

INFLUÊNCIA DA TÉCNICA DE INOCULAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE
ESPOROS NA PATOGENICIDADE DE *Nectria haematococca* f. sp.

piperis SOBRE PIMENTA-DO-REINO^{1/}

Fernando Carneiro de Albuquerque^{2/}

Silamar Ferraz^{3/}

Carlos Siqueyuki Sedyama^{4/}

1. INTRODUÇÃO

Em regiões do Estado do Pará onde ocorre disseminação de esporos de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) pelo vento, desenvolvem-se infecções na parte aérea da pimenta-do-reino, as quais, evoluindo, ocasionam o secamento de vários ramos (1, 2). A enfermidade quase sempre ocasiona a morte da planta.

Quando surgem em uma cultura pimenteiras-do-reino infectadas na parte aérea, os prejuízos tornam-se elevados pouco tempo depois. Um pimental com 30 hectares, com aproximadamente 30.000 plantas, pode ser dizimado em menos de dois anos.

A uniformidade genética da cultura em grandes áreas tem concorrido para rápida disseminação de patógenos (2, 4). O germoplasma de pimenta-do-reino existente no Brasil apresenta pouca variabilidade, o que constitui sério obstáculo para a seleção de variedades resistentes (1).

No caule afetado, após a morte dos tecidos desenvolvem-se abundantes esporodóquios, que originam grande quantidade de macroconídios, como ocorre em ramos de amoreira infectados por *F. solani* f. sp. *pisi* (3).

No presente trabalho, os macroconídios de *N. haematococca* f. sp. *piperis* foram usados em diferentes concentrações e técnicas de inoculação, para se testar a patogenicidade do fungo à pimenta-do-reino e deste modo determinar a participação dos

^{1/} Parte da tese do primeiro autor para obtenção do grau de M. S. em Microbiologia Agrícola (Fitopatologia), na Universidade Federal de Viçosa.

Recebido para publicação em 07-06-1976.

^{2/} Pesquisador em Agricultura da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Pesquisador bolsista do CNPq.

^{3/} Professor Adjunto da Universidade Federal de Viçosa.

^{4/} Professor Assistente da Universidade Federal de Viçosa.

macronídios na disseminação aérea do patógeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Influência do Tempo de Permanência em Câmara Úmida, Expressa pelo Índice de Enfermidade, em Mudas Inoculadas com Suspensão de Macroconídios

Foi realizado um ensaio inteiramente casualizado para determinar períodos de exposição de mudas inoculadas por atomização de suspensão de macroconídios à umidade relativa elevada, adequados ao desenvolvimento da infecção. Mudas provenientes de sementes e de estacas com 5 e 8 meses de idade foram desenvolvidas em solo distribuído em recipiente de um litro. Os tratamentos consistiram em se deixar as plantas, após a inoculação, em câmara úmida com 100% de U.R. à temperatura de 20°C a 25°C, durante os períodos de tempo de 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Cada tratamento possuía 8 repetições, 4 mudas de sementes e 4 provenientes de estacas. Decorrido o tempo de permanência em câmara úmida, as mudas foram levadas para casa-de-vegetação, em temperatura que variava de 18°C a 30°C e umidade relativa de 50 a 100%. A suspensão de esporos foi preparada com colônias desenvolvidas em meio constituído de folhas de pimenta-do-reino, com a parte basal imersa em 30 ml de água destilada, em tubo de ensaio de 25 x 2,5 cm e esterilizadas em autoclave por 20 minutos. Após a transferência de inoculos do isolamento 21, os tubos foram levados para câmara de crescimento FORMA SCIENTIFIC, Modelo 24, com 81 x 162 x 67cm úteis, a 24°C, e colocados em prateleiras a 10 cm de distância de 2 lâmpadas fluorescentes F 15T 12 C/W, 15 W, reguladas para permanecerem acesas continuamente durante 12 horas por dia. Após 12 dias, as colônias foram agitadas em água destilada e filtradas em gaze. A contagem dos esporos foi feita ao microscópio, em 5 gotas de 0,01 ml, distribuídas em lâmina por meio de uma micropipeta automática. Calculou-se a quantidade de macroconídios na suspensão inicial, diluindo-se, em seguida, para a concentração desejada, que foi de 40.000 esporos por mililitro. A atomização da suspensão de esporos na folhagem das plantas foi feita com um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Avaliou-se a quantidade de lesões no caule 20 dias depois da retirada das primeiras mudas de câmara úmida, considerando os 7 entrenós a partir da extremidade do ramo de crescimento. De acordo com o número de lesões avançadas no caule, atribuiu-se uma nota às plantas dos diferentes tratamentos:

