

***Microcyclus ulei* NA BAHIA: BASE PARA ESTUDO POPULACIONAL ***

Eliane Leal Candeias¹, Edna Dora Martins Newman Luz², Givaldo Rocha Niella², José Jefferson Costa Miranda³, Cristiane Duarte dos Santos¹

¹UESC, Universidade Estadual de Santa Cruz, km 16, Rod. Ilhéus-Itabuna, 45650-000, Ilhéus, Bahia, Brasil. agrcandeias@hotmail.com; ²CEPLAC/CEPEC, Caixa Postal 07, 45.600-970, Itabuna, Bahia, Brasil. ednadora@ceplac.gov.br, gniella@ceplac.gov.br; ³FTC, Praça José Bastos, 55, Centro, 45600-081, Itabuna, Bahia, Brasil. jeffersonbask@gmail.com

*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia

O fungo *Microcyclus ulei* é o agente causal do mal-das-folhas, principal doença da seringueira, constituindo-se em um fator limitante à expansão da cultura no Brasil e ainda uma ameaça constante a outros países produtores de borracha. O controle genético é uma ferramenta importante no manejo integrado desta doença e para isso torna-se necessário a construção de uma micoteca do patógeno. Portanto, o objetivo do trabalho foi estabelecer uma coleção de isolados do patógeno, coletados em diferentes locais e regiões produtoras de seringueira, no Estado da Bahia, para estudos de variabilidade genética, morfológica e patológica, determinação de raças fisiológicas e seleção de clones para resistência a doença. Assim sendo, folíolos jovens infectados foram coletados em cinco sub-polos (SP) heveícolas deste Estado, correspondendo aos seguintes municípios: SP1 - Ituberá e Igrapiúna; SP2 - Porto Seguro, Guaratinga e Eunápolis; SP3 - Itamarajú; SP4 - Uruçuca e SP5 - Una. As amostras foram oriundas de cinco fazendas de cada sub-polo, sendo georeferenciadas 30 plantas por fazenda. No Laboratório de Micologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) realizou-se o isolamento das amostras, transferindo-se conídios presentes nas lesões em folíolos, diretamente para placas de Petri com o meio MC8. Processaram-se 515 amostras resultando na obtenção de 132 isolados: 14 no SP1, 52 no SP2, cinco no SP3, 45 no SP4, 16 no SP5. Melhor aproveitamento das amostras registrou-se no SP2 (64,2%) e SP4 (49,5%), demonstrando que o sucesso nos isolamentos depende da qualidade dos folíolos (jovens e com lesões novas) e da rapidez com que as amostras são processadas. Menores números de isolados foram obtidos em amostras processadas com mais de 48 h de coleta em função, principalmente, das contaminações. O patógeno está amplamente disseminado nos subpolos avaliados, porém em Ituberá encontrou-se o maior percentual de plantas infectadas e em Una o menor. Obteve-se uma coleção representativa da diversidade do pólo heveícola da Bahia.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*, mal-das-folhas, micoteca, biogeografia

***Microcyclus ulei* in Bahia: basis for a populatinal study.** *Microcyclus ulei* is the causal agent of South American leaf blight the main disease problem of rubber tree in plantations of Bahia. The present research aimed to collect and isolate *M. ulei* from rubber plantations of South Bahia in order to obtain a culture collection that represents the pathogen population of that region as a subsidy for further studies of genetic, morphologic and pathologic variation, determination of physiological races and selection of clones for disease resistance. The rubber tree growing pole of South Bahia was divided in five sub-poles (SP) comprising the following municipalities: SP1 - Ituberá and Igrapiúna; SP2 - Porto Seguro, Guaratinga and Eunápolis; SP3 - Itamarajú; SP4 - Uruçuca and SP5 - Una. From each SP five farms were sampled and young leaflets infected by *M. ulei* were collected from 30 georeferenced plants per farm. The isolations were done at the mycology laboratory of CEPEC transferring conidia from the leaf lesions directly to Petri dishes containing MC8 culture medium. From 515 processed samples 132 isolates were obtained: 14 from SP1, 52 from SP2, 5 from SP3, 45 from SP4 and 16 from SP5. Better success on isolation were obtained from samples of SP2 (64.2%) and SP4 (49.5%) in which young leaflets with new lesions were collected and processed within 24 h. Smaller numbers of isolates were obtained from samples processed over 48 h of collection due mainly from contamination with other fungi. The pathogen is widespread in Bahia rubber tree plantations and the highest percentage of infected plants was observed in Ituberá and lowest in Una. A culture collection was obtained with isolates representing the pathogen diversity in the region.

Key words: *Hevea brasiliensis*, South American leaf blight, mycological collection, biogeography

Introdução

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D.R.) Muell. Arg.] planta nativa da Amazônia, foi introduzida na Bahia, no ano 1908, como uma estratégia de escape à doença mal-das-folhas, que havia devastado os plantios comerciais do Norte do Brasil (Rocha, 1972). Atualmente, a cultura se encontra distribuída em vários municípios baianos que constituem mais um polo heveícola no Brasil, sendo responsável por 14,2% da produção nacional de borracha natural (IBGE, 2011). Os plantios comerciais inicialmente formados no Sul da Bahia foram em monocultura, os mais recentes vêm sendo implantados utilizando a seringueira, como árvore de sombra permanente, em sistemas agroflorestais (SAFs) com o cacauzeiro e, ou, com outros cultivos alimentares, entre outras vantagens por diminuir a necessidade de se empregar defensivos químicos, proporcionando maior estabilidade econômica aos produtores (Marques et al., 2012).

