

# EXPERIENTIÆ

ÓRGÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

VOLUME 22

SETEMBRO, 1976

NÚMERO 6



CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DE *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* E SUA PATOGENICIDADE À PIMENTA-DO-REINO

(*Piper nigrum* L.) 1/

Fernando Carneiro de Albuquerque 2/  
Silamar Ferraz 3/

## 1. INTRODUÇÃO

Decorridos oito anos após a primeira constatação, no Estado do Pará, da enfermidade das raízes e da base do caule da pimenta-do-reino, provocada por *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (1), foi observada uma modalidade de ataque caracterizada pelo secamento dos ramos, ocorrendo em qualquer parte da folhagem, nos quais o fitopatógeno estava associado (1).

No ano de 1973, sobre a casca dos ramos necrosados, foram observadas estruturas do estágio perfeito, ao lado de esporodóquios da fase assexual de ocorrência mais comum. As frutificações do estágio sexual, constituídas de peritécios vermelhos, isolados ou gregários, que contrastam com o tecido morto de tonalidade escura, têm sido consideradas, em trabalhos mais recentes, como pertencentes à espécie *Nectria haematococca* (2, 3, 5, 9, 10, 17).

MATUO e SNYDER (13) fazem referências a algumas "formae especiales" de *F. solani* que desenvolvem peritécios na planta hospedeira ou em cultivos purificados de laboratório. Não relataram nenhuma com capacidade de infectar os tecidos da pimenta-do-reino, ou outra espécie botânica afim.

No presente trabalho, foram estudadas as principais estruturas do estágio perfeito, considerando suas características morfológicas (2, 9). Determinaram-se condições fisiológicas relacionadas com luz, temperatura e nutrição adequadas ao desenvolvimento de peritécios em meios de cultura. Ensaios de inoculação foram efetuados para avaliar a patogenicidade de

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 - EMBRAPA - Pesquisador bolsista do CNPq.

3/ Professor adjunto da Universidade Federal de Viçosa.

isolamentos obtidos a partir de esporos e frutificações do estágio sexual, no hospedeiro e em outras espécies de plantas em que já foram constatadas espécies de *F. solani*, associadas ou não ao estágio perfeito.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Características Morfológicas

As principais estruturas do fungo, formadas em partes do tecido infectado do hospedeiro e em meios de cultura, foram montadas em lâminas com água, glicerina 0,15% ou Azul de Amann. As medidas foram tomadas com auxílio da lente ocular micrométrica (10x), empregando-se objetiva de 10x para medir as frutificações e de 40x para as demais estruturas. Obtiveram-se dados de forma, tamanho, coloração e, no caso dos esporos, número de septos foi também anotado. Para exame dos primórdios de peritécios e de conidióforos, sustentando macroconídios e microconídios, foram preparadas microculturas em batata-dextrose-ágar, a 2%, e batata-sacarose-ágar, com 1% de sacarose.

Os clamidósporos formaram-se em água destilada, colocando-se pequenas porções da colônia do fungo desenvolvida em batata-dextrose-ágar, em gotas, em lâminas escavadas mantidas em câmara úmida.

As culturas estoques foram mantidas em tubos inclinados de ágar simples, a 2%, em água destilada. Após a repicagem, permaneceram em ambiente de laboratório, expostos à luz indireta, durante 20 dias. Foram conservadas em temperatura de 4-5 graus centígrados. Nestas condições, durante 24 meses, considerando os resultados obtidos nos ensaios experimentais, as culturas permaneceram viáveis, sem apresentar variações acentuadas na morfologia e na patogenicidade.

### 2.2. Ensaios de Patogenicidade

#### *Inoculação em Estacas*

Para avaliar a patogenicidade de isolamentos monospóricos, provenientes de ascósporos ou de macroconídios, foram feitos testes rápidos, que consistiram na inoculação de estacas com 12-15 cm de comprimento por 4-6 mm de diâmetro, possuindo 4-6 entrenós, tecidos consistentes, casca ainda verde, por vezes apresentando leve suberificação. O método consistiu em fazer, em um entrenó, próximo à extremidade basal da estaca, pequeno ferimento longitudinal de 0,5 a 1 cm de comprimento, no qual foi introduzida porção da cultura do fungo proveniente de um único esporo, com 15-20 dias de idade, desenvolvida em batata-dextrose-ágar, a 2%. Após a inoculação, as estacas permaneceram em câmara de crescimento a 20°C e 24°C, com a extremidade em contato com algodão umedecido em tubos de ensaio grandes ou imersa em 40 ml de água em erlemeyer de 250 ml, quando deixadas em ambiente de laboratório.

