



## SUSCETIBILIDADE DAS RAÍZES DE PIMENTEIRA-DO-REINO *IN VITRO* ÀS FITOTOXINAS DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

Gledson Luiz Salgado de CASTRO<sup>1</sup>; Oriel Filgueira de LEMOS<sup>2</sup>; Célia Regina TREMACOLDI<sup>2</sup>; Fabrícia Kelly Cabral MORAES<sup>1</sup>; Lana Roberta Reis dos SANTOS<sup>1</sup> e Hugo Alves PINHEIRO<sup>3</sup>

### Resumo

As cultivares de pimenteira-do-reino em uso no Brasil são suscetíveis a *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, mas os diferentes graus de suscetibilidade ao patógeno ainda não são conhecidos. Objetivou-se demonstrar a suscetibilidade através das alterações no crescimento radicular da cultivar Bragantina e do híbrido intraespecífico (Apra x Guajarina) cultivadas *in vitro* com filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*. As plantas foram inoculadas em 15 mL de meio de cultura 1/2 MS com adição das doses de 0, 20, 30, 40 e 50% (v/v) do filtrado fúngico e mantidas durante 45 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, luminância de 3000 lux e temperatura de 25 ± 3° C. Foi avaliado o número, comprimento, massa fresca e seca das raízes. Para os dois genótipos de pimenteira-do-reino a fitotoxicidade do filtrado fúngico aumentou à medida que as doses do filtrado fúngico foi aumentado no meio de cultura, sendo mais acentuada na dose 50% (v/v), com menores valores para número, comprimento, massa fresca e seca das raízes para a Bragantina. Portanto, o filtrado de cultura provoca alterações no sistema radicular e pode ser utilizado como alternativa para indicar os níveis de suscetibilidade dos genótipos de pimenteira-do-reino.

**Palavras-chave:** Filtrado de cultura. *Piper nigrum* L. Suscetibilidade.

### Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta trepadeira e perene que cresce aderida a tutores de madeira ou a troncos de árvores (GORDO et al., 2012). Seu fruto, denominado de pimenta-do-reino, é amplamente utilizado na culinária como condimento, em forma de grãos inteiros, moídos e misturados a outros condimentos. O Brasil é o quarto maior produtor mundial com uma produção de 41.958 t, sendo 31.027 t produzidos pelo estado do Pará, cerca de 74% da produção nacional (IBGE, 2013). Porém, a doença fusariose causada pelo fungo *F. solani* f. sp. *piperis* reduz a produção por comprometer a obtenção de mudas e o ciclo produtivo da cultura.

O *F. solani* f. sp. *piperis* pode infectar a pimenteira através do sistema radicular, causando o apodrecimento das raízes e das radículas, resultando no aparecimento dos sintomas reflexos na parte aérea como o amarelecimento e murcha das folhas (TREMACOLDI, 2010). Atualmente, não existe controle químico eficaz e nem cultivares resistentes. Porém, os diferentes graus de suscetibilidade ao patógeno ainda não são conhecidos.

O filtrado de culturas possui metabólitos secundários, toxinas e outros compostos que são capazes de produzir sintomas da doença semelhante aos observados em campo (SVABOVÁ & LEBEDA, 2011). Desta forma, o filtrado de culturas pode ser utilizado para a seleção de plantas resistentes ou tolerantes a patógenos. Segundo Hollmann et al., (2002) em plantas sensíveis às fitotoxinas presentes no filtrado fúngico, podem ser observadas alterações morfológicas e inibição do crescimento em peso. Para a pimenteira-do-reino o filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* pode ser utilizado para quantificar os níveis de suscetibilidade das plantas as toxinas produzidas pelo patógeno.

Sabendo que as cultivares de pimenteira-do-reino são suscetíveis ao *F. solani* f. sp. *piperis* e que o sistema radicular dessas plantas é o principal alvo de ataque do patógeno, o objetivo desse estudo foi quantificar a suscetibilidade das raízes da cultivar Bragantina e do híbrido intraespecífico (Apra x Guajarina) através das alterações na morfologia e no crescimento das raízes resultantes da fitotoxicidade do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, Pará. O material vegetal utilizado foi proveniente do cultivo *in vitro* de brotos da cultivar Bragantina e do híbrido intraespecífico (Apra x Guajarina) com seis semanas e no quinto subcultivo. A cultivar Bragantina foi proveniente do cultivo de meristemas, enquanto o híbrido foi obtido a partir de sementes do cruzamento intraespecífico entre as cultivares Apra e Guajarina do Banco Ativo de Germoplasma – BAG - da Embrapa Amazônia Oriental. Durante todo o período experimental, as plantas

<sup>1</sup>Doutorando em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; E-mail: gledson.castro@ufra.edu.br.