Existem outras doenças que estão presente nas plantações de seringueira, mas nenhuma delas limita a expansão da heveicultura na Bahia tanto quanto o mal-das-folhas, causado pelo Ascomycota *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. É fácil entender a importância econômica desta doença, ao rever a história do cultivo da seringueira verificando os fracassos nas inúmeras tentativas de implantação da heveicultura em vários países das Américas do Sul e Central, como: Brasil, Suriname e República Cooperativa da Guiana, Trinidad, Panamá e Costa Rica (Gasparotto et al., 1997). Na Bahia, o entusiasmo inicial dos produtores foi desestimulado com o aparecimento dessa doença, que, somente no município de Una, dado a severidade do patógeno, tornou improdutivo cerca de 8.000 dos 15.000 hectares implantados com seringueira (Rocha, 1972). Ainda segundo este autor, a situação não foi tão diferente nos demais municípios do Sul da Bahia, principalmente devido à elevada suscetibilidade dos clones à época plantados e às condições climáticas muito favoráveis ao desenvolvimento e disseminação da enfermidade (Rocha, 1972).

A severidade do *M. ulei* nesses seringais foi tamanha que promoveu perdas acentuadas em produtividade e produção de borracha, contribuindo para a redução da participação da produção baiana de borracha no mercado nacional de 29 % para pouco

mais de 10% (SUDHEVEA, Anuário Estatístico 1978). Com isso, a Bahia, que ocupava o primeiro lugar na produção nacional, nos anos 1980, perdeu a hegemonia para o Estado de São Paulo e, atualmente, segundo dados do IBGE (2011), ocupa o segundo lugar na produção nacional de borracha natural com a participação de 14,2%.

Segundo Mattos et al. (2003), o Sul da Bahia possui condições favoráveis ao desenvolvimento do ciclo do patógeno durante todo o ano e, Honorato Junior (2010), relata que este fato contribui para um aumento na exposição dos folíolos jovens ao *M. ulei* por um período maior porque as plantas localizadas nas baixadas e nas encostas estão mais vulneráveis à infecção do fungo. Comumente a seringueira apresenta apenas um fluxo de reenfolhamento ao ano (Gonçalves e Marques, 2008; Furtado, 1990). Porém, nas condições do Sul da Bahia, devido à alta severidade da doença, pode ocorrer um segundo reenfolhamento, causando alteração da fenologia da cultura (Honorato Junior, 2010).

Em estudos sobre o zoneamento agroclimático para a heveicultura, Cecílio et al. (2006) determinaram uma classificação (Classes de A a G), desde as áreas aptas às inaptas ao plantio comercial da seringueira, considerando as condições climáticas e os riscos da ocorrência do mal-das-folhas. A Classe A, considerada área apta a heveicultura, apresenta condições térmicas e hídricas satisfatórias, estando praticamente livre do mal-das-folhas. Possui evapotranspiração real anual (ETR) superior a 900 mm, déficit hídrico anual (Da) entre 0 e 200 mm, precipitação total anual (Pa) entre 1400 e 1600 mm e excedente hídrico anual (Ea) inferior a 200 mm. Ainda segundo esses autores, no sentido Norte-Sul há duas grandes áreas plenamente aptas à heveicultura, com probabilidade de ocorrência do mal-das-folhas praticamente nula. A primeira, localizada mais ao norte da Bahia, e estendendo-se na direção leste, desde o município de Coração de Maria até o litoral e na direção norte até a divisa com o Estado de Sergipe, e a segunda localizada mais ao Sul da Bahia, indo desde o município de Ibirapitanga até atingir o litoral nas proximidades de Porto Seguro. Outras duas pequenas áreas também dessa mesma classe estão presentes nos municípios de Teolândia e de Alcobaça.

Pensando nas possibilidades de expansão da heveicultura na Bahia, principalmente com o enfoque em SAFs, que têm boa adequação para a vocação agrícola da região Sul do Estado, objetivou-se com esta pesquisa coletar folhas infectadas para isolamento de *M. ulei* e formação de uma coleção de isolados representativos do polo heveícola da Bahia para subsidiar futuros estudos sobre a sua variabilidade genética, morfológica e patológica reforçando o programa de melhoramento genético da seringueira na Bahia.

Material e Métodos

Coletas

As coletas foram realizadas no polo heveícola da Região Sul da Bahia que para facilitar o desenvolvimento do trabalho foi dividido em cinco sub-polos formados, por um ou mais municípios localizados próximos, onde há plantios de seringueira, sendo: SP1 - Ituberá/Igrapiúna, SP2 - Porto Seguro/Guaratinga/Eunápolis, SP3 - Itamarajú, SP4 - Uruçuca e SP5 - Una (Figura1). Cinco fazendas em cada município

