



MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE ESPOROS DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* EM PLANTAS DE *Piper nigrum* L.

Jandson José do Vale Guimarães¹, Ilmarina Campos de Menezes², Simone Miranda Rodrigues³

¹Estudante de Eng^o Agrônômica do IFPA/Estagiário Embrapa Amazônia Oriental, guimaraesjandson@gmail.com

²Analista da Embrapa Amazônia Oriental, ilmarina.menezes@embrapa.br

³Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, simone.rodrigues@embrapa.br

Resumo: O Brasil é o quarto maior exportador de pimenta-do-reino, alcançando cerca de 30 mil toneladas, sendo o Pará responsável por mais de 85% da produção. A principal dificuldade para a expansão da cultura consiste na doença fusariose que resulta na morte precoce dos pimentais, reduzindo em 50% o ciclo produtivo. Pouco se sabe, em nível molecular, sobre a interação *Piper nigrum* L.-*Fusarium solani*, entretanto, um estudo iniciado em conjunto pela Embrapa e a UFPA, envolvendo o transcriptoma dessa interação, sinalizou a participação de sequências gênicas de grande interesse da pimenteira-do-reino que respondem ao processo de infecção. Nesse sentido, existe a necessidade de adequações de protocolos de infecção da planta visando estudos futuros para identificar genes expressos diferencialmente no processo de infecção e análises de sequências gênicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever e validar uma metodologia eficiente para inoculação de esporos de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em plantas de pimenta do reino

Palavras-chave: fusariose, meio de Bran, pimenta-do-reino.

Introdução

Considerada a especiaria mais importante comercializada no mundo, a pimenta-do-reino assumiu cultivo comercial no país a partir da década de 30 no Estado do Pará. Atualmente, o Brasil é o quarto maior produtor desse condimento, tendo se tornado o maior produtor e exportador do mundo no início da década de 80. O surgimento da doença fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, resultou em perdas significativas à pipericultura no país, devido às condições climáticas favoráveis à proliferação do patógeno, ocasionando redução significativa da produção e queda nas taxas de exportações. A forma de propagação comercial



da cultura, via estacas de três a quatro nós, favorece a disseminação de doenças associadas à vulnerabilidade genética (Duarte; Albuquerque, 1999).

Atualmente, os métodos de controle da doença acarretaram elevação nos custos de produção e diminuição da competitividade da pipericultura nacional. Diante do exposto e das dificuldades encontradas no programa de melhoramento genético convencional da cultura, a Embrapa juntamente a UFPA iniciaram um estudo focado no transcriptoma de tecidos de raízes de plantas de pimenta-do-reino cultivadas em casa-de-vegetação e no processo de interação entre a pimenteira-do-reino e o *F. solani* f. sp. *piperis*, a fim de obter uma lista de transcritos da planta expressos em resposta a infecção pelo patógeno, usando o processo de montagem “De novo”. Esse tipo de conhecimento é importante, já que o enfoque dado à resposta da planta submetida à infecção pelo patógeno são bastante escassos.

Apesar de não possuírem um sistema de proteção mediado por anticorpos, as plantas desenvolveram durante o processo de evolução, mecanismos diferenciados de defesa que, quando acionados (na maioria das vezes por fungos, bactérias e vírus) percebem a agressão, traduzindo essa percepção em uma resposta apropriada e de forma adaptativa (Pieterse et al., 2005; Wit, 2007). De forma geral, são capazes de se defender do ataque de maneira efetiva, dada a multiplicidade e eficiência desses mecanismos, de maneira que, na natureza, a resistência é uma regra e a susceptibilidade uma exceção (Agrios, 1997). No caso da pimenteira-do-reino, mesmo sendo suscetível ao *F. solani*, acredita-se que a planta tenha um mecanismo de defesa não eficiente, já que a morte da planta, em condições de campo, ocorre em média dois anos após o início do aparecimento dos sintomas.

