

Efeito de Substrato e condições de cultivo no desenvolvimento de quatro isolados do fungo *Dicyma pulvinata* e viabilidade de seus esporos sob diferentes temperaturas

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 219

Efeito de Substrato e condições de cultivo no desenvolvimento de quatro isolados do fungo *Dicyma pulvinata* e viabilidade de seus esporos sob diferentes temperaturas

Débora F. Melo
Sueli C. M. de Mello

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

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) 3448-4600 Fax: (61) 3340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Galvão Rocha*

Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

M 528 Melo, Débora F.

Efeito de substrato e condições de cultivo no desenvolvimento de quatro isolados do fungo *Dicyma pulvinata* e viabilidade de seus esporos sob diferentes temperaturas. / Débora F. Melo e Sueli C. M. de Mello. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

- p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 219).

1. Fungo. 2. Seringueira. 3. Controle biológico. 4. *Dicyma pulvinata*. I. Melo, Sueli C. M. de. II. Série.

632.4 – CDD 21

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	8
Resultados e Discussão.....	11
Referências	14

Efeito de Substrato e condições de cultivo no desenvolvimento de quatro isolados do fungo *Dicyma pulvinata* e viabilidade de seus esporos sob diferentes temperaturas¹

Débora F. Melo^{1,2},
Sueli C. M. de Mello³.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estabelecer condições ideais para produção massal do fungo *Dicyma pulvinata*, potencial agente de biocontrole do mal-das-folhas da seringueira. Quatro isolados do fungo foram estudados quanto ao crescimento e esporulação em diferentes substratos e condições de cultivo e foram, também, comparados quanto à capacidade germinativa sob diferentes temperaturas. De modo geral, o melhor desenvolvimento do fungo foi verificado quando cultivado em sacos de polipropileno, utilizando arroz parboilizado como substrato. Fotoperíodos de 0 e 6 horas de luz promoveram o crescimento micelial, enquanto a luz contínua favoreceu a esporulação dos isolados. Exceto 31 °C, as temperaturas testadas propiciaram o cultivo do fungo, embora diferentes repostas tenham sido verificadas, ao analisada-se a interação temperatura versus isolado. Essa interação não foi significativa para germinação de esporos, admitindo-se que a faixa de temperatura entre 19 e 25 °C assegura uma germinação de esporos do fungo superior a 76%, para as condições em que os experimentos foram conduzidos.

Termos para indexação: biocontrole, *Hevea* sp., biofungicida.

¹ Parte de Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade de Brasília (2006).

² Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Cx. Postal 4457 CEP 70910-900, Brasília, DF, e-mail: deboramelo@pop.com.br; Bolsista do CNPq

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372 CEP70770-900, Brasília, DF, e-mail: smello@cenargen.embrapa

Effect of substrate and culture conditions on development of four *Dicyma pulvinata* isolates and spores viability under different temperatures.

Abstract

This work was carried out to set up ideal conditions for massal production of the fungus *Dicyma pulvinata*, a potential biocontrol agent for South American Leaf Blight (SALB). Four isolates of the fungus were studied, in terms of the growth and sporulation in different substrates and culture conditions, and also, were compared in terms of germination capability under different temperatures. In general, the best development of the fungus was verified when cultured in polypropylene bags, using parbolized rice as a substrate.

Completed darkness and 6 hours of light advanced the mycelial growth, whereas continue light provide the sporulation. Except for 31 °C, all tested temperatures provided the cultivation of the fungus, although different responses have been verified, as the interaction temperature versus isolates was analyzed. This interaction was not significative for spore germination, admitting that temperatures between 19 and 25 ensure the spore germination upper 76% for our experimental conditions.

Index terms: Biocontrol, Hevea sp., biofungicide.