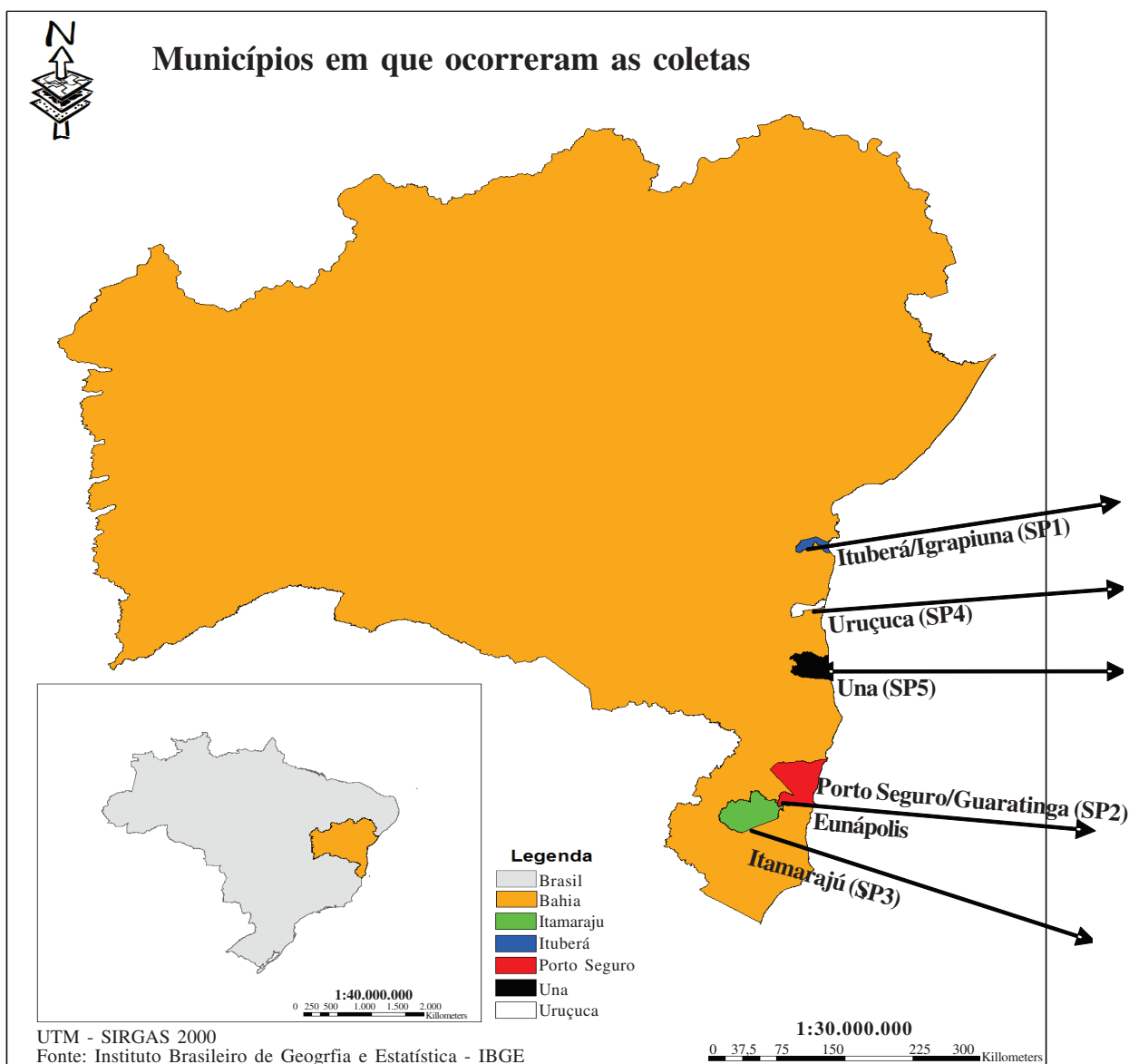


Figura 1 - Localização dos sub-polos heveícolas do Estado da Bahia, onde foram coletados folíolos de seringueira infectados por *M. ulei*.

foram visitadas durante os meses de fevereiro a setembro de 2011 e coletadas 30 amostras de folíolos infectados por fazenda, ou seja, 150 por sub-polo, aleatoriamente dentro do plantio utilizando o método de caminhada em “W” e levando em consideração apenas as plantas que apresentavam sintomas em folhas jovens, aproximadamente no mesmo estágio de desenvolvimento. As amostras compostas (folíolos de vários ramos) por planta foram coletadas com o uso do podão. Todos os pontos de coleta foram georefenciados e as coordenadas geográficas por planta amostrada estão na Tabela 2. As amostras assim obtidas foram colocadas em sacos de papel, identificadas, armazenadas em caixa de isopor e transportadas para o laboratório de micologia do CEPEC para isolamento de *M. ulei*.

Obtenção dos isolados

O isolamento foi realizado transferindo-se conídios presentes nas lesões em folíolos jovens, diretamente

para placas de Petri com o meio MC8 [água 20g, sacarose 10g, batata 250g, cloranfenicol 0,15 g, KH_2PO_4 2g, treonina 0,25mg (1 μL de solução estoque), triptofano 0,25g (1 μL de solução estoque) e cloridrato de lisina 10mg (1 μL de solução estoque) e água para completar 1L], com o pH ajustado para $5 \pm 0,2$, conforme metodologia descrita por Junqueira et al. (1984).

Para todas as amostras foram utilizadas três placas com meio de cultura, cada uma delas com três pontos de transferência. Em seguida as placas foram incubadas à temperatura de 24°C em luz constante (Figura 2).

Após o crescimento, fragmentos de $0,3 \pm 0,1\text{cm}$ das bordas das colônias puras foram transferidos para tubos de ensaio com MC8 em quatro replicas por isolado, sendo levemente pressionados sobre uma perfuração feita no centro do meio para garantir a sua fixação. As placas foram mantidas em câmaras de germinação do tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) a temperatura de 24°C no escuro (Figura 3).



Figura 2 - Isolamento de *M. ulei*: **A** - folíolo jovem com lesões conidiais; **B** - captura de conídios em uma lesão no folíolo; **C** - transferência de conídios para placa de Petri contendo o meio MC8; **D** - colônias após 12 dias de incubação.

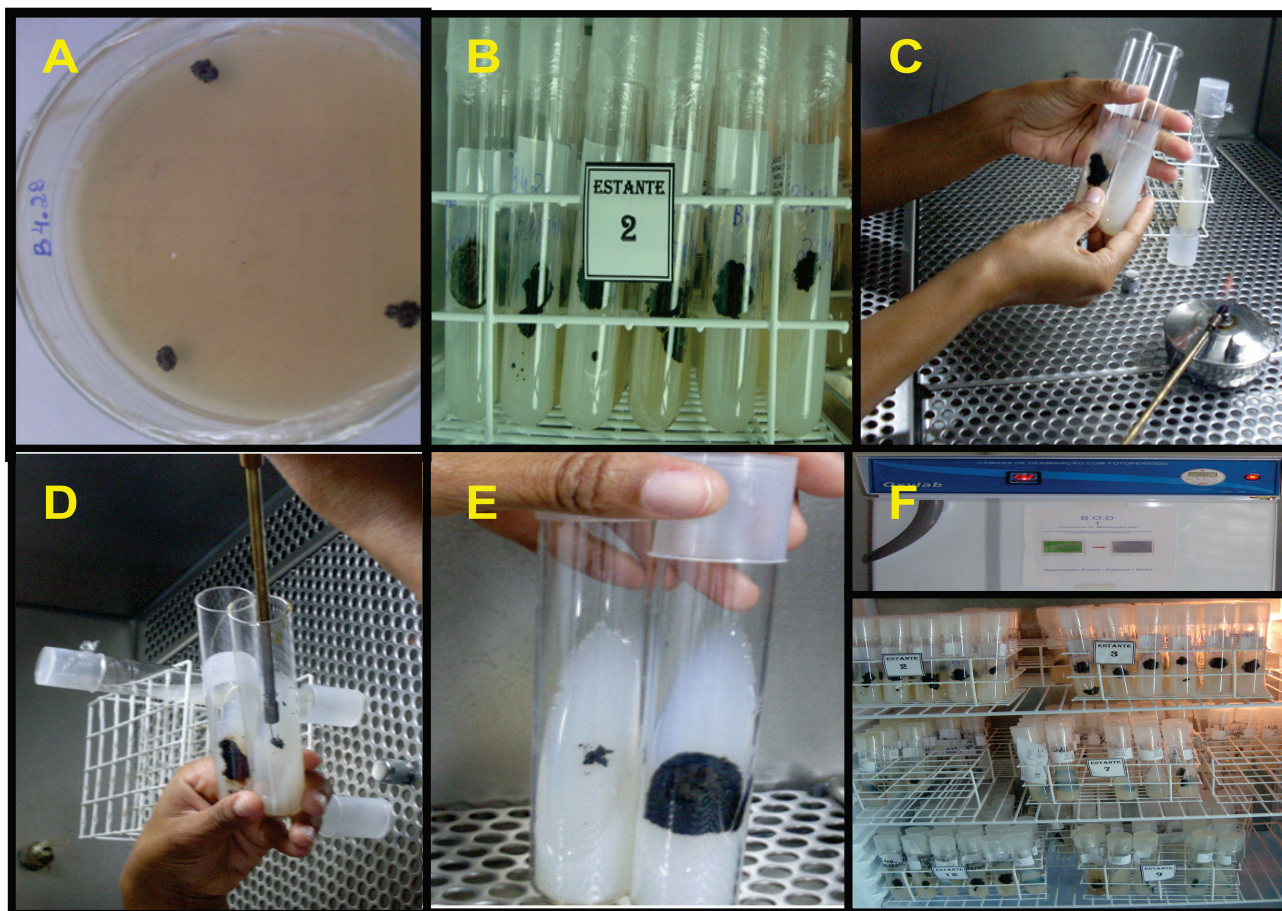


Figura 3 - Culturas de *M. ulei*: **A-B** colônias do fungo em placa e em tubo de ensaio; **C-D** replicagem para multiplicação do isolado; **E**-colônia original e replicada; **F**- armazenamento

Para identificação dos isolados utilizaram-se códigos compostos de letras e números que indicam o local de plantio e a fazenda de onde foram isolados, assim, todos os isolados com a mesma letra e número foram obtidos do mesmo plantio, a exemplo dos isolados B4.24B e B4.1B, onde o número subsequente refere-se ao número da árvore que foi georeferenciada e de onde as amostras de folíolos infectados foram coletadas.

Resultado

Durante as coletas observou-se que o patógeno está disseminado nos sub-polos visitados, não sendo difícil encontrar plantas infectadas em todos eles. De 25 fazendas visitadas apenas em uma, conjunto Santa Rita, localizada no município de Itamarajú, não foram

encontradas árvores com sintomas do mal-das-folhas. Era um seringal ainda não produtivo, com aproximadamente três anos de idade.

O estágio de desenvolvimento da infecção nas plantas variou muito de local para local, o que impossibilitou as coletas em algumas fazendas no município de Eunápolis, pois as folhas já estavam no estágio de lixa. Nas amostras em que os folíolos não estavam no estágio inicial de infecção, fase conidial do patógeno, o procedimento de isolamento de *M. ulei* não obteve sucesso devido, principalmente, a contaminações.

As colônias do patógeno começaram a ficar visíveis no meio de cultura entre oito e 20 dias do isolamento e quando estabelecidas eram transferidas para tubos de ensaio com MC8 para evitar o ressecamento do meio nas placas e também contaminações. Após 20 dias,

quando não se notou crescimento nos pontos onde os conídios foram aderidos ao meio de cultura, as placas eram descartadas.

Foram processadas 515 amostras procedentes dos diferentes locais de coleta que resultaram na obtenção de 132 isolados sendo: 14 no SP1 (Ituberá e Igrapiúna), 52 no SP2 (Porto Seguro, Guaratinga e Eunápolis), cinco no SP3 (Itamarajú), 45 no SP4 (Uruçuca) e 16 no SP5 (Una) (Tabela 1). O melhor aproveitamento das amostras registrou-se no SP2 (64,2%) e no SP4 (49,5%), demonstrando que o sucesso nos isolamentos depende

da qualidade dos folíolos (jovens e com lesões novas) e da rapidez com que as amostras foram processadas. Para estes sub-polos o tempo entre a coleta e o processamento das amostras ficou entre 24 e 48 horas. Enquanto para os demais excedeu às 48 horas.

Menores números de isolados foram obtidos em amostras processadas com mais de 48 h de coleta em função das contaminações, pois embora acondicionados em sacos de papel e mantidos em caixas de isopor, os folíolos liberavam umidade nos sacos possibilitando a formação de ambiente propício ao desenvolvimento

de micélio de outros fungos presentes nas folhas ou de esporos que estavam no ar nos locais de coleta. Sugere-se que se faça o isolamento “*in loco*” nas próximas coletas em locais distantes.

Quanto à ocorrência da doença, foi possível notar que o maior percentual de plantas com sintomas visuais de *M. ulei* foi observado no município de Ituberá, enquanto que em Una, este percentual foi duas vezes menor. Atribui-se ao fato de que na região de Ituberá há uma maior variabilidade genética envolvida nos clones utilizados na formação dos plantios e isto muito provavelmente favoreceu uma maior adaptação ou o desenvolvimento de “raças fisiológicas” altamente virulentas (Junqueira et al., 1988).

Cento e trinta e duas culturas puras de *M. ulei* (Tabela 2) foram depositadas na micoteca do Cepec, representando, em parte, a diversidade da população do patógeno presente no pólo heveícola da Bahia.

Discussão

A formação de uma coleção contendo isolados de locais os mais diversificados possíveis dentro de uma região é um importante passo para a realização de estudos sobre a diversidade de qualquer patógeno. No caso específico da presente pesquisa se buscou obter isolados de *M. ulei*, importante patógeno da seringueira, visando viabilizar estudos futuros.

Tabela 1 - Sub-polo, municípios, fazendas e números de amostras e isolados de *M. ulei*

Sub-polo	Município	Fazendas	Total de amostra	Total isolado
SP1	Ituberá	Pinha	29	0
		Primavera	14	8
		Lagoa Santa	26	1
		Canta Galo	30	0
		Morro Alto	29	5
Sub-total			128	14
SP2	Porto Seguro	Lucikátia	11	0
	Guaratinga	Nova Aurora	12	0
	Porto Seguro	Nascente	11	7
	Eunápolis	Bubalina	30	45
	Eunápolis	Batalha	17	0
Sub-total			81	52
SP3	Itamarajú	Estância e Prata	30	3
		Conjunto Amizade	26	2
		13 Pontos	11	0
		Conjunto Santa Rita	1	0
		Reserva Santa Helena	30	0
Sub-total			98	5
SP4	Uruçuca	Sempre Viva	22	9
		Dois de Ouro	30	13
		Reunidas Mucambo	4	6
		21 de Junho	14	7
		Divisão	21	10
Sub-total			91	45
SP5	Una	Bolandeira	12	2
		Estação Experimental (CEPLAC)	30	2
		Gislânia/Esmeralda	15	9
		Piruna	30	2
		Colônia Japonesa	30	1
Sub-total			117	16
Total			515	132

Tabela 2 - Isolado, sub-polo, município, clone, número e coordenadas geográficas das plantas de onde foram coletados os isolados de *M. ulei*

