

## DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE INÓCULO MÍNIMO INFECTIVO DE *Fusarium oxysporum* EM “SEEDLINGS” DE PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum*, L.)

PESSÔA, Diogenes do Nascimento<sup>(1)</sup> & DUARTE, Maria de Lourdes Reis<sup>(2)</sup>.

### INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*, L.), é uma Piperaceae, trepadora, semi-perene e semi-lenhosa, originária das florestas de Malabar, Índia. Relatos históricos indicam a presença desta cultura no Brasil, desde o século XVII, trazida através dos colonizadores portugueses. Passou a se estabelecer como cultura para fins comerciais por volta da década de 30, quando foram introduzidas estacas de Cingapura pelo imigrante japonês Makinosuke Ussuí, no Município de Tomé-Açu, iniciando a partir daí os grandes plantios de pimenta-do-reino, no Brasil. Os genótipos mais cultivados são: Cingapura que ocupa cerca de 80% dos plantios; Guajarina (15%); Bragantina, Iaçará-1, Kottanadan-1, Apra e Guajarina INATAN (5%) (Duarte, Albuquerque & Poltronieri, 2001).

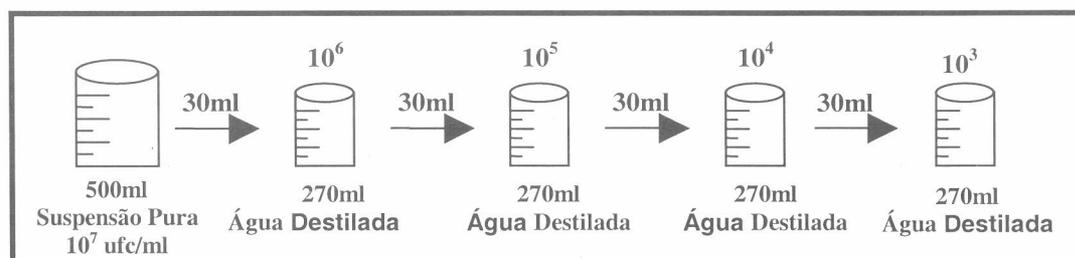
Nas condições de cultivo a pleno sol, a planta é afetada por varias doenças causadas por algas (*Cephaleuros virences*), vírus (Mosaico do pepino – CMV-Pn), nematóides (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*) e fungos (*Colletotrichum gloeosporioides*), que embora causem danos, são consideradas de importância secundária quando comparadas a podridão das raízes e secamento dos ramos causadas por *Nectria haematococca* Berk & Br. f. sp. *piperis* Albuquerque. (Duarte & Albuquerque, 1997). No entanto, a partir de 1992, vem sendo observada plantas com sintomas de murcha e morte rápida, em experimentos instalados na Embrapa Amazônia Oriental em Tomé-Açu, onde estava sendo testado o genótipo Guajarina. Posteriormente a doença surgiu em outros municípios como: Santa Isabel, Capitão Poço, Mocaçuba, Bujarú, Tailândia, Santarém Novo, Baião, São Francisco do Pará e Castanhal. O fungo penetra na planta através das raízes, favorecido ou não por ferimentos causados por nematóides (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*) ou de outra natureza (Duarte et. al., 1999). No processo de colonização invade o sistema vascular causando o escurecimento e impedindo tanto a absorção como a circulação de água e nutrientes. A planta afetada exibe amarelecimento, queda gradual de folhas e de internódio e ausência de brotações novas (Duarte & Albuquerque, 1999).

Esta pesquisa teve por objetivo determinar o potencial de inóculo mínimo infectivo, em “seedlings” de pimenta-do-reino em casa-de-vegetação.

### MATERIAL E MÉTODOS

Culturas puras de *Fusarium oxysporum* isoladas de pimenteiros infectados, coletadas no município de Tomé-Açu - foram repicadas para placas de Petri contendo BDA (batata, 200 g; dextrose, 20 g; agar, 20 g; água, 1000 ml) e incubadas em ambiente de laboratório por aproximadamente cinco dias. Cerca de 1000ml de meio de cultura BS (batata, 200g; sucrose, 15g; água, 1000ml) foram subdivididos em alíquotas de 50 ml. As alíquotas foram distribuídas em erlenmeyers de 250ml, e esterilizadas em autoclave (121°C, 1,5 atm. por 20 minutos). Um disco de micélio de aproximadamente 5mm de diâmetro foi transferido para erlenmeyer, em seguida foram levadas para agitar por seis dias em um “shaker”, sob luz difusa (25°C, agitação leve e constante). Após a agitação, os erlenmeyers contendo as suspensões puras de *Fusarium oxysporum* foram filtradas com gaze obtendo-se 500 ml de suspensão. A suspensão foi diluída de modo a se obter concentrações finais de  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  ufc/ml (Unidades Formadoras de Colônias). O esquema do método de diluição é apresentado na Fig. 1.

Figura 1. Preparo das suspensões de esporos de *Fusarium oxysporum* em 4 concentrações.



As raízes de 180 “seedlings” de pimenta-do-reino, cultivar Guajarina, com aproximadamente 7 meses de desenvolvimento, foram inoculadas por imersão, durante 10 minutos nas diferentes suspensões de esporos (30 seedlings/suspensão). Antes da inoculação, as mudas retiradas dos pré-enraizadores (contendo casca de arroz carbonizada e areia esterilizada), tiveram as raízes lavadas em água de torneira e em seguida, algumas pontas foram cortadas. Após a inoculação, as mudas foram

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC/CNPq/EMBRAPA - Acadêmico do 6º Semestre do Curso de Engenharia Agrônoma - FCAP

<sup>2</sup> Fitopatologista, Ph. D, Embrapa Amazônia Oriental. Tv. Dr. Enéas Pinheiro s/n. CEP: 66095-100

novamente transplantadas, para vasos (5 seedlings/vaso) contendo solo enriquecido com calcário, fertilizante químico e matéria orgânica, mantidas em telado com cobertura de vidro e irrigadas por aspersão, diariamente.

A avaliação foi baseada no reconhecimento visual dos sintomas e na recuperação do patógeno de tecidos das plantas inoculadas nas diferentes concentrações de esporos, aos 62 dias após a inoculação.

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com, seis tratamentos (água, suspensão  $10^7$  suspensão à  $10^6$ , suspensão à  $10^5$ , suspensão à  $10^4$  e suspensão à  $10^3$  ufc/ml), seis repetições, conduzidos em laboratório e casa de vegetação. Os dados foram registrados e analisados pela estatística de Kruskal-Wallis (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, modificado para dados não paramétricos, em nível de 5% de significância (ZAR, 1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 62 dias, os seedlings foram avaliadas considerando-se os sintomas visuais de murchamento, e invasão vascular. A fim de detectar a extensão da invasão vascular, foi feita a recuperação do patógeno (*Fusarium oxysporum*) através de isolamentos de tecidos do caule, em placas de Petri com agar-água e repicagem em tubos de ensaios com meio de cultura BDA (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de seedlings de pimenta-do-reino infectados após imersão das raízes em suspensão de esporos de *Fusarium oxysporum*, em diferentes concentrações.

$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	Testemunha
2	1	2	0	0	0
0	2	1	0	0	0
1	0	0	0	0	0
3	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0
1	1	0	0	0	0

A análise mostrou diferenças significativas entre as concentrações de inóculo testadas. A infecção dos seedlings, confirmada através do isolamento dos tecidos vasculares, foi mais intensa quando as plantas foram inoculadas com suspensões de esporos mais concentradas (Tabela 2)

**Tabela 2.** Resposta de seedlings de pimenta-do-reino à inoculação de suspensões de esporos de *Fusarium oxysporum* em diferentes concentrações (Média de 6 repetições)

Suspensão	Média dos ranks	Contrastes
$10^7$ ufc/ml	28,166	a
$10^6$ ufc/ml	22,833	a
$10^5$ ufc/ml	22,833	a
$10^4$ ufc/ml	14,083	b
$10^3$ ufc/ml	11,500	b
Testemunha	11,500	b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade ( $p=0,05$ )

Nos contrastes (Tabela 2) observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos:  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  quando comparados com os tratamentos:  $10^4$ ,  $10^3$  e o tratamento Testemunha ( $p=0,05$ ), .

Os resultados obtidos mostram que o patógeno foi capaz de induzir sintomas mesmo em baixas concentrações como  $10^4$  ufc/ml. Nos testes realizados por Duarte et al. (1999) os autores obtiveram respostas inoculando mudas de pimenta-do-reino com suspensão de esporos na concentração de  $3,7 \times 10^5$ . Embora não tenha sido observado visualmente necrose vascular, o fungo penetrou nos tecidos da haste das plantas, evidenciado através de isolamentos do patógeno a partir de tecidos de hastes aparentemente saudáveis. Isto indica que a ausência de necrose vascular não significa que não ocorreu a colonização dos tecidos. Em testes de inoculação que visem selecionar plantas resistentes, o registro da extensão da invasão vascular deve ser acompanhado de isolamento dos tecidos aparentemente saudáveis.

## CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

- *Fusarium oxysporum* é capaz de infectar raízes de plantas de pimenta-do-reino, cultivar Guajarina, em concentrações tão baixas quanto  $10^4$  ufc/ml.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUARTE, M. L. R. & ALBUQUERQUE, F. C. **Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) Controle de Doenças.** In: VALLE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (eds.) **Controle de doenças de plantas.** Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 2v. pp. 879-924.
- DUARTE, M. L. R., ALBUQUERQUE, F. C., HAMADA, M., COSTA, A. P.,. Murcha causada por *Fusarium oxysporum*, uma nova doença da pimenta-do-reino no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, n. 2, p. 178-181, 1999.
- DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. & POLTRONIERI, L. S. **Podridão do pé da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.).** In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K & BEZERRA, J. L. (eds.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil.** Itabuna, Bahia: CEPLAC, Centro de pesquisa do cacau. Livraria Editora Rural, 2001. pp. 560-589.
- DUARTE, M. L. R. & ALBUQUERQUE, F. C. **Doenças da cultura da Pimenta-do-reino.** In: DUARTE, M. L. R. (eds.) **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro, I Plantas Industriais.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. pp. 159-208.
- ZAR, J. *Biostatistical analysis.* 2 nd Ed. New Jersey: Prentice Hall. 1984.