Introdução

O mal-das-folhas, conhecido internacionalmente como “South American Leaf Blight (SALB)”, constitui sério problema para o estabelecimento de seringais nas regiões úmidas da América Central e do Sul. Essa doença, causada pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. (fase ascógena) ou *Fusicladium macrosporum* Kuyper (fase conidial), encontra-se disseminada em praticamente todas as áreas cultivadas com seringueira no Brasil (MELLO et al., 2006). Apesar de restringir-se, até o momento, ao continente americano (INTERNATIONAL..., 2006; LIEBEREI, 2007), o patógeno representa forte ameaça, principalmente para o Sudeste Asiático, onde se concentram os principais países produtores de borracha. De acordo com Lieberei (2007), o fungo ainda não se disseminou para os países do Sudeste Asiático e Região do Pacífico, pelo menos em parte, devido ao intenso controle de tráfego aéreo e de navios cargueiros provenientes do continente sul americano. Na década de 1950 foi criado o APPC - “Asia and Pacific Plant Protection”, sob os auspícios da FAO. Desde então, vêm sendo introduzidas, naqueles países, várias medidas quarentenárias e proibitivas para evitar a entrada de material contaminado com o patógeno (SESSION..., 2007). Entretanto, tem sido postulado que a probabilidade futura de intensificação de vôos diretos do Brasil para outros países tropicais úmidos poderá tornar mais difícil a aplicação de tais medidas (LIEBEREI, 2007). Esse problema é de tal gravidade que ocasionou, em anos recentes, a inclusão do *M. ulei* na lista de armas biológicas (CRODDY e NEWHOUSE, 2002).

Entre as principais medidas adotadas para conter as epidemias nos países de ocorrência do patógeno, merecem destaque o uso de fungicidas químicos, a seleção de clones resistentes e a enxertia-de-copa (MATTOS et al., 2003). Entretanto, essas medidas, ao longo dos anos, não lograram resultados satisfatórios em regiões sempre úmidas, como Amazônia e Sudoeste da Bahia. Devido a isso, a heveicultura passou a ocupar áreas de menor umidade nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país, denominadas “zonas de escape”, onde prevalecem condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento da doença durante o período de renovação foliar, de julho a setembro (TAVARES et al., 2004).

Apesar do bom desempenho dos seringais cultivados sob condições adversas à doença, *M. ulei*, é um fungo que apresenta grande capacidade de mutação e poderá tornar-se um problema sério, também, nas áreas de escape, como o Cerrado (GASPAROTTO e JUNQUEIRA, 1994; MATTOS et al., 2003).

O fungo *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx [syn. *Hansfordia pulvinata* (Berk & M.A. Curtis)] é capaz de colonizar as estruturas do patógeno, tanto na fase ascógena como na conidial, reduzindo consideravelmente os desfolhamentos de plantas e a taxa de inóculo para reinfecções (JUNQUEIRA e GASPAROTTO, 1991; MELLO et al., 2006).

Ensaio de campo, conduzidos recentemente, confirmaram o potencial de isolados desse fungo, para uso no biocontrole do mal-das-folhas (MELO et al., 2008).

O desenvolvimento de método eficiente de cultivo é essencial para atender à necessidade de inóculo, em larga escala, do agente de biocontrole. Assim, este trabalho teve como objetivos obter informação quantitativa dos efeitos de substrato, recipiente, regime de luz e temperatura no crescimento e esporulação *D. pulvinata* e comparar isolados quanto à capacidade germinativa sob diferentes temperaturas.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos com as linhagens CEN 58, CEN 62, CEN 91 e CEN 93 de *D. pulvinata*, pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Salvos os casos especificados, em todos os ensaios as colônias foram incubadas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Fotoperíodos foram simulados por meio de quatro lâmpadas fluorescentes de 20 W, luz do dia, instaladas na porta da BOD (Nova Técnica, modelo NT 708-AT). Nos casos em que houve 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. Tais procedimentos foram baseados em resultados de pesquisa obtidos previamente (dados não publicados).

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, observando-se um esquema fatorial (isolados x tratamentos), com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Efeito do substrato sólido na esporulação de *Dicyma pulvinata*

Arroz parboilizado, arroz comum, milho, trigo, quirela de milho e casca de arroz foram os substratos avaliados. Exceto no caso da palha de arroz, 25 g de cada um dos substratos foram adicionados de 15 mL de água destilada, em frascos erlenmeyer de 250 mL de capacidade, deixados a hidratar por aproximadamente duas horas e, então, autoclavados a 120 °C, durante 20 minutos. Para preparo do substrato a base de casca de arroz, 8 g

desse material foram hidratados por imersão em água. Em seguida o substrato foi suplementado com 15 ml de caldo resultante do cozimento de batatas (200 g.L⁻¹) e submetido ao mesmo processo de autoclavagem.