Isolado	Sup-polo	Município	Clone	Nº da planta	S/W*
1	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.13	13°41.87' 39°09.50'
2	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.14	13°41.86' 39°09.47'
3	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.14	13°41.86' 39°09.47'
4	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.5	13°41.85' 39°09.55'
5	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.5	13°41.85' 39°09.55'
6	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.5	13°41.85' 39°09.55'
7	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.6	13°41.85' 39°09.54'
8	SP1	Ituberá	Desconhecido	2.6	13°41.85' 39°09.54'
9	SP1	Ituberá	Desconhecido	3.17	13°40.93' 30°10.49'
10	SP1	Ituberá	IAN 717	5.11	13°45.75' 39°16.37'
11	SP1	Ituberá	IAN 717	5.2	13°45.83' 39°16.33'
12	SP1	Ituberá	IAN 717	5.2	13°45.83' 39°16.33'
13	SP1	Ituberá	IAN 717	5.7	13°45.78' 39°16.35'
14	SP1	Ituberá	IAN 717	5.7	13°45.78' 39°16.35'
15	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.10	16°23.33' 39°30.13'
16	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.13	16°23.36' 39°30.14'
17	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.13	16°23.36' 39°30.14'
18	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.16	16°23.50' 39°30.15'
19	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.17	16°23.42' 39°30.13'
20	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.18	16°23.43' 39°30.12'
21	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.19	16°23.42' 39°30.09'
22	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.1	16°23.38' 39°30.01'
23	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.1	16°23.38' 39°30.01'
24	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.22	16°23.41' 39°30.07'
25	SP2	Eunápolis	Fx 986	4.24	17°23.41' 39°30.08'
26	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.24	16°23.41' 39°30.06'
27	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.24	16°23.41' 39° 30.06
28	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.25	16°23.39' 39° 30.08
29	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.25	16°23.39' 39°30.08'
30	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.25	16°23.39' 39°30.08'
31	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.26	16°23.38' 39°30.09'
32	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.27	16°23.39' 39°30.10'
33	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.28	16°23.38' 39°30.10'
34	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.28	16°23.38' 39°30.10'
35	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.28	16°23.38' 39°30.10'
36	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.28	16°23.38' 39°30.10'
37	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
38	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
39	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
40	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
41	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.29	16°23.37' 39°30.09'
42	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.2	16°23.40' 39°29.98'
43	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.2	16°23.40' 39°29.98'
44	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.30	16°23.37' 39°30.10'
45	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.30	16°23.37' 39°30.10'
46	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32' 39°30.09'
47	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.4	16°23.38' 39°30.02'

Continuação Tabela 2

Isolado	Sup-polo	Município	Clone	Nº da planta	S/W*	
48	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.4	16°23.38'	39°30.02'
49	SP2	Eunápolis	RIMM 600	4.4	16°23.38'	39°30.02'
50	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.5	16°23.33'	39°30.08'
51	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.5	16°23.33'	39°30.08'
52	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.5	16°23.33'	39°30.08'
53	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.8	16°23.34'	39°30.10'
54	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.8	16°23.34'	39°30.10'
55	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
56	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
57	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
58	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
59	SP2	Eunápolis	Fx 985	4.9	16°23.32'	39°30.09'
60	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.11	16°23.87'	39°04.66'
61	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.11	16°23.87'	39°04.66'
62	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.2	16°22.82'	39°04.81'
63	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.5	16°22.82'	39°04.83'
64	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.5	16°22.82'	39°04.83'
65	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.6	16°22.82'	39°04.82'
66	SP2	Porto Seguro	Desconhecido	3.7	16°22.82'	39°04.83'
67	SP3	Itamarajú	Desconhecido	1.20	16°57.06'	39°33.62'
68	SP3	Itamarajú	CDC 312	1.2	16°57.08'	39°33.64'
69	SP3	Itamarajú	CDC 312	1.2	16°57.08'	39°33.64'
70	SP3	Itamarajú	Desconhecido	2.18	17°00.69'	56°48.35'
71	SP3	Itamarajú	Pé franco	2.2	17°00.72'	40°48.69'
72	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2	14°26.61'	39°18.78'
73	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2	14°26.61'	39°18.78'
74	SP4	Uruçuca	Desconhecido	3	14°26.63'	39°18.80'
75	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5	14°26.64'	39°18.81'
76	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5	14°26.64'	39°18.81'
77	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5	14°26.64'	39°18.81'
78	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.14	14°31.05'	39°12.37'
79	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.14	14°31.05'	39°12.37'
80	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.16	14°31.05'	39°12.36'
81	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.2	14°31.06'	39°12.32'
82	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.2	14°31.06'	39°12.32'
83	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.2	14°31.06'	39°12.32'
84	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.3	14°31.15'	39°12.41'
85	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.3	14°31.15'	39°12.41'
86	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.5	14°31.01'	39°12.34'
87	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.15	14°32.29'	39°18.65'
88	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.15	14°32.29'	39°18.65'
89	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.16	14°32.31'	39°18.65'
90	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.18	14°32.32'	39°18.64'
91	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.18	14°32.32'	39°18.64'
92	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.20	14°32.31'	39°18.61'
93	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.22	14°32.31'	39°18.61'
94	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.22	14°32.31'	39°18.61'
95	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.23	14°32.30'	39°18.62'

