

***Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff & Maubl. (Sphaeropsidales,  
Sphaeroidaceae) associada à espécie florestal *Scleronema micranthum*  
((Ducke) Ducke, Bombacaceae) (Cardeiro) da Amazônia**

Carvalho R S<sup>1</sup>, Nascimento CC<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Tecnologia e Inovação COTI- E-mail: rosana@inpa.gov.br.

### Resumo

Realizou-se este trabalho da prevalência de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff & Maubl., manchador de madeira, associado a espécie florestal da Amazônia *Scleronema micranthum* (Ducke) Ducke durante 12 meses. Foram utilizadas cinco árvores e dos fustes foram cortados 30 discos de 30 cm. Os mesmos foram distribuídos, aleatoriamente, sobre o solo da floresta da Estação Experimental de Silvicultura Tropical-ZF-2, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA. Neste ambiente, os discos ficaram expostos a biodeterioração e a cada dois meses procedia-se a remoção de cinco discos do solo e todos foram transportados para o Laboratório de Patologia da Madeira COTI/INPA. Para o isolamento *L. theobromae* foram utilizados fragmentos retirados do alburno dos discos, foi feito a assepsia dos fragmentos, sendo que três foram colocados sobre o meio de cultura extrato de malte-agar. As placas de Petri foram e mantidos em incubadora a 27 °C. As colônias desenvolvidas durante o período de incubação foram observadas e o isolado puro foi preservado em tubo de ensaio em baixa temperatura. A identificação foi feita por meio de observações macroscópicas da colônia e microscópica das estruturas vegetativas e reprodutivas. Em todas as coletas, com exceção da segunda, a prevalência de *L. theobromae* associado a *S. micranthum* foi confirmada. A maior prevalência foi observada na primeira, quarta e sexta coleta, todas com cinco isolados.

**Palavras-Chave:** Madeira, *S. micranthum*, fungos manchadores, *Lasiodiplodia theobromae*

### Introdução

A espécie florestal da Amazônia *Scleronema micranthum* (Ducke) Ducke, conhecida como Cardeiro, pertence à família Bombacaceae. É uma árvore de porte médio a grande é comumente encontrado no Estado do Amazonas principalmente nos arredores de Manaus e no Baixo Rio Negro (Loureiro *et al.*, 1979; Loureiro e Silva 1968). A sua madeira apresenta fácil trabalhabilidade, tendo potencial na confecção de móveis, tabuados, laminados, faqueados decorativos, compensados e na construção civil e naval (Freitas *et al.*, 1992). Em

ensaios acelerados de laboratório, o Cardeiro foi considerado resistente aos fungos apodrecedores *Pycnoporus sanguineus* (Linnaeus : Fr.) Murril e *Polyporus fumosus* Pers : Fr. (Paes *et al.*, 2007) e, moderadamente resistente, a *Lenzites trabea* (Pers.: Fr.) (INPA/CPPF 1991). As toras de *S. micranthum* foram cortadas e os discos foram deixados na floresta, e após 12 meses não foi encontrado ataque de fungos no cerne, e o albarno demonstrou ser pouco resistente (INPA/CPPF 1991). Sabe-se que a madeira dessa essência florestal representa o principal produto florestal, considerado um material orgânico complexo e sua composição anatômica e química que pode nutrir espécies de fungos e outros microrganismos (Dix e Webster 1995).

Os primeiros fungos que colonizam as árvores recém-abatidas são os manchadores de madeira e emboloradores, devido a grande quantidade de substâncias de reserva e a elevada umidade. Alguns fungos manchadores podem em estágio avançado de ataque provocar podridão mole (Cavalcante 1982). De acordo com Oliveira (2005) e Silva (2004), *L. theobromae* é um dos principais fungos relatados causando manchas em madeira nas regiões tropicais e subtropicais.