Escala de nota em relação ao número de lesões avançadas no caule

Número de lesões no caule	Nota
0	4
1 - 2	2
3 - 5	3
6 - 7	4

2.2. *Influência da Concentração de Macroconídios, Expressa pelo Índice de Enfermidade, em Mudanças Inoculadas por Atomização de Suspensões de Esporos*

O ensaio, inteiramente casualizado com 14 tratamentos e 4 repetições, foi instalado em casa-de-vegetação, onde a temperatura variou de 20°C a 32°C e a umidade relativa, de 50 a 100%. Os tratamentos consistiram na atomização de suspensões de macroconídios na parte aérea de mudas de pimenta-do-reino propagadas por estacas com 5 meses de idade. As mudas foram formadas em solo distribuído em recipientes de um litro. Antes da inoculação, com uma agulha foram feitas três perfurações nos ramos de crescimento de 50% das mudas, logo abaixo da inserção de cada nó, nos sete entrenós a contar da extremidade do ramo. Para preparo das culturas e suspensão de esporos, procedeu-se como foi descrito no experimento anterior. As seis suspensões com diferentes concentrações de macroconídios foram preparadas de acordo com uma escala de logaritmos neperianos, variando de $\log_8$ - $\log_{13}$, que correspondiam, aproximadamente, a 3.000, 8.000, 22.000, 60.000, 163.000 e 442.000 macroconídios por mililitro. Foram obtidas pela diluição em água destilada de uma suspensão inicial em que foi feita a avaliação dos esporos por mililitro, pela contagem dos macroconídios em 5 gotas de 0,01ml, distribuídas em lâmina com auxílio de uma micropipeta automática.

Nas plantas testemunhas foi aplicada apenas solução do meio estéril diluído em água. A atomização da suspensão de esporos e da solução do meio foram feitas com atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico, e, logo em seguida, as mudas foram colocadas em câmara com umidade relativa de 100%, temperatura variando entre 20°C-24°C, durante 72 horas. Depois foram levadas para casa-de-vegetação, nas condições já mencionadas. Para avaliação, procedeu-se como no experimento anterior, adotando-se a mesma escala para atribuição das notas às plantas inoculadas, durante os 15 dias que foram seguidos pela retirada das mudas da câmara úmida.

3. RESULTADOS

3.1. *Influência do Tempo de Permanência em Câmara Úmida no Índice de Enfermidade em Mudanças Inoculadas com Suspensão de Macroconídios*

As lesões foliares arredondadas, escuras, visíveis em ambas as epidermes, (Figura 1 D), que se desenvolveram nas plantas expostas à umidade por período de 72 horas ou mais, não foram consideradas na avaliação do índice de enfermidade, porque não se manifestaram nos tratamentos de menor tempo de permanência na câmara úmida, nos quais ocorreram lesões do caule (Figura 1 B).

A análise de variância mostrou haver diferença significativa dos índices de enfermidade em relação a diferentes tempos de permanência das plantas inoculadas em câmara úmida, considerando-se o número de lesões no caule.

Como se observa no Quadro 1, não houve diferença significativa, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, entre os tratamentos em que as mudas permaneceram em câmara úmida durante 120 e 96 horas. Os tratamentos de 96, 72 e 48 ho-