<sup>2</sup>Pesquisador A da Embrapa Amazônia Oriental; E-mail: oriel.lemos@embrapa.br; celia.tremacoldi@embrapa.br

<sup>3</sup>Professor da Universidade Federal Rural da Amazônia; E-mail: hugo.ufv@bol.com.br.



foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, luminância de 3.000 lux e temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Para induzir o enraizamento dos brotos foi utilizado o meio de cultura constituído da metade das concentrações dos sais minerais MS ( $\frac{1}{2}$  MS), 3% de sacarose, vitaminas MS, 0,2% de phytagel e suplementado com  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido naftalenoacético (ANA), estabelecido previamente. Após três semanas as plantas foram padronizadas com duas gemas, duas folhas expandidas e quatro raízes com comprimento aproximado de 1,0 cm. Em seguida, as plantas foram transferidas para o meio básico MS sem a adição de reguladores de crescimento para induzir o alongamento dos brotos.

O filtrado de cultura foi obtido a partir do isolado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* cedido pela Coleção de Fungos Fitopatogênicos do Bioma Amazônia do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. O isolado foi cultivado durante uma semana em meio BSA (batata-sacarose-ágar). Em seguida, discos de 0,7 cm de diâmetro, contendo micélio e conídios do fungo, foram retirados das placas de Petri e transferidos para erlenmeyers contendo meio de cultura Czapek-Dox, sendo um disco para cada 200 mL de meio. Após 28 dias de incubação no escuro, à temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 2$  foi realizada a filtração com o auxílio de uma dupla gaze esterilizada. O micélio do fungo foi descartado e o filtrado foi autoclavado por 20 min a  $121^\circ\text{C}$  e 1,5 atm.

As plantas foram inoculadas em tubos de vidro com capacidade de 56 mL, contendo 15 mL de meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS suplementado com 0, 20, 30, 40 e 50 % (v/v) do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Aos 45 dias após a inoculação das plantas o efeito fitotóxico do filtrado fúngico nas alterações na morfologia e no crescimento do sistema radicular foi avaliado através da contagem do número de raízes e mensurações do comprimento da raiz, massa fresca e massa seca das raízes. Para a contagem direta do número de raízes foram considerados os valores iniciais mais aquelas emitidas durante o período de avaliação. O comprimento da maior raiz foi medido na região compreendida entre o coleto da planta e o ápice radicular mais distante. Essas mensurações foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (precisão de 0,01 mm). As raízes foram separadas da planta e pesadas imediatamente para obter peso de massa fresca. Em seguida, as raízes foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e levadas para estufa de ventilação forçada a  $65^\circ\text{C}$ , até atingirem o peso de massa seca constante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 5$ , sendo dois genótipos e cinco doses do filtrado fúngico (0, 20, 30, 40 e 50% v/v). Para cada genótipo foram utilizadas dez repetições, sendo cada repetição constituída por duas plantas. Os dados foram submetidos a análise da variância (teste F) e regressão.

## Resultados e Discussão

As alterações na morfologia das raízes foram observadas através da redução do número de raízes e comprimento da raiz. Para os dois genótipos, a fitotoxicidade do filtrado fúngico aumentou significativamente ( $R^2 > 0,80$ ;  $p < 0,001$ ) à medida que as doses do filtrado fúngico foram aumentadas no meio de cultura, sendo mais acentuadas na dose de 50% (v/v) e com menores valores para a Bragantina (Figura 1).

O crescimento em peso de massa fresca a massa seca das raízes diminuiu significativamente ( $R^2 > 0,80$ ;  $p < 0,001$ ) com o aumento das doses do filtrado fúngico em meio de cultura e, de forma semelhante ao número e comprimento das raízes, essas reduções foram mais acentuadas na dose de 50% (v/v) do filtrado fúngico com menores valores para a Bragantina (Figura 2).

O efeito médio da toxicidade das doses do filtrado fúngico foi utilizado para comparar a suscetibilidade do sistema radicular entre os genótipos de pimenteira-do-reino (Tabela 1). O híbrido apresentou as maiores médias para o número de raízes, comprimento de raiz e acúmulos de massa fresca e massa das raízes. Desse modo, foi observada maior pressão de toxicidade do filtrado fúngico no sistema radicular da Bragantina.

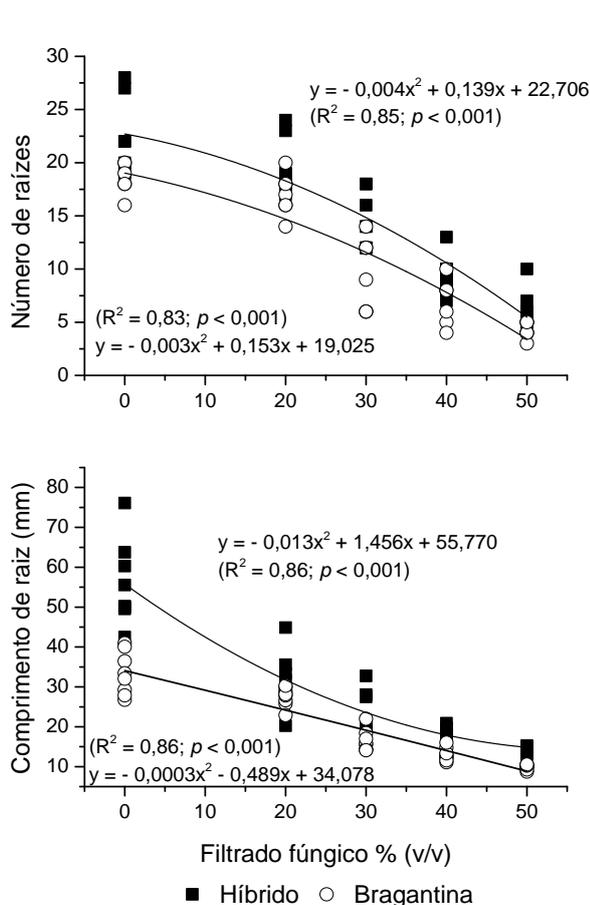
Essa maior suscetibilidade das raízes da Bragantina foi confirmado, também, através das estimas das doses do filtrado fúngico ( $DL_{50}$ ) capazes de reduzir em 50% o crescimento em peso de massa seca das raízes. Foi observada uma menor dose do filtrado fúngico ( $DL_{50}$ ) para a Bragantina (30,54%, v/v) em relação ao híbrido (35,21%, v/v) para reduzir em 50% o crescimento em peso de massa seca das raízes.

Em plantas *in vitro* de maracujazeiro-amarelo a adição de doses do filtrado de cultura de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em meio básico de cultura provoca alterações no número de raízes e comprimento de raiz e redução do crescimento em massa fresca e massa seca do sistema radicular. Essas reduções foram maiores na maior concentração (50%, v/v) do filtrado fúngico com menores valores para os genótipos sensíveis as toxinas do patógeno (FLORES et al., 2012).

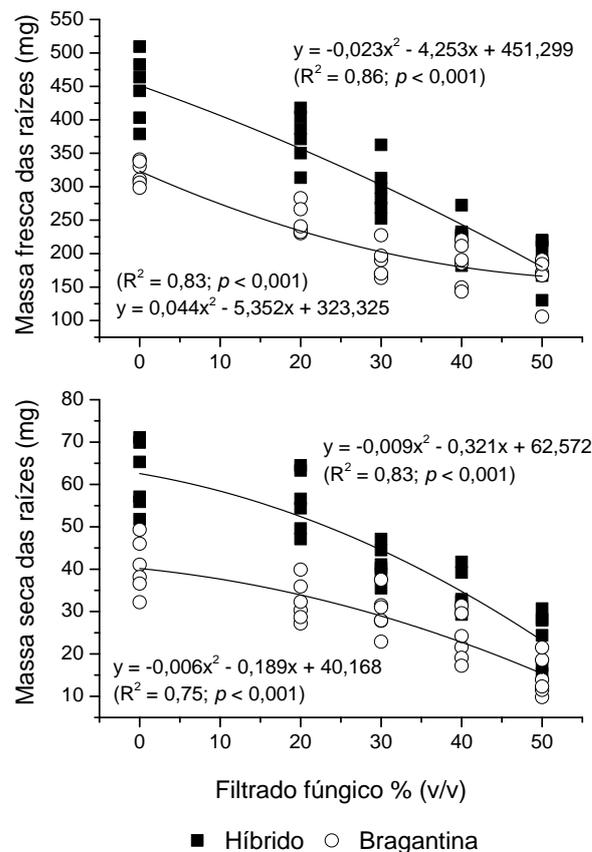
O ácido fusárico é o metabólito secundário produzido por espécies do gênero *Fusarium*. Em raízes de plantas de milho, foi observado que o essa toxina diminui a atividade respiratória da mitocôndria



necessária para o suprimento de ATP das raízes causando a redução no número e comprimento, assim como menor crescimento em peso de massa seca das raízes (SVABOVÁ & LEBEDA, 2005).