Na Amazônia Brasileira, há registro de *L. theobromae* ocorrendo em 12 doze espécies florestais oriundas de quatro indústrias madeireiras de Manaus-Amazonas (Hanada *et al.*, (2003). Na Amazônia Peruana, Segura (1970) relata o ataque de *L. theobromae*, causando mancha azul em amostras de 27 espécies de madeira.

Diante do exposto, o estudo teve como objetivo isolar e avaliar a prevalência do fungo manchador *L. theobromae* de amostras da madeira de *S. micranthum*, expostas ao ambiente florestal por doze meses.

## **Material e Métodos**

### *Local do Experimento*

O experimento de campo foi realizado na área da Estação Experimental de Silvicultura Tropical-ZF-2, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, localizado no km 60 da BR 174 (Manaus- Boa Vista). Segundo RADAM (1978) e Bastos *et*

al., (1986) a área em estudo apresenta o terreno suavemente ondulado, o clima de acordo com a classificação de Koppen, é do tipo Am. A temperatura média anual do mês mais frio é sempre acima de 18 °C. A umidade relativa é muito alta e a média anual varia de 84% a 90%. A precipitação pluviométrica é maior nos meses de dezembro a maio e a média anual é de 2097 mm. A vegetação da área é influenciada pela Bacia do rio Negro, por possuir florestas heterogêneas, a altura das árvores varia de 30 a 40 metros.

Neste trabalho foram utilizadas cinco árvores de *S. micranthum*, de cada árvore foram seccionados, aleatoriamente, seis discos (amostras) de 30 cm de comprimento, totalizando 30 discos. Os discos foram identificados com placas de alumínio e posteriormente expostos, no solo da floresta, equidistante a 50 cm, à biodeterioração por um período de 12 meses conforme pode ser visualizado (Figura 1).



Figura 1. Local da disposição dos discos no solo da floresta.

#### *Isolamento e identificação dos fungos*

Durante o período de exposição dos discos na floresta, a cada dois meses, seis discos foram removidos aleatoriamente, os quais foram transportados para o Laboratório de Patologia COTI/INPA. De cada disco foram retirados fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mm<sup>2</sup>, estes foram submetidos à assepsia, sendo imersos durante um minuto em hipoclorito de sódio a 5 % , álcool 70 % e lavados com água destilada estéril duas vezes. Em seguida foram colocados em papel de filtro estéril para retirar o excesso de água (Dhingra e Sinclair 1995). Posteriormente, seis fragmentos foram transferidos de forma equidistante em duas placas de Petri, sendo três em cada placa contendo meio de cultura extrato de malte-agar com antibiótico cloranfenicol. Em seguida, as placas foram colocadas

em incubadora a 27 °C, no escuro até a obtenção da colônia de *L. theobromae*. Às culturas puras foram armazenadas na Coleção de Culturas de Microorganismos de Interesse Agroflorestral do INPA.

Para confirmação da identificação taxonômica, foi feita observações macroscópicas da colônia como o crescimento, aspecto micelial, coloração e forma. Para tanto foram retirados discos de micélio de 5 mm de diâmetro e transferidos para o centro das placas de Petri, contendo meio de cultura. Para cada isolado foi preparadas três placas de Petri (repetições). Em seguida, as placas foram mantidas em incubadoras a 27 °C sob foto período de 12 h ou até a formação de picnídios e picnidiosporos, as placas foram observadas, diariamente sob microscópio estereoscópico (Lupa). A partir da formação das estruturas reprodutivas foram preparadas lâminas semipermanentes coradas com lactofenol ou azul de algodão e observadas sob microscópio de luz (óptico).