Continuação Tabela 2

Isolado	Sup-polo	Município	Clone	Nº da planta	S/W*	
96	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.23	14°32.30'	39°18.62'
97	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.23	14°32.30'	39°18.62'
98	SP4	Uruçuca	Desconhecido	2.30	14°32.26'	39°18.60'
99	SP4	Uruçuca	Desconhecido	1.16	14°31.05'	39°12.36'
100	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.11	14°28.11'	39°17.08'
101	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.13	14°28.11'	39°17.09'
102	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.13	14°28.11'	39°17.09'
103	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.1	14°27.97'	39°17.01'
104	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.1	14°27.97'	39°17.01'
105	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.5	14°27.95'	39°16.98'
106	SP4	Uruçuca	Desconhecido	4.5	14°27.95'	39°16.98'
107	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.10	14°32.17'	39°23.54'
108	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.11	14°32.16'	39°23.55'
109	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.12	14°32.16'	39°23.55'
110	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.15	14°32.13'	39°23.57'
111	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.16	14°32.13'	39°23.57'
112	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.16	14°32.13'	39°23.57'
113	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.2	14°32.58'	39°23.32'
114	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.3	14°32.58'	39°23.33'
115	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.3	14°32.58'	39°23.33'
116	SP4	Uruçuca	Desconhecido	5.5	14°32.59'	39°23.35'
117	SP5	Una	Desconhecido	1.26	15°17.52'	39°03.17'
118	SP5	Una	Desconhecido	1.29	15°17.52'	39°03.15'
119	SP5	Una	Desconhecido	3.13	15°17.45'	39°04.54'
120	SP5	Una	Desconhecido	3.3	15°17.46'	39°04.49'
121	SP5	Una	Desconhecido	5.27	15°15.59'	39°10.54'
122	SP5	Una	Pé franco	6.3	15°17.79'	39°04.68'
123	SP5	Una	Pé franco	6.3	15°17.79'	39°04.68'
124	SP5	Una	FDR 5788	7.3	15°17.53'	39°03.17'
125	SP5	Una	FDR 5788	7.4	15°17.52'	39°03.16'
126	SP5	Una	FDR 5788	7.4	15°17.52'	39°03.16'
127	SP5	Una	FDR 5788	7.4	15°17.52'	39°03.16'
128	SP5	Una	FDR 5788	7.4	15°17.52'	39°03.16'
129	SP5	Una	Pé franco	7.8	15°17.33'	39°03.09'
130	SP5	Una	Pé franco	7.8	15°17.33'	39°03.09'
131	SP5	Una	Pé franco	7.8	15°17.33'	39°03.09'
132	SP5	Una	CDC 312	7.1	15°17.57'	39°03.26'

*S/W =Sul/Oeste.

Como a expressão dos sintomas do mal-das-folhas depende diretamente da idade dos folíolos e da suscetibilidade clonal, além do patógeno apresentar diferentes fases em seu ciclo de vida (Gasparotto et al.,1997), é necessário que, para realizar isolamento com sucesso, se tenha o cuidado de escolher no campo as folhas em estado adequado, tendo em vista os esporos que se pretende isolar. Em folíolos jovens, pós-

caducifolismo, que foram infectados por ascósporos, inóculo primário para infecção nos seringais (Holliday, 1970), formam-se lesões levemente escurecidas de formato circular angular, que causam enrugamento no limbo. Geralmente nessas lesões é possível observar uma massa de conídios (*Fusicladium macrosporum* J. Kuijper), verde-oliva ou cinza-escuro, com aspecto feltroso, muito fácil de diferenciar da fase de lixa,

comumente encontrada em folíolos maduros que apresentam aspecto áspero devido aos estromas, onde se formam primeiro a fase espermogonial e, depois, a fase pseudotecial, com ascos e ascósporos (Holliday, 1970). Portanto, a utilização da fase conidial para isolamento do patógeno, que consiste na transferência de conídios para meio de cultura em placa de Petri (isolamento direto), é essencial para a obtenção de maior número de isolados. O isolamento a partir de ascósporos é possível, porém, mais trabalhoso e demorado.

Gasparotto et al. (1997), já afirmavam que o isolamento de *M. ulei* deve ser feito com folíolos jovens, recém coletados, com lesões bem esporuladas e secas que estejam isentas de água de chuva, orvalho ou umidade proveniente de câmara úmida. Junqueira et al. (1984) atestam que para obter maior porcentagem de germinação de conídios é recomendável que se faça a inoculação e, ou, isolamento em meio de cultura o mais rápido possível.

No presente trabalho foi notado que quanto mais rápido foi o processamento das amostras maior foi o sucesso na obtenção dos isolados, tendo ocorrido mais contaminações nas amostras provenientes dos sub-polos mais distantes da sede ou que demoraram mais de 48 horas para serem processadas. Por este motivo, recomenda-se que, na impossibilidade de processar rapidamente as amostras em laboratório, que o isolamento seja tentado ainda no campo. Para tanto, improvisando as condições assépticas e transportando binocular estereoscópica e placas com meio de cultura para o próprio local da coleta.

O atraso no isolamento das amostras também pode causar perda na viabilidade dos conídios, embora, Holliday (1970), assegure que a habilidade de germinação dos conídios não decresça mais que 50% após dois ou três dias, desde que os conídios secos não sejam expostos diretamente à luz, mesmo que de baixa intensidade. O autor afirma também que sob condição experimental, após 10 dias de deposição em uma lâmina de vidro, no escuro e sob temperatura moderada, acima de 25% dos conídios germinaram. Em um outro estudo, Chee (1976) relatou que a formação de conídios em clones suscetíveis ocorre cinco a nove dias após a infecção.

Neste estudo, as amostras coletadas permaneceram no escuro durante todo o período de

transporte, porém estiveram expostas à luz durante o processo de seleção dos melhores folíolos e lesões para isolamento. Chee (1976) afirma que os conídios de *M. ulei* mantiveram-se viáveis por mais tempo quando as folhas com lesões foram mantidas em um dessecador. Esta precaução pode ser também adotada quando for necessário manter as folhas no laboratório até se ter certeza que a tentativa de isolamento resultou em sucesso, o que pode demorar em torno de 15 dias, conforme observado neste trabalho.