**Figura 1.** Alterações na morfologia das raízes dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) submetidos às doses do filtrado da cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.



**Figura 2.** Alterações no crescimento em peso de massa fresca e massa seca das raízes dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) submetidos ao filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Segundo Lebeda et al., (2010) o filtrado de culturas fúngicas pode conter uma grande quantidade de metabólitos secundários, polissacarídeos, oligossacarídeos, proteínas, glicoproteínas, ácidos graxos insaturados, reguladores de crescimento e as toxinas que apresentam um papel fundamental no desenvolvimento da doença. Para Yoder (1980), as toxinas são classificadas com base no seu modo de ação, ou seja, aquelas que atuam no aparecimento da doença e aquelas responsáveis pelo desenvolvimento da doença.

**Tabela 1** Efeito da média das doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre o sistema radicular dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura.

Genótipo	Raízes			
	Número	Comprimento (cm)	Massa fresca (mg)	Massa seca (mg)
Híbrido	14,38 a	28,77 a	306,86 a	43,48 a
Bragantina	11,30 b	20,06 b	221,23 b	28,23 b
CV(%)	17,91	20,00	12,45	16,09

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.



No presente experimento o filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* foi autoclavado. Desse modo, o efeito fitotóxico na alteração da morfologia e redução do crescimento em peso das raízes dos genótipos de pimenteira-do-reino, possivelmente, foi devido às toxinas termoestáveis presentes no filtrado fúngico do patógeno.

### Conclusões

A utilização do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* é uma alternativa para determinar a suscetibilidade dos genótipos de pimenteira-do-reino às toxinas produzidas pelo patógeno, que estão envolvidas na aparecimento e desenvolvimento da doença.

As alterações na morfologia e no crescimento *in vitro* com adição de filtrado do fungo ao meio de cultura permitem identificar a suscetibilidade do sistema radicular dos genótipos de pimenteira-do-reino, sendo a cultivar Bragantina mais suscetível que o híbrido às toxinas do filtrado fúngico.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida; à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA); e ao Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Oriental, Belém - Pará pelo apoio logístico.

### Referências

FLORES, P. S.; OTONI, W. C.; DHINGRA, O. D.; DINIZ, S. P. S. S.; SANTOS, T. M., BRUKNER, C. H. *In vitro* selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium* vascular wilt. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** v. 108, p. 37–45, 2012.

GORDO, S. M. C.; PINHEIRO, D. G.; MOREIRA, E. C. O.; RODRIGUES, S. M.; POLTRONIERI, M. C.; LEMOS, O. F.; SILVA, I. T.; RAMOS, R. T. J.; SILVA, A.; SCHNEIDER, H.; SILVA JUNIOR, W. A.; SAMPAIO, I.; SYLVAIN DARNET, S. High-throughput sequencing of black pepper root transcriptome. **BMC Plant Biology.** p. 2- 9. V. 12, n. 168. 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Sistema de recuperação automática – SIDRA.** 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=1&i=P>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2014.

HOLLMANN, P. J.; LOHBRUNNER, G. K.; SHAMOUN, S. F.; LEE, S. P. Establishment and characterization of *Rubus* tissue culture systems for *in vitro* bioassays against phytotoxins from *Rubus* fungal pathogens. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 68: 43-48. 2002.

SVABOVÁ, L.; LEBEDA, A. *In vitro* Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens. **Journal Phytopathology**, v.153, p. 52–64, 2005.

SVÁBOVÁ, L.; LEBEDA, A.; KITNER, M.; SEDLÁROVÁ, M.; PETRIVALSKY3, M.; DOSTÁLOVÁ1, R.; ONDREJ, M.; HORÁCEK, J.; SMYKALOVÁ, I.; GRIGA, M.; Comparison of the effects of *fusarium solani* filtrates *in vitro* and *in vivo* on the morphological characteristics and peroxidase activity in pea cultivars with different susceptibility. **Journal of Plant Pathology.** n. 1, p. 19-30, 2011.

TREMACOLDI, C. R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle.** Belém, PA - Embrapa Amazônia Oriental, 21 ed., 23 pag. Agosto, 2010.

YODER, O. C. Toxins in pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.** n. 18, p. 29-103, 1980.