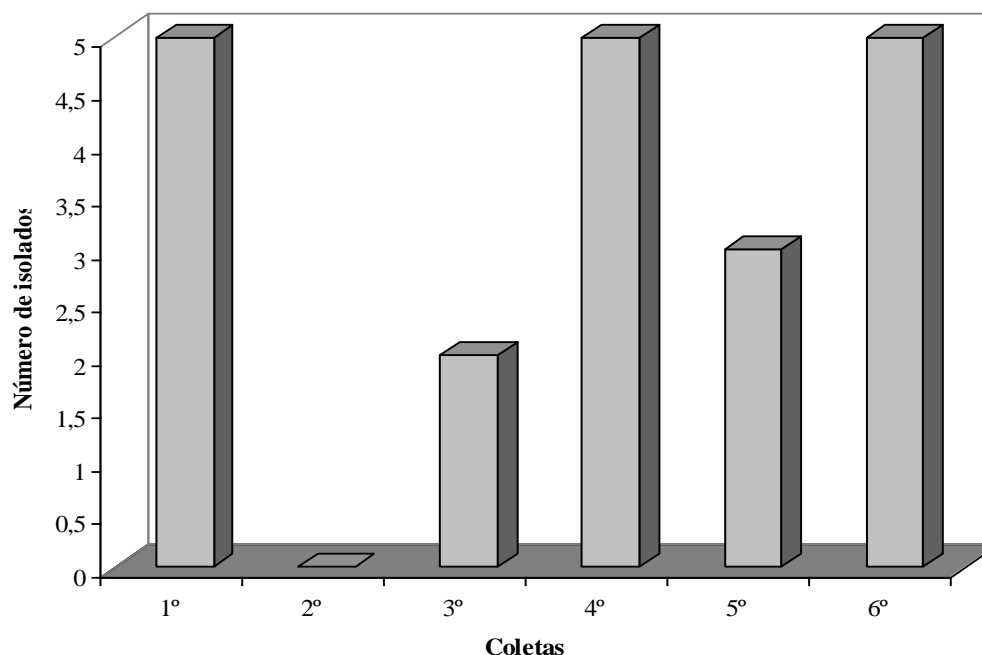
Os picnídios formado, foram colocados sobre a lâmina contendo corante. A estrutura foi partida com um bisturi e uma lamínula foi colocada sobre a mesma. Em seguida, os picnídios foram esmagados, cuidadosamente, fazendo uma pressão leve sobre a lamínula. com o cabo do estilete. Desta forma, tanto os picnídios e picnidiosporos foram possíveis de serem visualizados e medidos. As descrições das colônias e das estruturas reprodutivas e vegetativas do fungo foram comparadas com as descritas em literaturas especializadas: Barnett e Hunter (1998); Sutton (1980) e Dugan (2006).

## **Resultados e Discussão**

Foram obtidos 20 isolados de *L. theobromae* de 30 discos de *S micranthum*, referente ao somatório de seis coletas por cada árvore. Este fungo foi isolado desde a primeira coleta com exceção a segunda. A prevalência foi registrada na primeira, quarta e sexta coleta com cinco isolados em cada uma destas (Figura 2).

O fato de ter encontrado maior número de isolados na primeira, quarta e sexta coleta, pode estar relacionado ao próprio ambiente onde os discos ficaram expostos na floresta, sob sol, chuva e a sombra da floresta, que ofereceram condições climáticas propícias ao desenvolvimento dos mesmos. Segundo Sales-Campos *et al.*, (2000), a temperatura e a

umidade elevada da região Amazônica, favorecem a incidência de fungos. Este fungo além de ocorrer em madeira pode ser encontrado no solo e plantas (Mohali e Encinas, 2001; Santos *et al.*, 2001; Mesquita *et al.*, 2006; Segura,1970).



**Figura 2.** Número de isolados de *L. theobromae* obtidos em toras de *S. micranthum* expostas em ambiente florestal em doze meses.

#### Identificação da espécie *L. theobromae*

As colônias de *L. theobromae* apresentaram crescimento rápido, com 10 dias o micélio havia tomado toda a superfície do meio de cultura das placas, formado por micélio aéreo aveludado a cottonoso de coloração inicialmente branca e conforme o envelhecimento cinza a preto. O reverso da colônia apresentou coloração preto escura. Não foram observados quaisquer tipos de pigmentação, setores ou zonação. Houve produção de picnídios após 25 dias de incubação a 27 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Também, há gotículas de exsudatos transparentes sobre os picnídios. Os picnídios são escuros, globosos e ostiolados. Células conidiogênicas holoblásticas, cilíndricas, hialinas e lisas. Os picnidiósporos ou conídios na fase imatura foram inicialmente hialinos, globosos, crespados (granuloso), enquanto que, na fase madura apresentaram coloração marrom claro a escuro, elipsoidais a ovóides, 21-29 µm x 7-17 µm e tornaram-se bicelular, com septo

transversal. Estas características são semelhantes a descritas por Sutton (1980) e Barnett e Hunter (1998).

Conforme análise dos dados da frequência da ocorrência de *L. theobromae* nos discos foi observado logo na primeira coleta, pois o fungo ataca a árvore assim que é derrubada, podendo prolongar o ataque durante a secagem do tronco, e inclusive, penetrar nos tecidos da madeira corroborando com as observações feitas por Scheffer (1973); Oliveira *et al.*, (1986); Mesquita *et al.*, (2006). Ainda de acordo com estes autores, este fungo utiliza como fonte de nutrientes, o amido e açúcares presentes no lúmen das células de reservas das madeiras, mas pode eventualmente se nutrir de outros constituintes ao adentrar a parede celular na fase avançada de ataque. Por se utilizar materiais de reservas da madeira, em geral, este fungo restringe seu ataque ao alburno, ficando o cerne praticamente intacto. Todos os isolados de *L. theobromae* foram obtidos a partir de amostras que apresentavam coloração azul (blue stain). Segundo Scheffer (1973); Cavalcante (1982); Oliveira *et al.*, (1986), fungos que causam manchas na região do alburno da madeira, geralmente apresentam hifas pigmentadas, características de *L. theobromae*, ou secretam substâncias coloridas produzidas por eles. Os autores afirmam, ainda, que estes fungos podem causar manchas profundas na região do alburno, restringir o seu uso e conseqüentemente comprometendo com o valor comercial da madeira.

Neste contexto, as manchas de *L. theobromae* em madeiras tem sido objeto de estudos por partes de vários pesquisadores em diversas regiões. Na África, *L. theobromae* tem sido relatado como o principal causador de mancha azul de madeiras úmidas (Fougerousse 1958); no Peru, o fungo foi isolado em mais de 27 espécies florestais cujas amostras apresentavam mancha azul (Segura 1970) e na Venezuela o fungo tem causado sérios danos nas espécies *Pinus caribea* var. *hondurensis*, *Ceiba pentandra*, *Acacia mangium*, *Eucalyptus urophylla* (Mohali e Encinas 2001, Mohali *et. al.*, 2007). Na Amazônia Brasileira, *L. theobromae* ocorre em várias espécies florestais da região amazônica. No estado do Amazonas, estudos de Mendonça e Jesus (1999) relatam que dos 269 fungos da Coleção de Cultura de Micro organismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, *L. theobromae*, foi isolado de sete espécies florestais, oriundas de quatro indústrias madeireiras *Ceiba pentandra* (L.) Gaerth, *Carapa guianensis* Aubl., *Erisma calcaratum*

(Link) Warm., *Hevea brasiliensis* Müll. Arg., *Hura creptans* L., *Schefflera morototoni* (Aubl.) Lecne & Planch, *Virola sirinamensis* (Rol.) Warb. e em Manaus o *L. theobromae* ocorreu em 12 doze espécies florestais oriundas de quatro indústrias madeireiras (Hanada *et al.*, 2003). Estes foram os primeiros estudos que abordaram a colonização *L. theobromae* associado à espécie florestal ao longo do ano em condições naturais de floresta.

Além de *L. theobromae* ser um fungo sapróbio é considerado o principal responsável por manchas e bolores em madeira das regiões tropicais e subtropicais e pode colonizar em serrapilheira, sobre plantas, associado a insetos dentre outros segundo Grandi (1998), e Mohali *et al.*, (2005), cita que é um patógeno comum, difundido de árvores lenhosas tropicais, causando ferrugem em broto e doenças em árvores e arbustos e mancha azul em madeira. Também, o fungo ocorre em culturas da gravioleira, ateira, sapotizeiro e cajueiro e outras. Pereira *et al.*, (2006); Viana *et al.*, (2003) relatam que *L. theobromae* é considerado um patógeno fraco, mas nos últimos anos, é responsável por doenças em inúmeras fruteiras tropicais, onde se incluem as famílias Anacardiaceae e Anonaceae, causando perdas significativas de produção, notadamente no nordeste brasileiro.

A ocorrência desse fungo em diversos ambientes e hospedeiros comprova a eficiente capacidade de adaptação e o grau de evolução conforme a sua exigência fisiológica. Por outro lado, o fungo apresenta características morfológicas e genéticas semelhantes entre os isolados obtidos de diferentes substratos. Medeiros-Galvão (2008), estudando diversos isolados de *L. theobromae*, de diferentes hospedeiros e substratos, inclusive obtidos de madeira, por meios de caracterização moleculares, não observou diferenças entre eles. Também neste trabalho não foram observadas diferenças morfológicas significativas entre os isolados, confirmando, desta forma, que o fungo em estudo se trata da mesma espécie, apesar das diferentes procedências de isolamentos, hospedeiros e substratos.

### **Conclusão**

O fungo *L. theobromae* foi isolado do alburno de *S. micranthum* exposto em ambiente florestal, sendo que na primeira, quarta e sexta coleta, obteve-se maior número de isolados da madeira.

## Referências

Barnett HL, Hunter BB (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>th</sup>ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 218p.

Bastos TX, Rocha EJP, Rolim PAM, Diniz TDAS, Santo ECR, Nobre RAA; Cutrim RMS, Mendon'car LD. (1986). Climate of Brazilian Amazon region for a agricultural purpose a state-of-the-art.1 In.: Proceeding of the 1º Symposium of the Humid Tropics held in Belém, Pará. Vol. 1. Climate and Soil. EMBRAPA-CPATU. Documento 36: 19-36.

Cavalcante MS (1982). Deterioração Biológica e Preservação de Madeiras. IPT. Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo. Divisão de Madeiras, Pesquisas e Desenvolvimento. São Paulo. 41.

Dhingra OD Sinclair JB (1995). Basic plant pathology methods. 2. ed. Boca Raton.: CRC Press, 434.

Dix NJ, Webster J (1995). Fungal Ecology. Chapman & Hall. London. 549.

Dugan FM. (2006) The identification of fungi. An illustrated Introduction with keys, Glossary, and Guide to Literature. The American Phytopathological Society. Minnesota. U.S.A. 175.

Fourgerousse M (1958). Les alteration fungiques dès bois frais em Afrique Tropicale et plus particulièrement de l'llomba et du limba. Bois et Forest te Tropiques, 60: 41-56.

Freitas JÁ, Vasconcelos JF, Silva NB, Loureiro AA (1992). Madeiras da Amazônia que apresentam raios largos. Acta Amazônica 22 (1): 61-91.

Grandi RAP (1998). Taxonomia de Deuteromicetos. In: Bononi, V.L.R., Coord. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos “Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnologica”. Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 184.

Hanada RE, Sales-Campos C, Abreu RLS, Pfenning L (2003). Fungos emboloradores e manchadores de madeira em toras estocadas em indústrias madeireiras do município de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 33 (3): 483-488.

INPA/CPPF (1991). *Catálogo de Madeiras da Amazônia: Características Tecnológicas. Área da Hidrelétrica de Balbina*. Manaus, Amazonas. 163.

Loureiro AA, Silva MF, Alencar JC. (1979). *Essências madeireiras da Amazônia v. 2*. CNPq/INPA/ SUFRAMA. Manaus. 230p.