Atribuem-se às contaminações com outros fungos como a principal causa do baixo número de isolados obtidos (Tabela 1). É sabido que o *M. ulei* cresce muito vagarosamente em meio de cultura, independentemente do tipo de meio e das variações de pH, temperatura e regime de luz, conforme salientado por Holliday (1970); Chee (1978); Lieberei et al. (1983) e Junqueira et al. (1984).

É importante mencionar que dentre os municípios prospectados, apenas em Itamarajú não foi constatado plantas com sintomas do mal-das-folhas, pois o seringal em fase inicial de crescimento, com aproximadamente três anos de idade, não tinha adquirido o hábito de troca foliar, portanto não haviam folíolos jovens. Como se sabe, as seringueiras somente a partir do quarto ou quinto ano de idade passam a renovar as folhas a cada ano, ou seja, a apresentarem o fenômeno de caducifolismo (Gonçalves e Marques, 2008; Gasparotto et al., 1997). Portanto, este fato explica a ausência de folíolos jovens em quantidade suficiente para infecção, por conídios ou ascósporos provenientes de plantios adjacentes, uma vez que não existiam pseudotécios nas folhas de seringueira caídas ao solo até então.

A coleção constituída pelos 132 isolados resultantes destas coletas e mais 41 disponibilizados por Plantações Michelin da Bahia, representa um importante acervo para estudos com *M. ulei* no Sul da Bahia, pois, ela contém parte da diversidade da população deste fungo existente nas diferentes regiões produtoras de borracha da Bahia. Futuros estudos para detecção de raças fisiológicas visando resistência à doença, além de estudos epidemiológicos e fisiológicos, com este peculiar patógeno serão beneficiados pela existência dessa coleção de isolados de *M. ulei*.

conclusões

Obteve-se uma micoteca representativa da diversidade do polo heveícola da Bahia para a continuidade da pesquisa.

O patógeno está amplamente disseminado nos sub-polos avaliados, porém em Ituberá encontrou-se o maior percentual de plantas infectadas e em Una o menor.

Agradecimentos

Ao professor José Luiz Bezerra, pela ajuda da caracterização morfológica do patógeno e sugestões durante todo decorrer do trabalho; ao técnico Euvaldo Moura, pela valiosa ajuda nas coletas; aos pesquisadores Karina Peres Gramacho, Adonias de Castro Virgens Filho e José Raimundo Bonadie Marques, pelo estímulo na execução dos trabalhos; a CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas ao primeiro e segundo autores, respectivamente; a UESC pela oportunidade do mestrado em Produção Vegetal e a CEPLAC/CEPEC por disponibilizar o Laboratório de Diversidade de Fungo para a realização de todo o trabalho.

Literatura Citada

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO. 1978. Anuário estatístico do Brasil, nº 23. Rio de Janeiro, RJ, SUDHEVEA. 58p.
- CECÍLIO, R. A. et al. 2006. Zoneamento agroclimático para a heveicultura na parte leste do Estado da Bahia. *Bahia Agrícola (Brasil)* 7(2):14-17.
- CHEE, K. H. 1976. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: spore dispersal of *Microcyclus ulei*. *Annals of Applied Biology* 84:147-152.
- CHEE, K. H. 1978. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: culture of *Microcyclus ulei*. *Transactions of the British mycological Society* 70(3):341-344.
- FURTADO, E. L. 1990. Comportamento decíduo da seringueira (*Hevea spp.*) e quantificação do mal-das-folhas causado por *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. Tese de Mestrado. Piracicaba, SP, USP/ESALQ.
- GONÇALVES, P. de S.; MARQUES, J. R. B. 2008. Melhoramento Genético da Seringueira - Passado, Presente e Perspectivas de Futuro. In: Alvarenga, A. de P.; Carmo, C. A. F. de S. do, eds. *Seringueira*. Viçosa, MG, EPAMIG. pp. 399-498.
- GASPAROTTO, L. et al. 1997. Doenças da seringueira no Brasil. Brasília, DF, EMBRAPA.
- HOLLIDAY, P. 1970. South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. *Phytopathological Papers* 12. Farnham Royal. CAB 1-31.
- HONORATO JUNIOR, J. 2010. Mal-das-folhas da seringueira: dinâmica de inóculo do patógeno, progresso e danos, em três condições topográficas. Dissertação Mestrado. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>. Acesso em 06 de dezembro.
- JUNQUEIRA, N. T. V. et al. 1984. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. *Revista Ceres (Brasil)* 1(177):322-331.
- JUNQUEIRA, N. T. V. et al. 1988. Reação de clones de seringueira a vários isolados de *Microcyclus ulei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 23(8): 877-893.
- LIEBEREI, R. et al. 1983. Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures. *Journal Rubber Research Institute Malaysia* 31:227-236.
- MARQUES, J. R. B. et al. 2012. O cultivo do cacauzeiro em sistemas agroflorestais com a seringueira. In: Valle, R. R. *Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacauzeiro*. 2 ed. Itabuna, BA, Gráfica e Editora Vital Ltda. pp.337-465.

- MATTOS, C. R. R. et al. 2003. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 28:502-507.
- ROCHA, H. M. 1972. Problema de enfermidades nos seringais da Bahia. In: *Seminário Nacional da Seringueira*. Cuiabá, Mato Grosso.