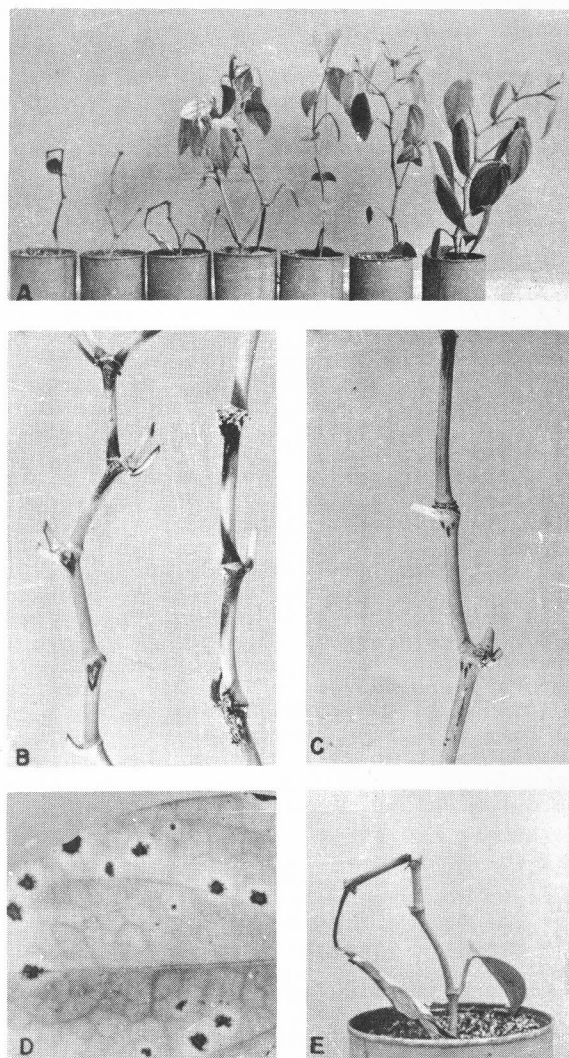


FIGURA 1 - (A) Mudras, sem ferimento no caule, inoculadas por atomização de suspensões de diferentes concentrações de esporos. Da esquerda para direita, 442.000, 163.000, 60.000, 22.000, 8.000, 3.000 e 0 macroconídios por mililitro. (B) Lesões do caule consideradas para avaliação do índice de enfermidade. (C) Ferimentos feitos no caule antes da inoculação. (D) Lesões foliares típicas. (E) Queda do entrenó infetado.

ras foram estatisticamente semelhantes, ocorrendo diferença no tratamento de 48 horas em relação a mudas de estacas. Os tratamentos de 48, 24 e 12 horas não diferiram entre si.

Verificou-se que um tempo de exposição das mudas inoculadas à umidade relativa de 100% por 72 horas correspondeu a um índice de enfermidade próximo de 50%. O índice elevou-se para 80% em um período de 96 horas. Durante 120 horas atingiu quase 100% (Figura 2).

QUADRO 1 - Efeito do tempo de permanência, em câmara úmida, de mudas inoculadas com suspensão de macroconídios, expresso pelo índice de enfermidade, Viçosa, MG, 1975

Tempo de permanência em horas	Média das notas por planta*	
	Mudas de sementes	Mudas de estacas
120	4,00 a	3,75 a
96	3,50 abc	3,75 a
72	2,50 bcd	2,75 ab
48	2,50 bcd	2,25 b
24	2,25 cd	2,25 b
12	1,75 d	2,25 b

DMS a 5% - Tukey - 1,36

* Valores com letra igual não diferem entre si, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

3.2. *Influência da Concentração de Macroconídios no Índice de Enfermidade em Mudas Inoculadas por Atomização de Suspensão de Esporos*

As plantas inoculadas com maior concentração de esporos exibiram maior quantidade de lesões escuras nas folhas (Figura 1 D). Entretanto, não foram consideradas para avaliação dos índices de enfermidade, porque apresentaram distribuição mais irregular, nos diferentes tratamentos, do que as lesões do caule (Figura 1 B). Frequentemente ocorreu queda do entrenó infectado (Figura 1 A, E).

A análise da variância mostrou haver diferença significativa entre a média da testemunha e a média de diferentes tratamentos.

Pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, apresentado no Quadro 2, não se observou diferença significativa entre os tratamentos em que as plantas receberam ferimentos no caule e aspersão de diferentes suspensões de esporos. Todos diferiram da testemunha. Nas plantas que não foram feridas, os resultados das atomizações com suspensões de 442.000, 163.000 e 60.000; 22.000, 8.000 e 3.000; 8.000 e 3.000 esporos por mililitro não foram significativamente diferentes. Os tratamentos 8.000 e 3.000 não diferiram das plantas testemunhas, embo-

ra estas estivessem isentas de infecção.

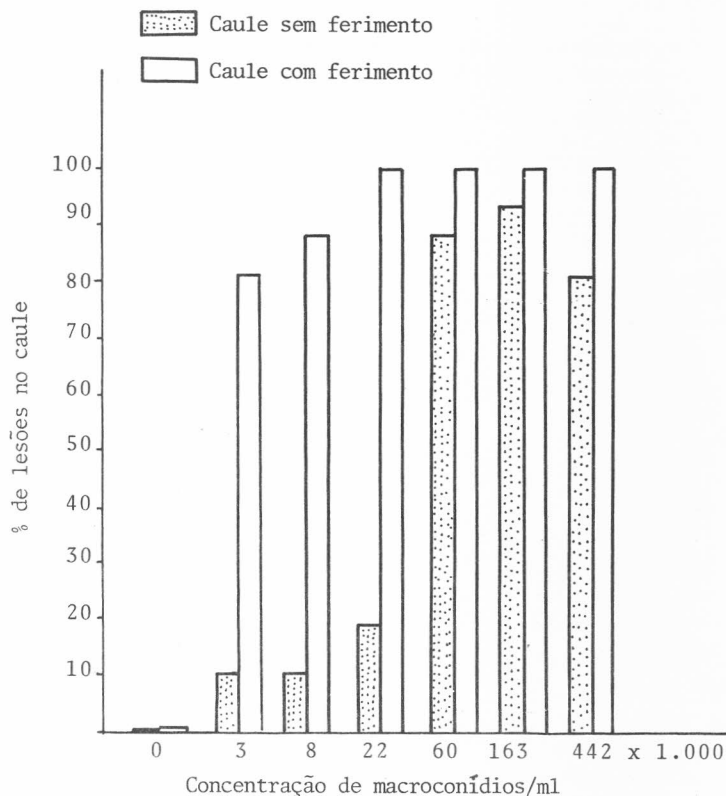


FIGURA 2 - Relação entre tempo de permanência em câmara úmida e índice de enfermidade em mudas de pimenta-do-reino inoculadas com suspensão de macroconídios de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*.

Comparando-se os níveis de significância pelo teste de Tukey, verifica-se que a suspensão de 3.000 macroconídios por mililitro, atomizada no caule ferido, correspondeu à concentração elevada de 442.000 esporos, inoculada no caule sem ferimento.

Quando o caule foi ferido e as mudas foram atomizadas com suspensões de 3.000 e 8.000 macroconídios por mililitro, os índices de enfermidade corresponderam a 80% e 90% de lesões no caule. A percentagem atingiu 100% em relação aos outros níveis de concentração de esporos, na suspensão aplicada. Nos tratamentos em que o caule das plantas continuou incólume, os índices de enfermidade aumentaram também com a concentração de macroconídios, à exceção do tratamento de 442.000 esporos por

mililitro, que resultou em menor número de lesão do que a suspensão de macroconídios imediatamente inferior, em razão de alguma causa não prevista no delineamento experimental (Figuras 1 A e 3).

QUADRO 2 - Influência da concentração de macroconídios de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* no índice de enfermidade em mudas inoculadas por atomização de suspensão de esporos. Viçosa, MG, 1975

Concentração de macroconídios/ml	Média das notas por planta*	
	Caule com ferimento	Caule sem ferimento
442.000	4,00 a	3,50 ab
163.000	4,00 a	3,75 a
60.000	4,00 a	3,75 a
22.000	4,00 a	2,50 bc
8.000	3,75 a	1,50 cd
3.000	3,50 a	1,75 cd
Testemunha	1,00 b	1,00 d

DMS a 5% - Tukey - 1,15

* Valores com letra igual não diferem entre si, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

4. DISCUSSÃO

Nos ensaios (3.1 e 3.2.) foi verificado que o índice de enfermidade aumenta com o tempo de exposição das mudas inoculadas à umidade relativa elevada, com a concentração de esporos na suspensão e com as condições de integridade dos tecidos das mudas em que foi feita aspersão da suspensão de esporos.

Como em algumas regiões do Estado do Pará o patógeno tem-se propagado rapidamente, principalmente em razão da infecção no caule, que, evoluindo, ocasiona a morte de toda a planta, os resultados dos ensaios poderiam sugerir que no campo ocorre a disseminação de esporos pelo vento.

Não é conhecida outra enfermidade causada por "forma especial" de *N. haematococca* (*F. solani*) em que esporos de disseminação aérea, levados pelo vento, tenham capacidade de acarretar epidemias severas em plantações de finalidade comercial. Normalmente, o patógeno dissemina-se por estruturas que permanecem no solo (5, 6, 7, 8).

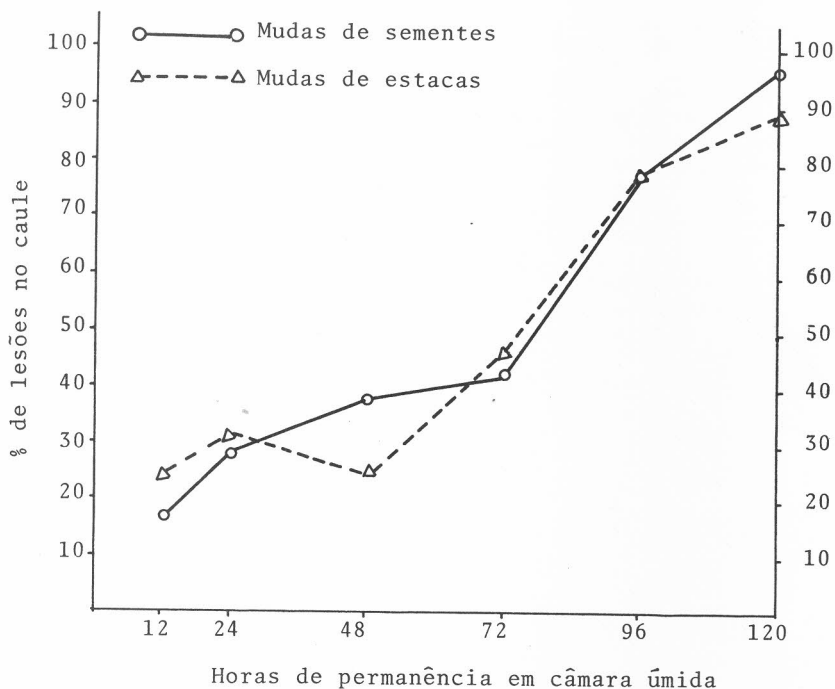


FIGURA 3 - Relação entre concentração de esporos de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e índice de enfermidade, em mudas de pimenta-do-reino inoculadas por atomização de suspensões de macroconídios.

Como nos ramos necrosados de pimenteiros-do-reino atacados no campo desenvolve-se maior quantidade de esporodóquios do que peritécios, os macroconídios constituem as estruturas mais responsáveis pela disseminação do patógeno. Quanto aos ascósporos, em número mais reduzido, são mais importantes em proporcionar meios de frequentes variações genéticas que originam raças fisiológicas com diferentes características de patogenicidade (3).

Índices de enfermidade mais elevados, em relação a suspensões de esporos mais concentradas, podem constituir explicações para o fato de que nas áreas de cultivo de pimenta-do-reino, no Estado do Pará, em que a quantidade de inóculo é elevada, o secamento dos ramos adquire, em pouco tempo, caráter epifitótico, dizimando pimenteiros vigorosos, mesmo tratando-se de plantas com menos de 4 anos de idade. Na época da estação chuvosa, janeiro a junho, as condições ambientes podem permanecer com umidade relativa elevada por vários dias. Os tecidos do caule da pimenta-do-reino estão sujeitos a constantes fermentos, em razão de tombamento de ramos, podas para retiradas de estacas de propagação e danos durante a colheita.

