Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Comunicado 184
Técnico

ISSN 0102-0099
Dezembro/2003
Campina Grande, PB

Cultivo e Análise Isoenzimática de *Amphobotrys ricini*, Agente Causal do Mofo Cinzento da Mamoneira

Lúcia Vieira Hoffmann[1]
Taciana de Carvalho Coutinho[2]
Elizabeth Amélia Alves Duarte[2]
Catarina de Medeiros Bandeira[2]
Nelson Dias Suassuna[3]

A cultura da mamoneira reveste-se de grande importância pelas várias aplicações industriais e pela facilidade em que se propaga e, ainda, por seu seu potencial para cultivo em pequenas propriedades, absorvendo significativa quantidade de mão-de-obra.

O Brasil, que durante a década de 80 chegou a ser o segundo maior produtor mundial de mamona, hoje é o terceiro produtor, perdendo para Índia e China. Tal decréscimo é devido à falta de tecnologias de produção e a pouca disponibilidade de cultivares melhoradas (SANTOS et al., 2001).

Apesar de ser considerada uma planta rústica, a mamoneira é suscetível a várias doenças. O primeiro relato da doença da mamoneira, denominada mofo cinzento, ocorreu em 1918, sendo, posteriormente detalhado um estudo sobre seu agente causal, denominado *Botrytis ricini* (GODFREY, 1923). A forma perfeita do fungo foi mais tarde determinada (WHETZEL, 1945), nomeada *Botryotina ricini.* O estado anamorfo do fungo foi retirado do gênero *Botrytis* em 1973 e transferido para o gênero *Amphobotrys* (HENNEBERT, 1973). Apesar de já ter sido encontrada a forma perfeita do patógeno mencionado, neste trabalho ele será referido pela sua forma imperfeita.

No Brasil, o mofo cinzento foi constatado pela primeira vez no Estado de São Paulo, em 1932 (GONÇALVES,1936). A doença foi crescendo em importância na medida em que se foi intensificando a exploração da mamoneira em escala comercial, quando passou a causar sérios prejuízos. Hoje é considerada, em algumas regiões do país, uma das principais doenças desta cultura, ocasionando perdas significativas à produção (FORNAZIERE JÚNIOR,1986). Sua distribuição é praticamente generalizada, ocorrendo nas regiões produtoras onde as condições climáticas são favoráveis ao seu desenvolvimento. No Nordeste, o mofo cinzento tem sido constatado na região agreste dos Estados da Paraíba e Pernambuco (LIMA E SOARES, 1990).

A mamoneira foi, até pouco tempo, considerada a única hospedeira deste patógeno (KIMATI,1980). Todavia, existem relatos da ocorrência de *A. ricini* em *Caperonia palustris* (WHITNEY E TABER, 1986), *Euphorbia supina, E. pulcherrima* (HOLCOMB et al.,1989) e *E. milii* .

[1]Eng. Agr. Dr. Pesquisadora Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720 Campina Grande, PB.
[2]Estudante Ciências Biológicas, UEPB, estagiária Embrapa Algodão.
[3]Eng. Agr. MSc.Pesquisador Embrapa Algodão.

Embrapa

O fungo afeta a planta em qualquer estágio de seu desenvolvimento, causando, inicialmente, pequenas manchas de coloração azulada, sobre as quais surge uma exsudação de cor amarelada. Se as condições climáticas forem favoráveis, ocorre abundante desenvolvimento de hifas do fungo sobre os tecidos da planta, assemelhando-se a uma teia de aranha, com posterior frutificação do patógeno. A medida em que o cacho afetado envelhece, a teia micelial do fungo torna-se mais escura e as cápsulas ficam frouxas e pendentes. O patógeno afeta o teor de óleo e a qualidade das sementes, tornando-as chochas (GODFREY, 1923).

Neste trabalho visou-se estabelecer rotinas de cultivo, protocolos de extração de DNA e caracterizar perfis isoenzimáticos de alguns isolados do patógeno.

Frutos de mamoneira com sintomas típicos de mofo cinzento foram utilizados para isolar o patógeno. Foram isolados materiais coletados no município de Novo São Joaquim – MT (Br001; Br002 e Br003) e no campo experimental da Embrapa Algodão, município de Campina Grande – PB (Br0O5 e Br006).

Discos de micélio foram transferidos a partir de placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar) para erlenmeyers (250mL) contendo 100mL de um dos seguintes meios líquidos: *i)* batata dextrose (BD); *ii)* extrato de ervilha 100mg/L; *iii*) meio de Armstrong, contendo: 20 g/L de sacarose; 0,4 g/L de $MgSO_4.7H_2O$; 1,6 g/L de KCl; 1,1g/L de KH_2PO_4; 5,9g/L de $Ca(NO_3)_2$; 1,447mg/L de $Fe(NO_3)_3.9H_2O$; 0,8796mg/L de $ZnSO_4.7H_2O$; 0,406mg/L de $MnSO_4.4H_2O$ (MENEZES E SILVA-HANLIN, 1997). Os isolados foram incubados no escuro, por cinco dias, em agitador, a 120rpm. O micélio obtido em cada amostra foi filtrado em papel filtro com auxílio de bomba de vácuo, pesado, embrulhado em papel de alumínio e congelado a - 20°C. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com duas repetições, três meios de cultura e cinco isolados.