Discos (9 mm de diâmetro) retirados das margens de colônias de *Dicyma pulvinata*, com 10 dias de idade, desenvolvidas em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), foram incorporados ao substrato contido nos Erlenmeyers (4 discos/frasco). Após 17 dias de incubação, determinou-se o número de esporos por grama de substrato, a partir de suspensão obtida pela adição, ao substrato colonizado, de 100mL água, contendo Tween 80 (polioxietileno sorbitan monolaurate) a 0,05% (p/v). Alíquotas dessa suspensão foram depositadas em câmara de Neubauer e examinadas ao microscópio ótico, usando aumento de 40X, para contagem dos esporos. Realizaram-se três leituras de cada repetição.

Efeito do tipo de recipiente na esporulação de *Dicyma pulvinata*

Com a finalidade de comparar os recipientes usualmente utilizados para produção do fungo, em termos de rendimento de esporos, foi montado um experimento utilizando bandejas, sacos de polipropileno e erlenmeyers.

As bandejas, retangulares de alumínio (30 x 44 x 4,5 cm), foram recobertas por sacos plásticos autoclaváveis, cujas aberturas foram dobradas e grampeadas, após a deposição e completo espalhamento de 500g de arroz parboilizado. Os sacos de polipropileno (28 x 42 cm), que também foram fechados com auxílio de grampeador, receberam 200 g de arroz parboilizado, sendo posicionados na vertical. 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 e 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. A massa micelial para inoculação foi produzida em meio líquido SDY (peptona 10g.l⁻¹; dextrose 40g.l⁻¹; extrato de levedura 10g.l⁻¹). Para tanto, cinco discos (9 mm de diâmetro) de colônias, produzidas como no item anterior, foram transferidos para o meio SDY contido em frascos erlemeyers de 500 mL (150 mL/frasco). A incubação transcorreu sob agitação, durante 7 dias. A concentração usada para inoculação foi de 10 % (p/v) de micélio, independentemente do recipiente que continha o substrato. Após 17 dias de incubação, amostras de 5 g de arroz colonizado foram retiradas ao acaso, de cada recipiente, para determinação da concentração de esporos. As suspensões para contagem dos esporos em câmara de Neubauer foram preparadas pela adição, às amostras, de 30 ml de água contendo Tween 80 a 0,05 % (v/v).

Efeito 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 os quatro isolados de *D. pulvinata*, utilizando duas formas de cultivo: em meio BDA e em arroz parboilizado.

No primeiro experimento, discos de 9 mm de diâmetro retirados de colônias desenvolvidas nas condições anteriormente descritas, 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, devidamente umedecidos e autoclavados. Cada frasco recebeu quatro discos (9 mm) provenientes das mesmas colônias. As placas e frascos, após inoculação, foram submetidos aos seguintes fotoperíodos: escuro contínuo, 6 horas de luz/escuro, 12 horas de luz/escuro e luz contínua.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada, tomando-se as medidas do diâmetro das colônias desenvolvidas em meio BDA, aos 4, 8, 12 e 16 dias de incubação. A esporulação, tanto em BDA como no arroz parboilizado, foi estimada aos 17 dias após inoculação, tomando-se alíquotas de suspensão em água destilada adicionada de Tween 80 a 0,05% (v/v), para contagem de esporos.

Efeito da temperatura de incubação no crescimento micelial e na esporulação de colônias de *D. pulvinata*, desenvolvidas em meio BDA e em arroz parboilizado

O fungo foi cultivado em BDA e em arroz parboilizado, seguindo-se os mesmos procedimentos para inoculação e avaliação descritos no experimento anterior. As temperaturas testadas foram: 19, 22, 25, 28 e 31°C, mantendo-se o regime de 12 horas de luz/escuro.

O período de incubação adotado, tanto para determinação do crescimento micelial como para avaliação da produção de esporos foi de 16 dias.