Com a finalidade de comparar a patogenicidade de 3 isolamentos, um proveniente do Estado do Pará (AP<sub>9</sub>) e dois do Estado do Espírito Santo (ES<sub>2</sub>C e ES<sub>2</sub>D), foi realizado um ensaio de inoculação em 40 estacas. Cada isolamento foi inoculado em 10

estacas, que foram colocadas em tubos de ensaio com algodão umedecido e levadas para câmara de crescimento a 24°C. As outras serviram de testemunhas, sendo aplicado nas incisões apenas porções do meio, sem o fungo. Quinze dias depois, as áreas infectadas e os ferimentos que não receberam inóculo foram medidos, avaliando-se a área do retângulo circunscrito.

#### *Inoculação em Folhas Destacadas*

Outro ensaio, visando a avaliar o grau de patogenicidade dos 3 isolamentos monospóricos, obtidos no Estado do Pará (AP9) e Espírito Santo (ES<sub>2</sub>C e ES<sub>2</sub>D), foi desenvolvido em 17 folhas destacadas, em estágio avançado de maturidade. Destas, 14 foram inoculadas, e 3 serviram de testemunhas. Na face dorsal foram feitas, com uma agulha, 6 perfurações. Sobre cada uma colocou-se pequena porção da cultura do fungo desenvolvido em BDA, com aproximadamente 1 mm de diâmetro, de maneira que em cada folha ficaram inóculos alternados de dois isolamentos. As testemunhas receberam apenas os ferimentos. As folhas foram mantidas em câmara úmida, em placas de Petri, com 15 cm de diâmetro, as quais foram colocadas em câmara de crescimento a 24°C. Os dados foram obtidos oito dias após a inoculação.

#### *Inoculação em Caule e Raízes de Mudanças*

A fim de verificar se os isolamentos obtidos da parte aérea atingiam as raízes, e se aqueles provenientes do sistema radicular tinham a capacidade de causar infecção nos ramos, foram realizados alguns ensaios de inoculação.

#### *Inoculação em Raízes e Caule Separadamente*

Foi preparada suspensão de macroconídios do isolamento 21, obtido pelo plantio direto em ágar de peritécio desenvolvido em ramo infectado. Para o preparo da suspensão, o isolamento foi cultivado em meio constituído de 2 folhas de pimenta-do-reino, com a porção basal imersa em 30 ml de água, em tubo de ensaio grande, e esterilizadas em autoclave, por 20 minutos. Com colônias de 12-15 dias de idade, preparou-se a suspensão com 80.000 esporos por mililitro, imergindo nesta, durante 5 minutos, raízes de 20 mudas de pimenta-do-reino, com 5 meses de idade, obtidas de sementes desenvolvidas em vermiculite, com solução de adubo foliar comercial complementada com solução de Hoagland. A contagem dos macroconídios foi feita ao microscópio em gotas uniformes distribuídas em lâminas com uma micropipeta automática. As raízes das 20 mudas testemunhas foram mergulhadas na solução do meio em água. Após a imersão das raízes na suspensão de macroconídios e no meio diluído em água, as mudas foram transplantadas para solo esterilizado, distribuído em vasos.

Porções de cultura em BDA do isolamento TB-1, proveniente de raízes infectadas foram introduzidas em ferimento longitudinal, com cerca de 0,5 cm de comprimento, feito em um entrenó do ramo de crescimento de 15 mudas desenvolvidas em solo distribuído em vasos. Nas mudas testemunhas, que foram feridas de modo idêntico, colocou-se apenas porção do meio sem o fungo, na incisão praticada.