O micélio dos isolados foi macerado em nitrogênio líquido, adicionado aos tampões *A* (Tris HCl 0,6173M pH 6,8) ou *B* (34mM de K_2HPO_4; 0,2M de sacarose; 2,56% de polivinil-pirrolidona (PVP-40); 3mM de ditiotreitol; 5,7mM de ácido ascórbico; 5,8mM de dietilcarbamato de sódio; 2,6mM de bissulfito de sódio; 2,5mM de $Na_2B_4O_7.10H_2O$; 1% de polietilenoglicol-6000; 0,2% de 2-mercaptoetanol (ALFENAS, 1998), na proporção de 1:2 (p/v) de micélio para tampão extrator. O extrato foi transferido para tubo eppendorff e centrifugado a 12000*g* por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo novo, e 25µL destes aplicados em gel de 7,5% de acrilamida (aáesterase e superóxido dismutase) ou 10% de acrilamida (– esterase e enzima málica) preparados conforme descrito por Alfenas (1998). Os géis foram revelados para superóxido dismutase, na presença de luz, em solução contendo riboflavina 0,004%, Na_2EDTA 0,3% e 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-Difeniltetrazólio brometo (MTT) 2% em Tris-HCl 0,05M pH 8,5. Bandas de enzima málica foram visualizadas após incubação a 37°C com solução contendo 0,02% de $NADP^+$, 0,02% de MTT; 0,002% de fenazina metosulfato (PMS) e 0,02% de $MgCl_2$ em Tris-HCl 0,1M pH 8,0 ou pH 8,5. Para a visualização de alfa ou beta esterase os géis foram incubados na presença de alfa ou beta naftil-acetato 0,03%, fast blue RR salt 0,1% em tampão fosfato de potássio 0,05 M oH 6,0.

Os cinco isolados cresceram bem em meio de batata dextrose ou ervilha, porém o desenvolvimento não foi satisfatório em meio Armstrong, conforme observado na Tabela 1. Ocorreu contraste de médias entre os diferentes meios de cultura, segundo o teste *F*, mas não entre isolados ou de interação entre isolados e meios de cultura. Os pesos médios de micélio foram maiores para os meios BD e extrato de ervilha, os quais não diferiram entre si; todavia, foram significativamente superiores ao meio Armstrong pelo teste de Tukey, a nível de 5% de significância.

Preparados como descrito, os pHs dos meios foram de 5,93; 6,45 e 4,70, para BD, extrato de ervilha e meio de Armstrong, respectivamente.

A extração de proteínas utilizando-se como tampão de extração Tris-HCl pH 6,8 0,6173M (tampão de extração *A*) permitiu a visualização de duas bandas de superóxido dismutase (Figura 1A). Porém, quando utilizado o tampão *B*, mais complexo, apenas uma banda foi observada para 3 isolados testados. Uma das possíveis causas para a não visualização da banda adicional é de que componentes do tampão podem ter atuado como inibidores da atividade da enzima. Assim, embora tampões de extração mais complexos possam ser requeridos devido a sua ampla gama de antioxidantes, que podem ser liberados de compartimentos celulares durante a extração de proteínas e prejudicar algumas das enzimas mais sensíveis à oxidação, em casos específicos tampões mais simples são requeridos.

As bandas de superóxido dismutase foram visualizadas tanto quando a extração de proteínas foi feita imediatamente antes da aplicação do gel como quando feita 40 dias antes e mantido

Tabela 1. Peso médio de micélio de *Amphobotrys ricini*, em gramas, obtido após cinco dias de crescimento em diferentes meios líquidos de cultura.

Isolado	Local	Meio de cultura			Média
		BD	Ervilha	Armstrong	
Br001	Novo São Joaquim, MT	0,67	7,50	0,17	2,73a
Br002	Novo São Joaquim, MT	0,13	1,19	0,00	0,43a
Br003	Novo São Joaquim, MT	3,92	1,40	0,02	1,78a
Br005	Campina Grande, PB	3,75	1,30	0,01	1,69a
Br006	Campina Grande, PB	4,50	2,85	0,01	2,45a
Média		2,59 a	2,84 a	0,012 b	1,82

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha ou mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

congelado na forma de extrato (Figura 1A). Assim, esta forma de conservação foi eficiente.

Duas bandas de enzima málica foram observadas após cerca de 20 minutos de incubação em tampão de pH 8,5 (Figura 1B). O tempo de incubação foi um pouco menor quando o tampão da solução de revelação tinha pH 8,0; além disso, o gel incubado na solução de menor pH mostrou uma terceira banda, de menor mobilidade relativa. Quando as proteínas foram armazenadas congeladas na forma de extrato não foram visualizadas bandas, mas foram observadas bandas para as amostras armazenadas na forma de micélio pelo mesmo período, mas cujo extrato foi feito no dia da aplicação no gel ou um dia antes (Figura 1B). Isto mostrou que é melhor o armazenamento na forma de micélio que na forma de extrato protéico.