Comparação do isolados de *D. pulvinata* quanto à capacidade germinativa sob diferentes temperaturas

Para avaliar a capacidade germinativa dos isolados CEN 58, CEN 62, CEN 91 e CEN 93 de *D. pulvinata*, foram testadas as temperaturas de 19, 22, 25, 28 e 31°C. Suspensões de esporos, cuja incubação ocorreu à temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz/escuro foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar-água e incubadas por 17 horas. De cada isolado, foram preparadas quatro placas para cada uma das

temperaturas testadas, e cada placa recebeu 200 uL de suspensão à concentração de 1×10^5 esporos.mL⁻¹. A porcentagem de germinação foi determinada por meio do exame de 100 conídios/placa, visualizados em campos microscópicos aleatoriamente escolhidos, com aumento de 40X. Consideraram-se germinados, os conídios com tubo germinativo maior ou igual o seu diâmetro.

Resultados e Discussão

Efeito do substrato sólido na 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 em arroz parboilizado. Observou-se menor esporulação quando a palha de arroz foi utilizada como substrato, embora acrescida de caldo de batata (Tabela 1).

A produção de fungos agentes de controle biológico no Brasil, assim como em outros países, tem sido baseada no uso de grãos de arroz ou outros cereais como substrato (JACKSON, 1997; THANGAVELU et al., 2004; FONTES et al., 2007; FARIA e MAGALHÃES, 2008). Isto se deve, em parte, ao fato de que nem todos os fungos produzem esporos em culturas submersas (BOYETTE et al., 1991). Grãos de cereais apresentam a vantagem de serem prontamente biodegradáveis, facilitando as aplicações no campo (THAGAVELU et al., 2004). Adicionalmente, eles apresentam facilidade para quantificação dos propágulos produzidos. Entretanto, materiais vegetais de baixo custo e facilmente disponíveis representam opção desejável para a inserção do controle biológico num modelo agrícola econômico e ambientalmente sustentável. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o arroz parboilizado permanece como substrato mais propício para a produção de *D. pulvinata* em larga escala, embora outros substratos, como resíduos industriais e agrícolas possam ainda ser testados. A combinação das técnicas de fermentação submersa e sólida, em que o micélio produzido em meio líquido é coletado e incorporado ao substrato para esporulação, conforme sugerida por Boyette et al. (1991), constitui alternativa a ser explorada.

Efeito do tipo de recipiente na esporulação de *Dicyma pulvinata*

Os sistemas de produção testados para produção de propágulos dos quatro isolados de *D. pulvinata*, comparados em termos de esporulação não diferiram estatisticamente entre si, para a maioria dos isolados. Entretanto, para o isolado CEN 93, a produção em Erlenmeyers foi maior do que a obtida nos outros dois recipientes (Tabela 2).

O uso de sacos de polipropileno apresenta facilidade de manuseio, além de economicamente viável. Por isso vem sendo largamente empregado na produção de diversos fungos, a exemplo de *Metarhizium* spp. e *Beauveria bassiana* (LEITE et al., 2003).

Efeito do fotoperíodo no crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*

Não houve interação significativa entre os fatores (fotoperíodos e isolados), para os valores de diâmetro de colônias. Os resultados mostraram que escuro contínuo, assim como seis horas de luz/escuro, 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 um isolado de *D. pulvinata* constatou que a ausência de luz promoveu o crescimento do fungo.

Aos 04 e 08 dias de incubação, não se observou diferença entre os isolados, quanto ao crescimento. Porém, aos 12 e aos 16 dias, os isolados CEN 58 e CEN 91 apresentaram os maiores valores médios de diâmetro de colônias (Figura 1).

De maneira geral, luz contínua favoreceu a esporulação dos isolados de *D. pulvinata*. No experimento realizado em meio de cultura BDA, apenas CEN 93 não sofreu influência dos fotoperíodos testados. Para os demais isolados, os demais isolados 24 horas luz contínua resultou em maior esporulação.

Quanto ao experimento com substrato sólido, a esporulação foi semelhante com os fotoperíodos de 12 horas de luz/escuro e 24 horas de luz contínua, para o isolado CEN 58. Já o isolado CEN 93 respondeu melhor ao fotoperíodo de 24 horas de luz contínua, enquanto CEN 62 e CEN 91 não apresentaram diferença significativa, em relação aos regimes de luz estudados.

Segundo relato de Rodrigues (2002) em seus estudos com um isolado de *D. pulvinata*, houve uma variedade de respostas aos diferentes comprimentos de onda que compõe o espectro de luz visível; a esporulação foi maior com luz branca, azul e ausência de luz. Os dados aqui obtidos corroboram postulados de que, durante seu desenvolvimento, os fungos respondem diferentemente aos estímulos de iluminação, demonstrando assim, a importância desses resultados. Como tais diferenças se mostraram dependentes, também, do tipo de meio de cultivo (meio BDA e substratos sólido) é importantes levar em consideração o intuito da produção e o isolado selecionado com base na sua eficiência de biocontrole. No caso de isolados que não apresentam exigências em termos de

fotoperíodo, o processo de produção de inóculo poderá, em função disso, tornar-se mais simples e menos oneroso.

Loureiro et al. (2002), cita que a produção de conídios é aumentada em presença de luz. Entretanto, para que se alcance o rendimento máximo é necessário que se determine o regime e o tipo de luz, pois ambos constituem parâmetros bastante variáveis entre isolado da mesma espécie.

Efeito da temperatura de incubação no crescimento micelial e na esporulação de colônias de *D. pulvinata*, desenvolvidas em meio BDA e em arroz parboilizado

Exceto 31 °C, as temperaturas testadas propiciaram o cultivo dos quatro isolados de *D. pulvinata*. A 28 °C, observou-se um menor crescimento micelial do fungo. Para o isolado CEN 58 e CEN 91, a melhor temperatura foi de 25 °C. Já para os isolados CEN 62 e CEN 93, as temperaturas de 19, 22 e 25 °C não apresentaram efeito significativo no crescimento de *D. pulvinata* (Figura 2).

Em termos de esporulação, foram observadas diferenças quanto à resposta dos isolados do fungo às temperaturas, tanto em meio BDA como em arroz parboilizado. Em meio BDA, temperaturas de 19, 22 e 25 °C não exerceram efeito significativo sobre os isolados CEN 58 e CEN 93. Porém, os isolados CEN 62 e CEN 91 esporularam melhor a 22°C. Com relação ao cultivo em arroz parboilizado, o isolado 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⁻¹ de substrato. CEN 62 e CEN 91 foram favorecidos pelas temperaturas de 19 e 22 °C, com maior produção de esporos. Já o isolado CEN 93, não apresentou diferença em termos de produção de esporos a temperaturas de 19, 22 e 25°C, cujos valores e rendimento de esporos.g⁻¹ de substrato foram significativamente superiores aos obtidos a 28 °C (Tabela 4).

Comparação do isolados de *D. pulvinata* quanto à capacidade germinativa sob diferentes temperaturas

Quanto à germinação dos conídios, não houve interação entre tratamentos e isolados e, assim, são apresentadas as médias gerais para temperaturas e isolados (Figura 3). A porcentagem média esporos germinados foi mais elevada na temperatura de 22 °C que, entretanto, não diferiu significativamente dos valores obtidos nas temperaturas de 19 e 25 °C. Entre os isolados, os maiores valores médios de porcentagem de germinação ocorreram com CEN 62 e CEN 93, que não diferiram entre si. Esses resultados estão de acordo com

Leite et al. (2003), ao afirmarem que grande parte dos fungos hifomicetos, durante o crescimento e conidiogênese, são favorecidos por temperaturas próximas de 25 °C. Mitchell E Taber (1986) ao estudarem um isolado de *D. pulvinata* procedente do Texas (EUA), observaram ponto máximo de crescimento, em meio líquido, entre 23 e 25°C, com declínio de 22 % no crescimento à temperatura de 28 °C. Esse efeito da temperatura foi, também, observado na colonização e esporulação sobre lesões de *Cercosporidium personatum*, determinando as temperaturas na faixa de 23 a 25 °C como ideal para atividade do fungo.

Os quatro isolados estudados, neste trabalhos, apresentaram comportamento semelhantes em termos de desenvolvimento e germinação. Esse é um dado relevante, tanto para produção do fungo, como para inferir sobre as condições ambientais e indicação dos períodos ideais para aplicação do fungo.

Não foi constatado desenvolvimento de colônias, com nenhum dos isolados, à temperatura de 31 °C, após 17 dias de incubação. Essas colônias, ao serem transferidas para BOD com temperatura de 25°C, cresceram e esporularam, tanto em meio BDA como em arroz parboilizado. Os esporos assim obtidos, mostraram-se viáveis. Dados semelhantes foram constatados com outros fungos, como *Cercospora piaropi*, que apesar de não se desenvolver a 35 °C, quando transferido para 25 °C, apresentou crescimento radial (ÁVILA, 2002).

Referências

ÁVILA, Z. R. **Estudo de *Cercospora piaropi* como agente de controle biológico de *Eichhornia crassipes* e sua associação com o herbicida 2,4 D.** 2002. 89p. Tese (Doutorado). - Universidade Estadual Paulista.

BOYETTE, C. D.; QUINBY JUNIOR, C. P.; CONNICK JUNIOR, W. J.; DAIGLE, D.; FULGHAM, F. E. Progress in the production, formulation, and application of mycoherbicides. In: TEBEEST, D. O. (Ed). **Microbiol control of weeds**. New York: Chapman and Hall, 1991. p. 209-224.

CRODDY, E.; NEWHOUSE, L. **'Select agent' of pathogens and toxins.** 2002. Disponível em: <<http://cns.miis.edu/research/cbw/biosec/pdfs/agents.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2008.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. **O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas.** Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio22/22_3.asp>. Acesso em: 26/03/2008.

FONTES, F. O.; SILVA, A. C. F.; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de crescimento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* sp. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, p. 221-228, 2007.

GASPAROTTO, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*, causal agent of rubber tree leaf blight. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, p. 22-28, 1994.

INTERNATIONAL RUBBER RESEARCH AND DEVELOPMENT BOARD. Portrait of the global rubber Industry: driving the wheel of the world economy. Kuala Lumpur, 2006. 200 p.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, GB, v. 19, p. 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. p. 307-331. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

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

LIEBEREI, R. D. South American Leaf Blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. **Annals of Botany**, London, v. 100, p. 1125-1142, 2007.

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**, São Paulo, SP, v. 69, p. 79-83, 2002.

MATTOS, C. R. R.; GARCIA, D.; PINARD, F.; LEGUEN, V. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 502-507, 2003.

MELLO, S. C. M.; SANTOS, M. F.; SILVA, J. B. T. Isolados de *Dicyma pulvinata* em estromas de *Microcyclus ulei* em seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, p. 359-363, 2006.

MELO, D. F.; MELLO, S. C. M.; MATTOS, C. R. R.; CARDOSO, S. E. A. Compatibilidade de *Dicyma pulvinata* com defensivos agrícolas e eficiência do biocontrole do mal-das-folhas em campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, p. 179-185, 2008.

MITCHELL, K. J.; TABER, R. A. Factors affecting the biological control of *Cercosporidium* leaf spot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. **Phytopathology**, Saint Paul, USA, v. 76, p. 990-994, 1986.

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**. 2002. 39p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso.

SESSION OF THE ASIA AND PACIFIC PLANT PROTECTION COMMISSION, 25., 2007, Beijing, China. **Reporter...** Bangkok: FAO, Regional Office for Asia and the Pacific, 2007. 126 p.

TAVARES, E. T.; TIGANO, M. S.; MELLO, S. C. M.; MARTINS, I.; CORDEIRO, C. M. T. Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, p. 148-154, 2004.

THANGAVELU, R.; PALANISWAMI, A.; VELAZHAHAN, R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. **Agriculture, Ecosystem & Environment**, Amsterdã, NL, v. 103, p. 259-263, 2004.

Tabela 1. Esporulação de isolados de *Dicyma pulvinata* em diferentes substratos sólidos

Substratos	Isolados			
	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 ($\times 10^6$ esporos.g⁻¹ de substrato). Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas na vertical e minúscula na horizontal) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados por SQRT ($x + 0,5$).

Tabela 2. Produção de esporos de *Dicyma pulvinata* em diferentes recipientes contendo arroz parboilizado.

Métodos de produção	Isolados			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
Sacos de polipropileno	1,861 Aa*	1,205A bc	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⁻¹ 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, no sentido horizontal.

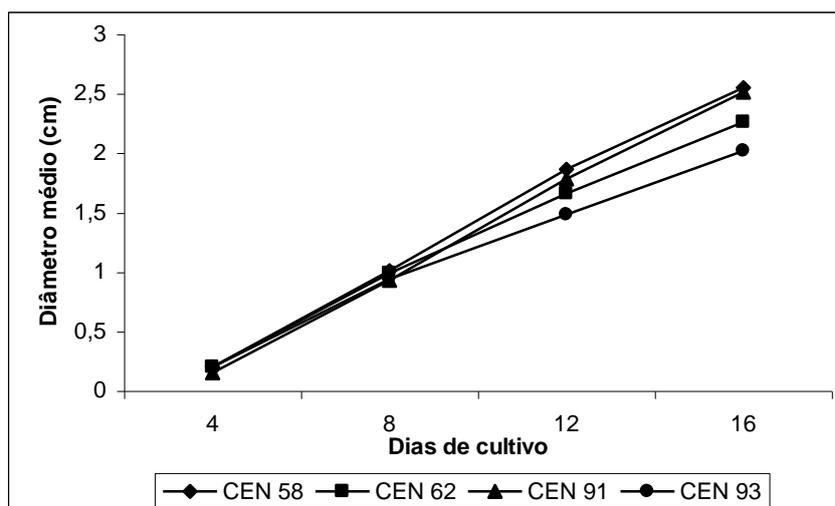


Figura 1. Diâmetro médio das colônias de isolados de *Dicyma pulvinata* em diferentes períodos de cultivo (dias).

Tabela 3. Esporulação média de isolados de *Dicyma pulvinata* nos fotoperíodos de escuro contínuo, 6 horas de luz/escuro, 12 horas de luz/escuro e claro contínuo, aos 17 dias de crescimento em meio de cultura BDA e em arroz parboilizado.

Fotoperíodos (horas diárias)	Crescimento em meio de cultura BDA				Crescimento em arroz parboilizado			
	Isolados				Isolados			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
0	2,57 Ca*	0,85 Ba	1,17 Ba	0,32 Aa	3,05Bb**	5,11 Aab	0,49 Ac	6,38 Ba
6	7,02 Ba	3,57 Bab	3,62 Bab	0,45 Ab	2,90 Bbc	4,43 Ab	1,49 Ac	7,44 Ba
12	3,82BCa	0,77 Ba	1,97 Ba	0,47 Aa	4,21ABb	3,92 Ab	0,39 Ac	7,13 Ba
24	17,45 Aa	9,77 Ab	11,67Ab	0,85 Ac	6,35 Ab	5,82 Ab	1,62 Ac	11,32 Aa
	CV = 20,25				CV = 28,94			

*Esporulação média ($\times 10^5$ esporos.ml⁻¹). **Esporulação média ($\times 10^7$ esporos.g⁻¹ de arroz parboilizado). 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.

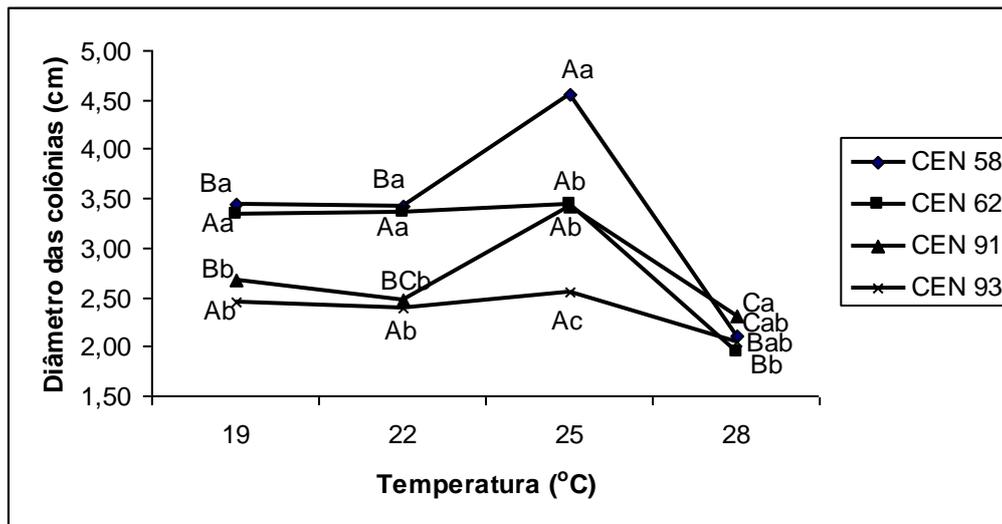


Figura 2. Diâmetro médio de colônias de *Dicyma pulvinata* crescidas sob diferentes temperaturas, aos 16 dias de idade. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na horizontal e minúscula na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV = 5,45.

Tabela 4. Esporulação de isolados de *Dicyma pulvinata* em meio de cultura BDA e em arroz parboilizado sob diferentes temperaturas aos 17 dias de crescimento.

Temperaturas	Meio de cultura BDA				Arroz parboilizado			
	Isolados				Isolados			
	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93	CEN 58	CEN 62	CEN 91	CEN 93
19 °C	8,2 Ab*	10,45 Bb	15,15 Ba	3,95 Ac	8,40Aa**	6,06 Abb	9,05 Aa	5,32 Ab
22 °C	9,8 Ac	15,8 Ab	23,9 Aa	4,2 Ad	5,43 Bb	7,34 Ab	9,65 Aa	6,34 Ab
25 °C	7,15 Aba	2,42 Cb	4,77 Cab	1,40 Ab	4,61 Bab	4,03 Bab	2,51 Bb	6,04 Aa
28 °C	3,47 Ba	0,37 Ca	2,20 Ca	0,75 Aa	3,86 Ba	0,81 Cb	0,29 Cb	0,23 Bb
	CV = 29,71				CV = 22,43			

*Esporulação média (x 10⁵ esporos.ml⁻¹). **Esporulação média (x 10⁷ esporos.g⁻¹ de substrato). 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.

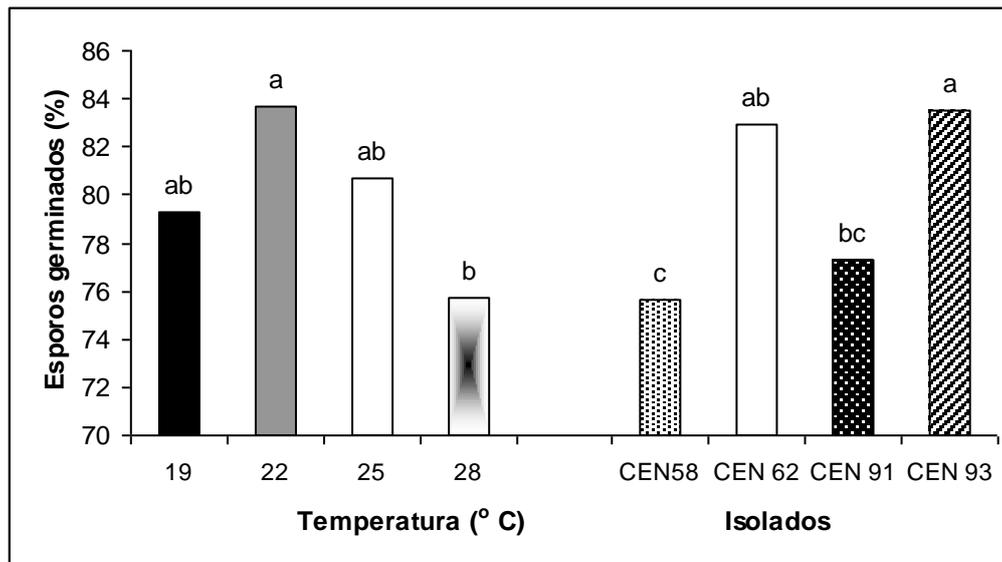


Figura 3. Germinação de esporos de quatro isolados de *Dicyma pulvinata* sob diferentes temperaturas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. CV = 7,72.