Para as pesquisas genéticas envolvendo a identificação de sequências gênicas, há necessidade do estabelecimento de método adequado de inoculação e infecção da planta, simulando os estágios do aparecimento da doença no campo. Para tanto, meios de culturas são utilizados usando fontes de açúcares mais complexos tais como farelos ou grãos macerados de trigo, cevada, aveia, arroz e outros para o crescimento do fungo. O objetivo do presente trabalho foi adaptar e validar um método eficiente de inoculação do fungo *F. solani* f. sp. *piperis* em plantas de pimenta-do-reino *P. nigrum* L., utilizando o solo como meio de infestação.



Material e Métodos

O trabalho (experimento) foi desenvolvido em casa de vegetação e nos laboratórios de Fitopatologia e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental.

Foram utilizadas plantas de *P. nigrum* L. cultivar Bragantina, com 3 meses de idade em vasos com substrato composto por vermiculita e areia lavada numa proporção de 2:1. O isolado de *F. solani* f. sp. *piperis* obtido da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, proveniente do Município de Baião-PA, foi inoculado em estacas semilenhosas de pimenta-do-reino para reativar a virulência do patógeno, que após 7 dias apresentaram sintomas de podridão, sendo em seguida cultivado em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar).

Preparo do meio de Bran

Para obtenção do inóculo, uma mistura composta de 1 parte de solo peneirado e 3 partes de farelo de trigo (meio de Bran) foram misturadas e umedecidas com 30% (p/v) de água. Posteriormente, 350 mL da mistura foram distribuídos em 60 frascos erlenmeyers de 500 mL e autoclavados 3 vezes a 1,0 atm/120° C por 40 min. Após as três autoclavagens, em câmara de fluxo laminar, 30 frascos receberam três discos de micélio-BDA cada, retirado com vazador de 5 mm de Ø, de uma cultura de *F. solani* crescida em BDA durante 7 dias. Para o controle, foi colocado três discos de BDA retirado com vazador de 5 mm de Ø, sem o fungo, em cada erlenmyer. Os frascos foram fechados e colocados em temperatura ambiente com iluminação ininterrupta durante 21 dias sendo agitados a cada três dias para uniformizar a colonização do fungo.

Contagem de esporos

Para avaliação da presença de esporos no meio de Bran, foram retirados 2 g do meio e misturados à 5 mL de água destilada. Foi retirado uma alíquota de aproximadamente 1 mL para visualização no microscópio. Após a certificação de que houve produção de esporos (conídios), uma suspensão aquosa foi avaliada por meio de contagem de esporos em câmara de Neubauer



Inoculação das plantas

Após a contagem dos esporos, o meio de Bran foi adicionado em cada vaso em uma proporção de 5% (v/v) do volume do substrato, tanto para as plantas inoculadas (meio de Bran com o fungo), quanto para as plantas controle (meio de Bran sem o fungo). As plantas foram dispostas em bancadas separadas, inoculadas e não inoculadas (plantas controle), e permaneceram em casa de vegetação durante 45 dias, sendo irrigadas sempre que necessário.

As amostras para coleta dos tecidos vegetais foram feitas à 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 dias, 15 dias, 20 dias, 30 dias e 45 dias após a infecção

Resultado e Discussão

Na avaliação foi levado em conta principalmente o aspecto geral das plantas de pimenteira do reino, avaliando portanto a eficiência do método utilizado. O meio de cultura utilizado para o cultivo do fungo composto por solo e farelo de trigo foi eficiente. Donini et al. (2006) mostram que o cultivo do fungo *Agaricus brasiliensis* suplementado com farelo de trigo na proporção de 20% foram obtidas as maiores medias de velocidade de crescimento micelial comparadas a outras suplementações de farelos de aveia ou arroz. Na pimenteira-do-reino, o aspecto das plantas controle e inoculadas, após 15 dias do início do experimento permaneceu o mesmo (figura 1A e 1B). A avaliação quanto coloração de folhas nos primeiros 15 dias após a inoculação mostram que, pelo menos visualmente, não houve modificação na aparência e coloração das folhas. Estudos mostram que *F. solani* f. sp. *piperis* x *P. nigrum* formam um patossistema compatível que resulta em doença (Albuquerque et al., 2001). Entretanto, antes mesmo dos sintomas serem perceptíveis, há uma gama de processos que acontecem em nível molecular que envolve uma “cascata” de transdução de sinais que leva à complexa resposta de defesa.