Uma banda de aáesterase foi observada em extratos de proteína feitos no dia ou cinco dias antes e mantidos congelados, enquanto uma banda de -esterase foi visualizada apenas quando a extração foi feita no mesmo dia. Enquanto o extrato de micélio armazenado congelado por cinco meses mostrou atividade das enzimas superóxido dismutase e enzima málica, não ocorreu atividade de esterase.

Conclusões

O fungo *Amphobotrys ricini* cresce bem em meio líquido BD e em extrato de ervilhas.

As enzimas superóxido dismutase, esterase e enzima málica podem ser facilmente reveladas e podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos.

A conservação de micélio por meio de congelamento de micélio a -20 °C por período de pelo menos dois meses é suficiente para posterior extração de superóxido dismutase, mas não para enzima málica ou esterase.

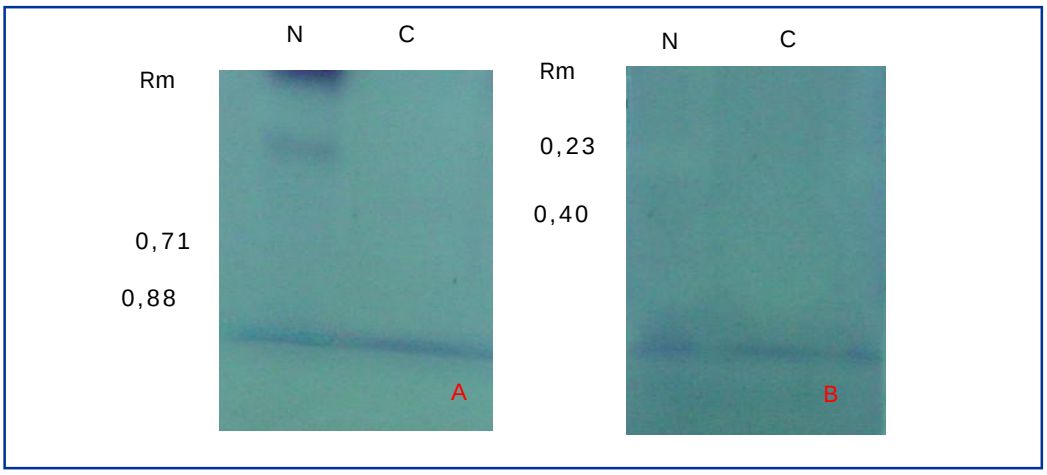

Fig. 1. A) Gel revelado para visualização de enzima málica. B) Gel revelado para visualização de superóxido dismutase. N) extrato proteico feito imediatamente antes da aplicação do gel a partir de micélio mantido congelado por 40 dias. C) Extrato protéico feito 40 dias antes da aplicação no gel e mantido congelado. Rm = mobilidade relativa.

Referências Bibliográficas

ALFENAS, A.C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.

FORNAZIERE JÚNIOR, A. Pragas e doenças: um problema pouco grave. In: FORNAZIERE JÚNIOR, A. Mamona: uma rica fonte de óleo e de divisas. São Paulo: Ícone. p. 35-36. 1986.

GODFREY, G.H. Gray mold of castor bean. Journal of Agriculture Research, v.13, p. 679-715, 1923.

GONÇALVES, R.D. O Mofo cinzento da mamoneira. O Biológico, v. 11, p. 232-235, 1936.

HENNEBERT, G.L. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. Persoonia, v.7, p. 183-204, 1973.

HOLCOMB, G.E.; JONES, J.P.; WELLS D.W.. Blight of Prostrate Spurge and Cultivated Poinsettia Caused by *Amphobotrys ricini*. Plant Disease, v. 73, p. 74-75, 1989.

KIMATI, H. Doenças da mamoneira. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres,1980. p. 497-500.

LIMA E.F., SOARES J.J. Resistência de cultivares de mamoneira ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini*. Fitopatologia Brasileira, v. 15, p. 96-7,1990.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D.M.W. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco – Imprensa Universitária, 1997 106 p.

SANTOS, R.F.; BARROS, M.A.L.; MARQUES, F.M.; FIRMINO, P.T.; REQUIÃO, L.E G.. Análise econômica. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 17-35, 2001

WHETZEL, H.H. A synopsis of the genera and Species of the Sclerotinaceae, a family of stronatic inoperculate Discomycetes. Micologia, v. 37, p. 648-714, 1945.

WHITNEY, N.G.; TABER, R.A. 1st Report of *Amphobotrys ricini* infecting *Caperonia palustris* in the United-States. Plant Disease, v 70, p. 892,1986.

Comunicado Técnico, 184

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 315 4300 Fax (83) 315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500

FOME ZERO Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento BRASIL UM PAÍS DE TODOS GOVERNO FEDERAL

Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária Executiva: Nivia M.S. Gomes
Membros: Demóstenes M.P. de Azevedo
José Welington dos Santos
Lúcia Helena A. Araujo
Márcia Barreto de Medeiros
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de M. Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho