

## Métodos de inoculação de *Phytophthora* spp. em painel de seringueira<sup>1</sup>

José Clério Rezende Pereira<sup>2</sup>, Paulo Emílio Pereira de Albuquerque<sup>2</sup>, Álvaro Figueredo dos Santos<sup>2</sup> Luiz Carlos Cordeiro de Almeida<sup>3</sup> e Rita de Cássia Siqueira Bahia<sup>4</sup>

### Resumo

Vários métodos de inoculação de *Phytophthora* spp. foram testados no painel de sangria da seringueira. Os métodos constaram de incisão longitudinal, com pulverização e injeção de zoósporos, e incisão longitudinal e circular, com deposição de disco de meio de cultura contendo micélio e esporângios. Os resultados indicam que os métodos não influenciaram estatisticamente o tamanho da lesão, mas os de incisão longitudinal propiciaram menores coeficientes de variação. As características biológicas do inóculo não influenciaram os resultados.

*Palavras-chave:* *Hevea* spp. *Phytophthora* spp., painel, inoculação.

## Methods of inoculation of *Phytophthora* spp. on panel of *Hevea* rubber trees

### Abstract

Several methods of inoculation of *Phytophthora* spp. onto the panel of *Hevea* rubber trees were tested. The methods were: spraying and injection of zoospores onto longitudinal incisions in the bark; and placement of agar disks containing mycelia and sporangia onto longitudinal and circular incisions. Results indicate that the methods did not statistically influence lesion size, but longitudinal incisions had lower coefficient of variation values. The biological characteristics of the inoculum did not influence the results.

*Key words:* *Hevea* spp. *Phytophthora* spp., panel, inoculation.

<sup>1</sup> Trabalho realizado com recursos do Convênio CEPLAC/EMBRAPA (EMBRAPA – SUDHEVEA).

<sup>2</sup> Pesquisadores da EMBRAPA – CNPSD. Divisão de Fitopatologia (DIFIP), Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), APT CEPLAC, 45.600, Itabuna, Bahia, Brasil.

<sup>3</sup> Pesquisador da CEPLAC. DIFIP, CEPEC.

<sup>4</sup> Técnica de laboratório da EMBRAPA – CNPSD. DIFIP, CEPEC.

## Introdução

Algumas espécies de *Phytophthora* (*P. capsici*, *P. palmivora* e *P. citrophthora*) infectam o tronco da seringueira, causando cancro-estriado do painel de sangria e/ou cancro-do-tronco (Cardoso et al, 1983; Pereira e Santos, 1984; e Stein et al, 1985. O cancro-estriado assume papel de relevância por impedir a exploração de látex nos meses chuvosos com temperatura baixa (Pereira e Santos, 1984).

Segundo Chee e Wastie (1980), o cancro estriado constitui-se na terceira mais importante doença da seringueira, suplantada apenas pelo mal-das-folhas e pela requeima. Todavia, não se dispõe de um método padronizado, bem como não se relatam ainda os diferentes métodos de inoculação e principalmente a metodologia para quantificar a patogenicidade das diferentes espécies e/ou isoladas de *Phytophthora*.

Medeiros e Bahia (1971) trabalharam com inoculações no tronco e na parte aérea; embora não tivessem descrito o método de inoculação, citaram que a avaliação foi efetuada tendo por base a velocidade de crescimento e com transformação dos dados para logaritmo da lesão média.

Chee (1975) avaliou a patogenicidade de vários isolados de *P. palmivora*, utilizando isolados cultivados em tubos de poliuretano impregnados com meio de cultura V-8 e, na avaliação, utilizou uma escala de notas variando de 0 a 4; onde 0 significa ausência de doença; 1 – poucas depressões; 2 – duas a cinco estrias distintas; 3 – mais de cinco estrias distintas; e 4 – coalescência de várias estrias.

Pereira e Santos (1984) avaliaram a eficiência de fungicidas e a percentagem de recuperação de isolados de *Phytophthora*, utilizando meio seletivo. Atribuíram nota 1 (hum) quando se detectavam propágulos viáveis em amostras coletadas com o auxílio de um vasador, a aproximadamente 25 mm do sítio de infecção e nota 0 (zero) quando não se detectavam propágulos viáveis. O método de inoculação utilizado consistiu de incisão circular, com retirada de um disco de casca, medindo 5 mm, e conseqüente exposição do lenho; e sobreposição de um disco de meio de cultura (cenoura-agar), contendo micélio e esporângios, medindo 4 mm.

Tendo em vista a necessidade de obter um método de inoculação, procurou-se, neste trabalho, avaliar técnicas de inoculação de *Phytophthora* spp. em painel de seringueira.

## Material e Métodos

Os trabalhos foram conduzidos em seringal adulto, na Estação Experimental Djalma Bahia, município de Una, BA, durante o mês de julho de 1985. Neste período, compreendido entre 4 e 19 de julho, ocorreram as seguintes condições meteorológicas: temperatura máxima média de 25,1 °C, temperatura mínima média de 18,4 °C, umidade relativa variando de 86,1 a 94,5% e precipitação pluviométrica de 58,9 mm.

Utilizou-se o clone IAN 6476 (híbrido de *Hevea brasiliensis* x *Hevea pauciflora*). Abriram-se dois painéis por planta. Utilizaram-se seis plantas por tratamentos, considerando-se cada painel como sendo

uma unidade experimental. Trabalhou-se com dois isolados de *Phytophthora*; isolado P 51, identificado como sendo *P. capsici*, e P 158, identificado como sendo *P. palmivora*, ambos pertencentes à micoteca do Divisão de Fitopatologia do CEPEC. O inóculo foi cultivado em meio de cenoura-agar, por um período de 8 dias, a 25 °C e sob luz constante.

Inocularam-se simultaneamente as duas espécies de *Phytophthora* em cada painel. *P. capsici* foi sempre inoculado na porção basal do painel, próximo à canaleta de coleta do látex e *P. palmivora*, na porção superior do painel distando, em média, 20 cm uma inoculação da outra.

Os métodos avaliados consistiram em:

#### **Incisão circular + disco de micélio.**

Foi retirado um disco de casca, com o auxílio de um vasador de 5 mm de diâmetro e conseqüente exposição do lenho. Em seguida, sobrepôs-se a incisão em disco de micélio e esporângios; protegeu-se com uma porção de algodão embebido em água esterilizada.

#### **Incisão longitudinal + disco de micélio.**

Foi efetuado um corte longitudinal, no sentido ápice-base, medindo 15 mm de comprimento por 4 mm de profundidade. Em seguida, procedeu-se a inoculação, utilizando-se disco de meio de cultura (4 mm de diâmetro), contendo micélio e esporângios; protegeu-se com uma porção de algodão embebida em água esterilizada.

**Incisão longitudinal + injeção de zoósporos.** Foi efetuada uma incisão semelhante ao método anterior e introdução de uma agulha até atingir o lenho. Em seguida, procedeu-se a inoculação de 0,5 ml de suspensão contendo  $3,34 \times 10^5$

zoósporos  $\text{ml}^{-1}$ , com o auxílio de uma seringa com capacidade de 5 ml.

**Incisões cruzadas + pulverização de zoósporos.** Foram efetuadas incisões longitudinal e transversal, sobrepostas, medindo, ambas, 15 mm de comprimento por 4 mm de profundidade. A inoculação foi procedida mediante pulverização de 1 ml de suspensão contendo  $3,34 \times 10^5$  zoósporos  $\text{ml}^{-1}$ .

A despeito do que ocorreu no método anterior, neste, também, não foi proporcionada câmara úmida.

Em todos os métodos, as inoculações foram efetuadas ao entardecer, entre 18 e 19 horas.

As avaliações foram efetuadas 15 dias após as inoculações. Anotaram-se o comprimento e largura das lesões, com posterior transformação para área da lesão, corrigida para área da elipse, obtido pelo produto comprimento x largura x  $\pi/4$  ( $C \times L \times \pi/4$ ), conforme Albuquerque, Pereira e Santos (1985). Para se ter os parâmetros comprimento e largura da lesão, procedeu-se a retirada da casca em quantidade suficiente para expor toda a região lesionada. Com o auxílio de um paquímetro, procedeu-se a mensuração, tendo por base as linhas delimitadas por estrias longitudinais no lenho, característica principal do cancro-estriado.

## **Resultados e Discussão**

Os resultados dos diferentes métodos encontram-se no Quadro 1.

Os métodos de inoculação ensaiados apresentam diferentes anatomias em termos de construção. Assim sendo, no método da incisão circular (Met. 1), foi reti-



rada uma porção do córtex e consequente exposição do lenho, ao passo que, nos outros métodos, não houve exposição do lenho. Por outro lado, entre os métodos de incisão longitudinal, houve variação na característica biológica do inóculo, ou seja, utilização de micélio (Met. 2) e zoósporos (Met. 3).

Por outro lado, quando se utilizou o pulverizador, em que pese ter-se estabelecido um sítio inicial de infecção na forma de eixo, o inóculo foi disposto externamente, embora este fato também tivesse propiciado que o patógeno penetrasse em sítios naturais que preexistiam, tendo em vista que a exploração de látex pressupõe exposição do câmbio.

Nos métodos de incisão longitudinal, não importando a característica biológica do inóculo, observou-se que a expansão lateral da lesão foi reduzida, principalmente quando comparado com o método

de incisões cruzadas, no qual se empregou o pulverizador. Provavelmente, neste último método, ocorreu coalescência de várias lesões, resultando em maior crescimento lateral e, conseqüentemente, em maiores áreas.

Entretanto, à exceção do *P. capsici*, o método de inoculação, bem como a fonte de inóculo não influenciaram o tamanho da lesão, porquanto não se detectou diferença estatística entre os diferentes métodos.