Loureiro AA, Silva MF (1968). *Catálogo das Madeiras da Amazônia*. SUDAM. Belém, 1: 125-131.

Medeiros-Galvão RS (2008). Diversidade de linhagens de *Botryosphaeria rhodina* produtoras de jasmonatos, Manaus, Brasil 198p. (Tese de Doutorado Universidade Federal do Amazonas – UFAM).

Mendonça ACA, Jesus MA (1999). Ocorrência de fungos manchadores e de bolor em madeiras Amazônicas. V Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas-Forest 99. Centro de Convenções de Curitiba. Curitiba- Paraná- Brasil.

Mesquita JB, Lima JT, Trugilho PF (2006). Micobiota associada à madeira serrada de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden durante a secagem ao ar livre. *Ciência Florestal*, Santa Maria 16 (1): 45-50.

Mohali S, Encinas O. (2001) .Association of *Diplodiamuticola* with blue stain of Caribbean Pine in Venezuela. *For.Path* 31: 187-189.

Mohali S, Encinas O (2001). Association of *Diplodia muticola* with blue stain of Caribbean Pine in Venezuela. *For.Path* 31: 187-189.

Mohali S, Burgess TI, Wingfield MJ (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodiatheobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35: 385–96.

Mohali SR, Slippers B, Wingfield MJ, Michael J (2007). Identification of Botryosphaeriaceae from Eucalyptus, Acacia and Pinus in Venezuela. *Fungal Diversity* 25: 103-125.

Oliveira AMF, Leis AT, Oliveira ES, Lopes GAC, Oliveira LCS, Canedo MD, Milano S (1986). Agentes destruidores da Madeira. In: Oliveira, E.S. (Ed). Manual de Preservação de Madeiras. IPT, São Paulo, 1. 99-278.

Oliveira ML, Luz, EDMN (2005). Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. Ilhéus. CEPLC/CEPEC/SEFIT. 132.

Paes JB, Melo RR, Lima CR (2007). Resistência natural de sete madeiras a fungos e cupins xilófagos em condições de Laboratório. *Cerne*, Lavras. 13(2): 160-169.

Pereira AL, Silva, GS, Ribeiro VQ (2006). Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. São Luiz–Maranhão. *Fitopatologia Brasileira* 31(6): 572-578.

Punithalingam, E (1976). *Botryodiplodia theobromae*. C.M.I. – Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N. 519.

RADAM (1978). Programa de Integração Nacional. Levantamento de Recursos Naturais. V-18 (Manaus)–RADAM (projeto) DNPM, Ministério de Minas e Energia. 620.

Sales-Campos C, Abreu RLS, Vvianez BF (2000). Indústrias Madeireiras de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica* 30(2): 319-331.

Santos FEM, Sobrosa RC, Costa IFD, Corder MPM (2001). Detecção de Fungos Patogênicos em Sementes de Acácia-Negra (*Acácia mearnsii* De Wild). *Ciência Florestal*, Santa Maria 11(1): 13-20.

Scheffer TC (1973). Microbiological degradation and the causal organism. In: Nicholas, D.D. (Ed.) Wood deterioration and its prevention by preservative treatments. Syracuse University Press, Syracuse 11. 31-106.

Segura CB (1970). Mancha azul de algumas madeiras tropicales Peruanas. *Revista Florestal del Peru* 4(1-2): 25-30.

Silva SC, Silva MFGF; Filho ER, Souza A, Muller MW (2004). Identificação de fungos isolados de *Khayaivoresnis*(Meliaceae). XXVI Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecológica Micromoleculares. Instituto de Química. Universidade Federal Fluminense.

Sutton, BC (1980). *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata*. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 696p.

Viana FMP, Freire FCO, Cardoso JE, Vidal JC (2003). Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle. Fortaleza-CE. Embrapa Agroindústria Tropical. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico, 86) 11p.