Verificou-se que a grande quantidade das lesões dos ramos

começa a se desenvolver na região do nó, tanto em mudas inoculadas como em pimenteiras-do-reino infectadas naturalmente no campo. Isto sugere que o ponto de junção dos entrenós constitui local de fácil penetração das hifas do patógeno. Deve ser ainda considerado que nas raízes de sustentação que se desenvolvem na região do nó podem ficar retidos vários esporos do patógeno que, ao germinarem, em condições favoráveis, podem causar a infecção.

As lesões das folhas não têm sido observadas em pimenteiras-do-reino no campo. Nas mudas inoculadas não apresentou distribuição uniforme em todos os tratamentos. Pode servir de indicação da viabilidade dos esporos aplicados.

O método de inoculação de mudas por aspersão de suspensão de macroconídios pode ser utilizado na seleção de plantas de pimenta-do-reino resistentes, tendo em vista que é desenvolvido com relativa facilidade e proporciona elevado índice de enfermidade em grande número de mudas inoculadas.

5. RESUMO

Mudas de pimenta-do-reino, oriundas de sementes e estacas, foram submetidas a diferentes técnicas de inoculação e concentrações de macroconídios de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*, procurando-se determinar a sua patogenicidade e a participação destes esporos na disseminação aérea do patógeno. Consideraram-se o tempo de permanência das mudas em câmara úmida após a inoculação e efeito da concentração de inóculo na intensidade de infecção em tecido do caule incólume e ferido. Os resultados demonstraram que o índice de enfermidade variou com o tempo de permanência das mudas inoculadas em ambiente úmido, com a concentração de esporos e com as condições de integridade do tecido do suscetível.

Em relação ao período de exposição das mudas inoculadas à umidade relativa de 100% verificou-se que permanências de 72, 96 e 120 horas corresponderam, respectivamente, aos índices de enfermidade de 50%, 80% e 100%. Atomização com suspensão de 3.000 macroconídios por mililitro no caule ferido resultou em um índice de enfermidade igual ao obtido quando se usou uma suspensão de 442.000 esporos por mililitro no caule sem ferimento.

6. SUMMARY

The pathogenicity of *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* to black pepper as affected by inoculation techniques and spore concentration and, the role of the macroconidia in the fungus dissemination were studied. The incubation period in a moist chamber, inoculum concentration and wounding affected the disease severity. Disease indices were 50%, 80% and 100% when the plants were kept in a moist chamber for 72, 96 and 120 hours, respectively. Wounded plants inoculated with a suspension containing 3,000 spores/ml presented the same disease index as unwounded plants inoculated with 442,000 spores/ml.

7. LITERATURA CITADA

1. ALBUQUERQUE, F.C. *Podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino*. Belém, Inst. Pesq. Exp. Agropecuárias do Norte, 1964. 23 p. (Circ. nº 8).
2. ALBUQUERQUE, F.C. *Pimenta-do-reino*. In: *Livro anual de agricultura*, Brasília, Ministério da Agricultura, 1968. p. 215-223.
3. COOK, R.J., FORD, E.J. & SNYDER, W.C. Mating types, sex, dissemination and possible sources of clones of *Hypomyces (Fusarium) solani* f. *pisi* in South Australia. *Australian J. Agr. Res.* 19 (2): 253-259. 1968.
4. HOLLIDAY, P. & MOWAT, W.P. Root rot of *Piper nigrum* L. (*Phytophthora palmivora*) Kew, Commonwealth Mycological Institute, Phytopathological Paper nº 5, 1963. 62 p.
5. MATUO, T. & SNYDER, W.C. Host virulence and the *Hypomyces* stage of *Fusarium solani* f. *sp. pisi*. *Phytopathology* 62 (7): 731-735. 1972.
6. MATUO, T. & MOWAT, W.P. Use of morphology and mating populations in the identification of *formae speciales* in *Fusarium solani*. *Phytopathology* 63 (5): 562-565. 1973.
7. SNYDER, T.S. & HANSEN, H.N. Species concept, genetics and pathogenicity in *Hypomyces solani*. *Phytopathology* 44 (7): 338-442. 1954.
8. TOUSSOUN, T. A. & SNYDER, W. C. The pathogenicity, distribution and control of two races of *Fusarium (Hypomyces) solani* f. *cucurbitae*. *Phytopathology* 51 (1): 17-22. 1961.