### *Inoculação em Mudanças Plantadas aos Pares*

O solo esterilizado foi distribuído em 40 recipientes com capacidade de um litro. Em cada um foram plantadas duas mudas originárias de sementes. Cinco meses depois, uma das mudas de cada recipiente foi inoculada no caule, com o isolamento 21, pelo método descrito no item anterior, em entrenô situado de 8-10 cm acima do nível do solo. Quando se desenvolveram as lesões avançadas, 12-15 dias depois, cortou-se o caule abaixo da área infectada, em 20 mudas. Nas demais, a infecção continuou avançando em direção às raízes.

### *Inoculações em Outras Espécies de Planta*

Outras espécies de planta em que já foram constatadas formas patogênicas de *F. solani*, associadas ou não ao estágio perfeito *N. haematococca* (*Hypomyces solani*), foram inoculadas com o isolamento 21 de *N. haematococca* f. sp. *piperis*.

Vinte mudas de cada uma das espécies de plantas testadas, feijão, abóbora, ervilha e batatinha, foram inoculadas em incisão feita no caule. Nas plantas testemunhas praticaram-se incisões idênticas, porém não se aplicou o inóculo. Embora não tenha sido constatada forma patogênica do fungo em soja, inocularam-se, também, mudas desta planta, pois o extrato e porções de partes vegetais constituem meio de cultura adequado ao desenvolvimento do estágio perfeito do fungo. Como a forma *F. solani* f. *pisi* é a que possui maior variação de hospedeiros, inocularam-se mudas de ervilha com a forma patogênica da pimenta-do-reino por outros processos. Cultivaram-se mudas em solo previamente infestado com suspensão de esporos, e fez-se atomização na folhagem com suspensão de macroconídios. Nos tratamentos testemunhas incluíram-se também as mudas de pimenta-do-reino, as quais foram tratadas pelos mesmos processos aplicados nas plantas testadas.

### *Avaliação do Poder Infectivo de Ascósporos*

O meio BSA (batata + sacarose + ágar), a 1% de sacarose, foi distribuído em placas de Petri. Após a repicagem de porções do micélio do isolamento 21, com mistura dos fatores de compatibilidade, as placas foram levadas para câmara de crescimento a 24°C, com período de luminosidade de 12 horas, alternando com igual período de escuridão. Depois de 25-30 dias, inúmeros peritécios exudaram massas de ascósporos que formaram massa gelatinosa em volta do ostíolo. Com um estilete, retiraram-se estas massas para preparar suspensão de ascósporos com 10.000 esporos por mililitro. Fez-se a atomização desta suspensão na folhagem de 20 mudas de pimenta-do-reino com um atomizador De Vilbiss nº 15, colocando-as, depois, em câmara úmida, durante 96 horas. Dez mudas atomizadas com água foram usadas como testemunhas, para comparação.

### *2.3. Características Fisiológicas*

#### *Germinação de Macroconídios e de Ascósporos*

Foram preparadas suspensões de macroconídios e de ascóspo-

ros em água destilada. Ambas as suspensões foram obtidas de culturas do isolamento 21, desenvolvidas em ágar-porção de ramo de pimenta-do-reino. Colocaram-se 6 gotas de cada suspensão por lâmina. Foram preparadas 5 lâminas de cada suspensão. As lâminas permaneceram em câmara úmida constituída de placas de Petri, com papel de filtro umedecido, as quais foram levadas para câmara de crescimento a 24°C. De hora em hora, procederam-se às observações ao microscópio, com aumento de 100x e 400x para determinar o início de germinação, observando-se 100 esporos por gota.

#### *Desenvolvimento de Peritécios em Meios de Cultura*

##### *Influência da Luz Natural e Artificial*

Foram utilizados no ensaio 60 tubos de 18 x 200 mm dos meios batata-sacarose-ágar, a 1% de sacarose, e porção de pecíolo de soja-ágar, distribuindo-se 15 ml por recipiente. Os pedaços de pecíolo de soja tinham, em média, 75 mm x 1,5 - 2 mm e pesavam, em média, 202 mg. Sob a binocular, transferiu-se um dos peritécios desenvolvidos em placa de BSA para cada tubo. Dez tubos de cada meio foram expostos à luz solar indireta, colocando-se próximo de uma janela do laboratório. A temperatura variou de 22°C a 28°C, permanecendo entre 23°C e 25°C, durante a maior parte do tempo. Igual quantidade de tubos foi levada para câmara de crescimento FORMA SCIENTIFIC, Modelo 24, a 24°C. Foram colocados em prateleiras a 10 cm de distância de 2 lâmpadas fluorescentes F 15T 12 C/W, 15 W, reguladas para fornecer período de luz de 12 horas, alternando com igual período de escuridão. Em ambos os tratamentos, as testemunhas consistiram em 10 tubos de cada meio, envolvidos com plástico preto, ficando apenas com os tampões de algodão expostos. A contagem dos peritécios de cada tubo, sob a binocular, foi feita 30 dias após, a contar da data da repicagem.

##### *Influência da Temperatura*

No ensaio inteiramente casualizado, com 15 repetições, foram testadas 4 temperaturas diferentes. Como foram feitas contagens de peritécios aos 10 e 30 dias prepararam-se 30 tubos por tratamento.

O meio escolhido foi o constituído de pedaço de pecíolo de soja, em 15 ml de ágar, a 2%, por tubo de 200 mm x 18 mm, pH inicial de 6,5, sendo a correção feita com KOH, a 4%. Para a escolha deste meio, levou-se em consideração que os peritécios são distintos, facilitando a contagem, pois não se desenvolvem muitas hifas aéreas. Cultura do isolamento 21 desenvolvida em placas de batata-sacarose-ágar, a 1%, foi utilizada para produção dos peritécios que foram transferidos sob a binocular, isoladamente, para cada tubo.

O período de desenvolvimento, durante 30 dias, ocorreu em câmaras de crescimento em condições semelhantes às descritas no teste de diferentes meios de cultura, à exceção das diferentes temperaturas. O ensaio foi desenvolvido em duas etapas. Na fase inicial foram testadas as temperaturas de 16°C e 24°C; em seguida, de 20 e 28°C. Fizeram-se contagens dos peritécios aos 10 e 30 dias após a repicagem. Eliminaram-se 15 tubos de

cada tratamento depois da obtenção do total de peritécios formados aos 10 dias.

### *Produção de Peritécios em Diferentes Meios de Cultura*

Foram testados 11 meios de cultura em um ensaio inteiramente casualizado, com 15 repetições, visando a selecionar substratos adequados ao desenvolvimento de peritécios do fungo. Avaliou-se, também, a quantidade destas frutificações em ágar simples à mesma concentração. Os meios em que o fungo se desenvolveu foram preparados pelo método convencional de adição de ágar em quantidade adequada à solidificação de um litro de água destilada. BDA (batata 200 g, dextrose 20 g, ágar 20 g). BSA (batata 200 g, sacarose 10 g, ágar 20 g). GDA ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 g, ácido glutâmico 2 g, dextrose 10 g, ágar 20 g). APEs (pedaços de pecíolo de soja 75 mm x 1,5-2 mm, pesando, em média, 202 mg, ágar 20 g). ACPR (pedaços de ramos tenros de pimenta-do-reino, medindo 75 mm x 3,5-4 mm, com peso médio 1.300 mg, ágar 20 g). AEFS (extrato obtido de 50 g de folhas de soja, ágar 20 g). AEFPR (extrato obtido de 50 g de folhas de pimenta-do-reino, ágar 20 g). AM (fubá de milho 20 g, ágar 20 g). AP (peptona 5 g, dextrose 20 g, ágar 20 g). AD (dextrose 20 g, ágar 20 g). A (ágar 20 g).

Antes da esterilização em autoclave, durante 20 minutos, o pH dos meios foi elevado para 6,5, pela adição de gotas de KOH, a 4%.

Foram distribuídos 15 ml do meio por tubo de 200 mm x 18 mm.

Depois de esterilizados, os tubos foram inclinados. Fez-se a transferência sob a binocular. Para cada tubo transferiu-se um peritécio do isolamento 21, formado em placas de BSA. Após a repicagem, os tubos foram levados para câmara de crescimento FORMA SCIENTIFIC, Modelo 24, com temperatura de 24°C, regulada para fornecer período de 12 horas de luminosidade, alternado por um período igual de escuridão. Ficaram dispostos em prateleiras com superfície inclinada voltada para lâmpada fluorescente F 15T 12 C/W, 15 W, a 10 cm de distância da fonte de luminosidade. A contagem dos peritécios foi feita sob a binocular, 30 dias após, a contar da data de repicagem.

## 3. RESULTADOS

### *3.1. Características Morfológicas*

Em *N. haematococca* f. sp. *piperis*, os primórdios de peritécios são originários de hifas laterais, septadas, com extremidade em espiral. Quando prontos para a fertilização, são globosos, vermelhos, medindo 28-43 micra de diâmetro.

Os peritécios com 120-230 micra de diâmetro são irregularmente globosos, vermelhos, no início, e finalmente de tonalidade pardo-clara, isolados ou gregários, de aspecto gelatinoso, com parede externa rugosa. Desenvolvem-se no tecido hospedeiro e em meios de cultura (Figuras 1A, B).

Os ascos com 63-72 x 7-10 micra, cilíndricos, depois se tornam clavados, possuindo ápice arredondado, com um poro.

Ascósporos, com 11-15 x 5-7 micra, originalmente são monósticos, tornando-se dísticos. Elipsóides para obovóides, hialinos, no início, depois adquirem coloração ligeiramente parda.

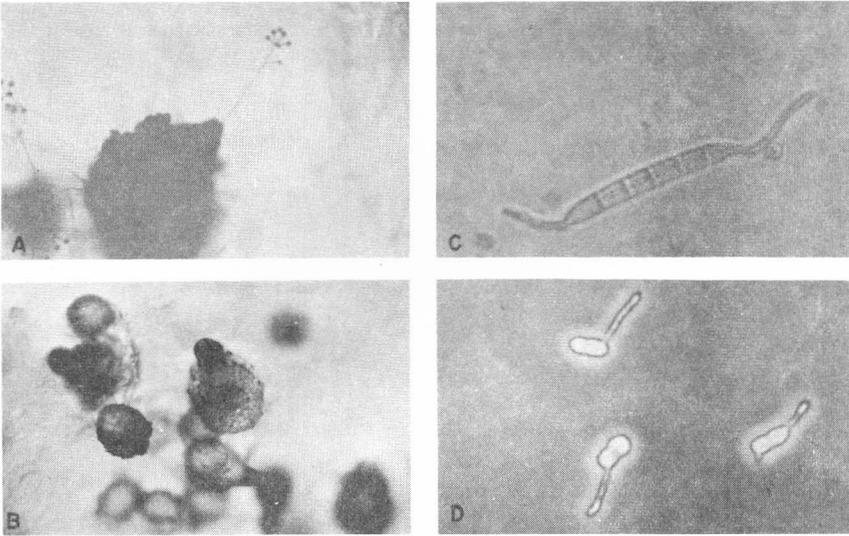


FIGURA 1 - (A) Peritécio desenvolvido em ágar simples ao lado de conidióforos ramificados (200x). (B)- Peritécios formados em batata-sacarose-ágar. Distingue-se massa gelatinosa de ascósporos em volta do ostiolo (100x). (C)- Macroconídio com cinco septos, germinando em água (65x). (D) - Ascósporos, germinando em água (500x).

Apresentam constrictões à altura do único septo transversal, localizado próximo ou na parte central do esporo (Figura 1 D). Quando maduros, apresentam estrias longitudinais que são vistas em preparações em água, quando examinados com objetiva de imersão em óleo. Em cultura, depois da liberação, os ascósporos formam massa gelatinosa em volta do ostiolo, a princípio esbranquiçada, tornando-se pardacenta alguns dias depois (Figura 1 B).

O tamanho dos macroconídios varia com o isolamento. Os que acarretam o secamento dos ramos da pimenta-do-reino mediram, em média, 36-61x4-6 micra. Estes esporos são hialinos, falcados, 3-6 septos transversais. Em meio batata-sacarose-ágar, após 25 dias de desenvolvimento com exposição à luz, a maioria dos macroconídios possuíam 5 ou mais septos (Figura 1 C), característica que permite classificar a "forma especialis" *F. solani* f. sp. *piperis* no grupo A, proposto por MATUO e SNYDER (13).

Microconídios 3-16 x 2-4 micra, unicelulares, hialinos, elíticos ou alantóides. Alguns microconídios em culturas velhas podem apresentar 1 ou 2 septos.

Os conidióforos são variáveis em tamanho. No tecido hospedeiro, os esporóforos que originam macroconídios desenvolvem-se em esporodóquios. Em cultura, podem ser isolados, retos, com ou sem ramificações (Figura 1 A), ao passo que os que

originam microconídios não apresentam ramificações.

Clamidósporos 9-11 x 8-10 micra intercalares ou terminais, isolados ou em cadeia, quando isolados, apresentam 1 ou 2 células, hialinas, de parede espessa.

### *3.2. Ensaio de Patogenicidade*

#### *Inoculação em Estacas*

Os isolamentos mais patogênicos acarretaram infecção progressiva, que surgiu 6-8 dias após a inoculação. Em volta dos ferimentos em que foi introduzido o inóculo, desenvolveu-se lesão de tonalidade escura. Acima e abaixo da área lesada escurificada, a casca apresentou sintomas de intenso amarelecimento (Figura 2 A). Em ambiente úmido, a 24°C, o enegrecimento dos tecidos estendeu-se por toda a estaca, no período de 25-35 dias. Foram encontrados 78 isolamentos com estas características de patogenicidade, todos provenientes do Estado do Pará. Em temperatura de 20°C, o avanço da infecção foi mais lento.

Quando a infecção se restringia ao ferimento praticado, ou à pequena área em redor da incisão, o isolamento foi considerado de menor poder patogênico (Figura 2 A). Com este tipo de patogenicidade mais reduzida, obtiveram-se 6 isolamentos de sistemas radiculares de pimenteiras, coletados no Estado do Espírito Santo. Nas testemunhas, em todos os ferimentos em que foram colocadas porções do meio, sem o fungo, ocorreu regeneração dos tecidos.

No Quadro 1 são apresentadas as médias das áreas de infecção provocadas pelos isolamentos AP<sub>9</sub>, ES<sub>2</sub>C e ES<sub>2</sub>D inoculados em estacas, em relação ao tratamento testemunha. O isolamento AP<sub>9</sub> apresentou maior poder patogênico, considerando-se o avanço de infecção em parte do caule com os tecidos quase maduros (Figura 2 A).

#### *Inoculação em Folhas Destacadas*

Oito dias após a inoculação, as lesões provocadas pelo isolamento AP<sub>9</sub> mediram, em média, 9 mm de diâmetro, enquanto as resultantes da inoculação dos isolamentos ES<sub>2</sub>C e ES<sub>2</sub>D atingiram 2 e 3 mm, na média (Figura 2 B).

#### *Inoculação em Caule e Raízes de Mudas*

As mudas que tiveram as raízes imersas em suspensão de macroconídios começaram a apresentar sintomas de murcha das folhas e partes tenras do caule 7-10 dias após o transplante para o solo esterilizado. Algumas folhas mais maduras tornaram-se amareladas e caíram prematuramente. Em algumas plantas, ocorreu queda dos entrenós mais próximos da extremidade do ramo de crescimento. Decorridos 20-30 dias após a inoculação, desenvolveu-se, na zona do coleto, um apodrecimento dos tecidos de tonalidade escura que, em várias plantas, evoluiu até 2-4 cm acima da superfície do solo. O sistema radicular apresentava degeneração dos tecidos na maioria das raízes.

As plantas do tratamento testemunha continuaram a desenvolver-se normalmente.

Nas incisões do caule que receberam o inóculo desenvolve-

ram-se, 10-15 dias depois, lesões de tonalidade escura, semelhantes às observadas em estacas no laboratório. Nos ferimentos em que foram aplicadas apenas porções do meio esterilizado, ocorreu regeneração por meio de camadas de tecido suberificado.

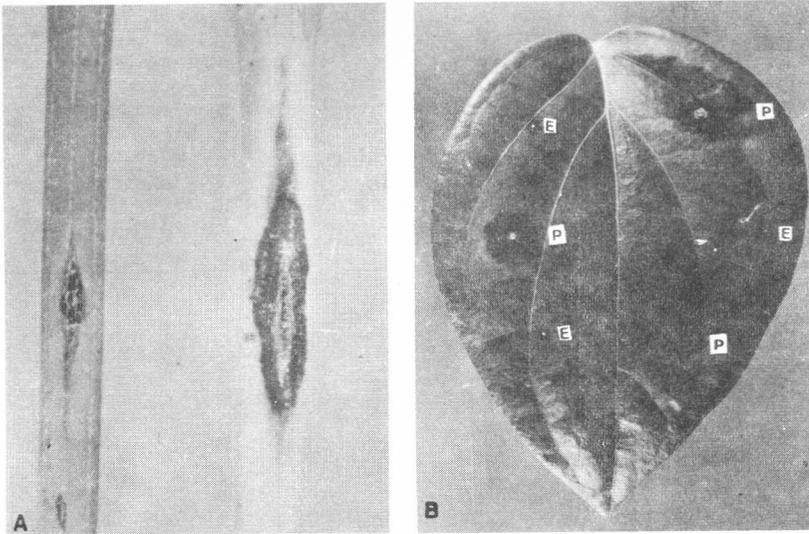


FIGURA 2 - (A) À esquerda, estaca inoculada com isolamento do Estado do Espírito Santo. A outra, com isolamento do Estado do Pará. (B) Folha inoculada com (E) isolamento do Estado do Espírito Santo e (P) do Estado do Pará.

#### *Inoculação em Mudanças Plantadas aos Pares*

No tratamento em que se deixou a infecção avançar em direção às raízes, a muda plantada ao lado começou a apresentar sintomas de murcha 40-50 dias após o início do ensaio (Figura 3). Dez a vinte dias após o início da murcha, surgiu o apodrecimento na região do coleto, que evoluiu por todo o caule. Como o isolamento 21 possuía mistura de fatores de compatibilidade após a formação de esporodóquios desenvolveram-se peritécios na região do coleto ou próximo desta, depois do apodrecimento dos tecidos, tanto nas mudas em que a inoculação foi feita diretamente no caule como naquelas em que o patógeno penetrou em razão do contacto das raízes.

No tratamento em que o caule das mudas foi cortado abaixo da área infectada, ocorreu brotação das gemas laterais. A muda, ao lado, em cada recipiente, continuou com desenvolvimento vigoroso.

QUADRO 1 - Área das lesões em estacas de pimenta-do-reino inoculadas com três isolamentos de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. Viçosa, MG, 1975

Dias após inoculação	Área da lesão, em cm <sup>2</sup> *			Teste- munha
	Isolamentos**			
	ES <sub>2</sub> C	ES <sub>2</sub> D	AP <sub>9</sub>	
6	0,31	0,28	1,09	0,1
15	0,35	0,33	15,89	0,1

\* Área do retângulo circunscrito.

\*\* ES<sub>2</sub>C e ES<sub>2</sub>D, provenientes do Estado do Espírito Santo.

AP<sub>9</sub>, proveniente do Estado do Pará, município de Apeú.

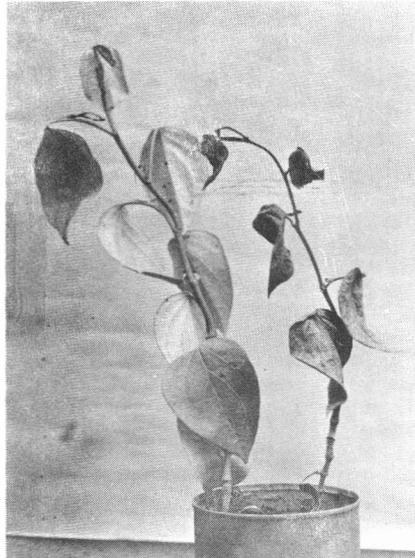


FIGURA 3 - A muda à direita foi inoculada no caule. A outra começou a apresentar sintoma de murcha cinquenta dias após, provavelmente em razão do contacto com as raízes infectadas.

*Inoculação em Outras Espécies de Planta*

O fungo *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* não ocasionou infecção em nenhuma das mudas de feijão, abóbora, ervilha, batatinha e soja, inoculadas com estruturas do patógeno. A inoculação nas mudas de pimenta-do-reino ocasionou o desenvolvimento dos sintomas da enfermidade, comprovando a especificidade do isolamento empregado à pimenta-do-reino.

