42 X 10<sup>6</sup>  
2,50 X 10<sup>5</sup>

#### Arroz parbolizado

2,92 X 10<sup>6</sup>  
6,08 X 10<sup>6</sup>  
2,17 X 10<sup>6</sup>  
2,50 X 10<sup>5</sup>

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JUNQUEIRA, N.T.V.; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 308-331. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

MELLO, S. C. M.; FRAZÃO, H.; SANTOS, M. F.; MAGALHÃES, B. P. Produção de inoculo de *Dicyma pulvinata*, agente de biocontrole para o mal-das-folhas da seringueira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador, **Resumos...** Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p. 31.

MITCHELL, J. K., SMITH, D. H.; TABER, R. A. Potencial for biological control of *Cercoporiidium personatum* leafspot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, p. 2263-2269, 1987.

SANTOS, C. E. E.; SILVEIRA, A. A.; MELLO, S. C. M. Avaliação de isolados de *Dicyma pulvinata* quanto ao potencial de biocontrole para o mal-das-folhas da seringueira. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina, **Anais...** Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2001. p. 699-701.

Comunicado Técnico, 104	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <a href="http://www.cenargen.embrapa.br">http://www.cenargen.embrapa.br</a> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p>	Comitê de Publicações	<p><b>Presidente:</b> José Manuel Cabral de Sousa Dias  <b>Secretário-Executivo:</b> Maria José de Oliveira Duarte  <b>Membros:</b> Maurício Machaim Franco  Regina Maria Dechechi G. Carneiro  Luciano Lourenço Nass  Sueli Correa Marques de Mello  Vera Tavares Campos Carneiro  <b>Supervisor editorial:</b> Maria José de Oliveira Duarte  Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi  <b>Editoração eletrônica:</b> Giscard Matos de Queiroz</p>
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	<p>1ª edição  1ª impressão (2003): 150 unidades</p>	Expediente	