Por outro lado, quando se considera a característica variabilidade dentro do conjunto de dados para cada método isoladamente, observa-se que, no método incisão longitudinal, não se considerando a característica biológica da fonte de inóculo, ocorreu menor dispersão entre os dados, porquanto se obteve menores coeficientes de variação.

Embora, em trabalhos de avaliação,

Quadro 1 - Área da lesão (AL)<sup>a</sup> e coeficiente de variação (CV)<sup>b</sup>, causados pelo fungo *Phytophthora* spp. em painel de seringueira, em função de diferentes métodos de inoculação. Una, BA, 1985.

Método de inoculação	<i>P. capsici</i>		<i>P. palmivora</i>	
	AL <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup>	AL <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup>
Incisão circular + micélio	31,18 a	96,00	34,38 a	94,51
Incisão longitudinal + micélio	28,03 a	37,60	32,8 a	29,16
Incisão longitudinal + zoósporos	16,6 a	29,06	67,7 a	21,82
Incisão cruzada + zoósporos	173,9 b	86,90	106,9 a	110,6

<sup>a</sup> Área da lesão obtida pelo produto largura x comprimento x  $\pi/4$ . Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P = 0,05$ ).

<sup>b</sup> Coeficiente de variação obtido por método de inoculação.

não importando a finalidade imediata, quer seja avaliação de produtos químicos quer seja resistência clonal, devam-se considerar característica como densidade e potencial de inóculo, estágio fenológico de máxima susceptibilidade e condições mesológicas favoráveis ao patógeno, pode-se observar que o método de incisão circular (Met. 1) induz maiores injúrias à planta, além de propiciar a penetração de patógenos secundários, tais como *Diplodia* spp., *Colletotrichum* sp., principalmente, o que mascara os resultados.

Apenas para o caso de patógenos celulófilos, que colonizam o cerne da planta, justifica-se a adoção deste método.

Chee (1971) propôs o método de incisão circular e, para avaliação, empregou um sistema que preconizava o número de estrias longitudinais. Entretanto, este método, além de permitir a colonização por patógenos secundários, pode permitir, com o passar do tempo, que ocorra coa-

lescência de estrias, levando, via de regra, os resultados para o grau máximo de veracidade.

Tan (1983) preconizou a utilização de uma escala visual, atribuindo valores percentuais, em função da área lesionada, quando comparada à área do painel, o que não permite a outros pesquisadores utilizarem-na tendo em vista que os valores obtidos serão função do nível de exigência de cada pessoa.

Portanto, tendo por base estes resultados, sugere-se que seja padronizado como método de inoculação de *Phytophthora* spp., em painel de seringueira, o método de incisão longitudinal, tomando-se como fonte de inóculo/disco de micélio (Met. 2) e/ou zoósporos (Met.3). Contudo, deve-se considerar que, ao fazer uso do inóculo na forma de micélio, deve-se utilizar câmara úmida, pelo menos nas primeiras 48 horas após a inoculação.

### Literatura Citada

- ALBUQUERQUE, P. E. P. de, PEREIRA, J. C. R. e SANTOS, A. F. dos. 1985. Parâmetros para valiação da severidade do cancro-estriado da seringueira. *Fitopatologia Brasileira* 11 (3):567 - 573.
- CARDOSO, R. M. G., FLEICHTENBERGER, G. e SILVEIRA, A. P. da. 1983. Cancro estriado do painel da seringueira (*Hevea* spp.) no Planalto Paulista (Resumo). *Fitopatologia Brasileira* 8:578.
- CHEE, K. H. 1971. Chemical control of panel diseases of *Hevea brasiliensis*. In *Crop protection in Malasia*. Kuala Lumpur, s.e. 1971. pp. 213 - 220.
- \_\_\_\_\_. 1975. Pathogenicity of *Phytophthora palmivora* from *Hevea brasiliensis*. *Transactions of the British Mycological Society* 65 (1):153 - 157.
- \_\_\_\_\_. and WASTIE, R. L. 1980. The status and future projects of rubber disease in Tropical America. *Review of Plant Pathology* 59 (13):541 - 547.
- MEDEIROS, A.G. e BAHIA, D. B. 1971. Estudos preliminares das enfermidades que causam a desfolhação da seringueira na Bahia (Brasil). *Polímeros (Brasil)* 1 (2):9 - 18.
- PEREIRA, J. C. R. e SANTOS, A. F. dos. 1984. Novos enfoques no controle de doenças do painel da seringueira (*Hevea* spp.) no Sul da Bahia. In *Seminário Nacional de Seringueira, 4º*, Salvador, Brasil. 1984. s.l. s.e. s.p.
- STEIN, R., TABOSA, S. e NUNES, M. A. 1985. Requeima (*Phytophthora* spp.): um novo pro-

- blema para a heveicultura no Estado do Pará (Resumo). *Fitopatologia Brasileira* 10 (2): 254.
- TAN, A. M. 1983. A new fungicide for the control of Black Stripe. *Planter's Bulletin* n° 174:13 - 16.