No caso específico do *F. Solani*, que é um fungo de solo, a concentração de esporos preconizada para o estabelecimento do processo de doença varia de 1,8 a 2,0 x 10⁶ (Lemos, 2003). A concentração de esporos utilizados nas plantas inoculadas foi de 3,5 x 10⁶ conídios/mL, um número maior do que o necessário para causar infecção. Nesse trabalho, ao final de 30 dias, todas as plantas não inoculadas não apresentaram sintomas da doença, entretanto as plantas inoculadas

desenvolveram processo de infecção, com secamento dos ramos e posterior morte (figura 1C e 1D).

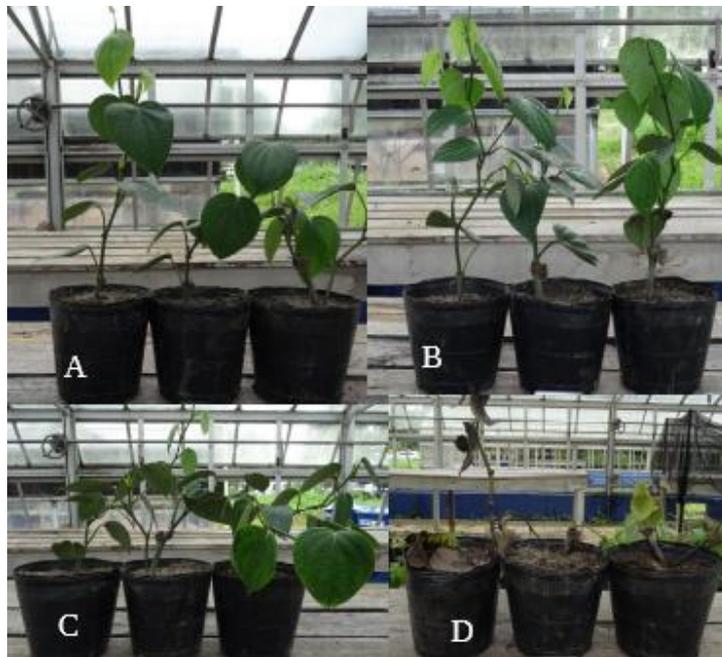


Figura 1. Cultivo de plantas de pimenteira-do-reino em meio de Bran. A - Plantas controle 15 dias após o início do experimento, B - Plantas inoculadas 15 dias após o início do experimento, C - Plantas controle 30 dias após o início do experimento, D - Plantas inoculadas 30 dias após o início do experimento.

Conclusões

O meio de cultura utilizado mostra-se eficiente para o crescimento micelial do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. A multiplicação de conídios alcança produção e crescimento suficiente para infecção quando cultivado em meio de cultura composto por solo peneirado suplementado com 5% de farelo de trigo.

Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Oriental pelo apoio financeiro via projeto No. 22.13.06.022.00.00-00. Ao Laboratório de Fitopatologia e aos técnicos José Maria de Souza, Clenilda Tolentino Bento da Silva e Manoel Luiz Andrade da Silva

Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L.; ENDO, T. Resistência de Piperaceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 3, p. 341-348, jul./set. 2001.
- DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. do. Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 6, p. 995-999, jun. 2006.
- DUARTE, M. de L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. de. Doenças da cultura da pimenta-do-reino. In: DUARTE, M. de L. R. (Ed.). **Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro**. I. Plantas industriais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. p. 159-208.
- LEMONS, O. F. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2003. 159 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- PIETERSE, C. M. J.; PELT, J. A. V.; WEES, S. C. M. V.; TON, J.; VERHAGEN, B. W. M.; KLOOSTERZIEL, K. L.; HASE, S.; VOS, M. de; OOSTEN, V. V.; POZO, M.; SPOEL, S.; ENT, S. V. D.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M. L. V.; LOON, L. C. V. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 13, n. 1, p. 277-295, 2005.
- WIT, P. J. G. M. de. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007.