*Avaliação do Poder Infeccioso de Ascósporos*

Nas mudas em que foram feitas atomizações de suspensão de ascósporos ocorreram infecções que surgiram nas folhas e, principalmente, no caule (Figura 4), semelhantes àquelas provocadas por micélios originários de macroconídios (Figura 4 B). Em algumas plantas, verificou-se a queda do entrenó infectado. Na região exposta do nó, observaram-se pontos enegrecidos, em razão do processo de infecção resultante da invasão dos vasos por hifas de fungo patogênico (Figura 4 B).

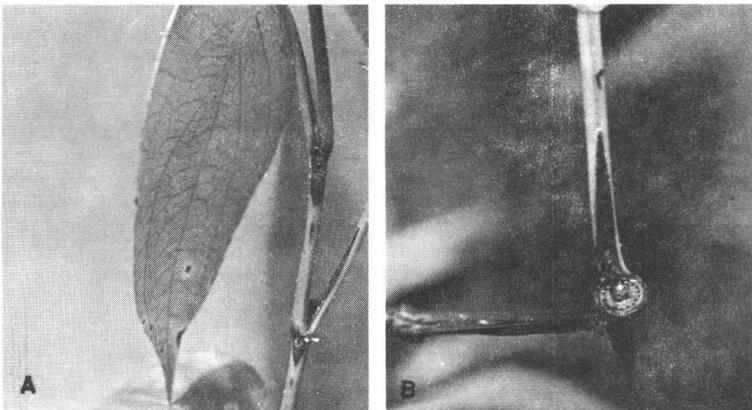


FIGURA 4 - Lesões resultantes da inoculação por atomização de suspensão de ascósporos. (A) Lesões no caule e na folha. (B) Área exposta do nó apresenta vasos enegrecidos, após a queda da extremidade do caule infectado.

Decorridos 10-15 dias após a inoculação, desenvolveram-se esporodóquios com macroconídios típicos de *F. solani* f. *piperis*. À medida que algumas destas frutificações chegavam ao final do desenvolvimento, surgiam, ao lado, peritécios típicos de *N. haematococca* f. sp. *piperis*, os quais, ao atingirem a maturidade, 25-35 dias depois, sempre a contar da data da inoculação, exsudaram, pelo ostíolo, massa gelatinosa de ascósporos. Não foram observadas, em nenhuma das plantas testemunhas, lesões típicas da enfermidade.

### 3.3. Características Fisiológicas

#### *Germinação de Macroconídios e de Ascósporos*

Mais de 50% dos macroconídios estavam emitindo tubos germinativos 2 horas depois que as lâminas, com gotas contendo os esporos em suspensão, foram colocadas em câmara de crescimento a 24°C. A germinação atingiu 100%, 3 horas após, a contar do início do ensaio.

A germinação dos ascósporos verificou-se depois de 6 horas, alcançando apenas um índice de germinação de 10%. O processo continuou por mais de 48 horas, quando a percentagem de germinação se elevou para 80%.

A maioria dos macroconídios emitiu dois tubos germinativos opostos pelo ápice das células das extremidades (Figura 1 C). Ao contrário, elevada percentagem de ascósporos germinou apenas por uma das células (Figura 1 D). Mesmo em fase mais adiantada de desenvolvimento do tubo germinativo, a outra célula permanecia sem emitir tubo germinativo. Em alguns ascósporos, as duas células emitiram tubos germinativos quase ao mesmo tempo (Figura 1 D), como acontece com as duas células das extremidades da maioria dos macroconídios.

#### *Influência da Luz Natural e Artificial no Desenvolvimento de Peritécios*

No Quadro 2 observa-se que não houve desenvolvimento de peritécios nos tubos dos meios de cultura batata-sacarose-ágar e porção de pecíolo de soja-ágar que permaneceram no escuro. Nos tratamentos em que as culturas foram expostas tanto à luz natural como a lâmpadas fluorescentes, os peritécios desenvolveram-se em quantidade elevada, havendo superioridade do tratamento em que os tubos permaneceram em câmara de crescimento, expostos a lâmpadas artificiais fluorescentes, durante período contínuo de 12 horas por dia.

#### *Influência da Temperatura no Desenvolvimento de Peritécios*

A análise da variância mostrou haver diferença significativa entre diferentes níveis de temperatura, com relação à produção de peritécios. Desenvolvendo-se o teste de Tukey, Quadro 3, encontrou-se que, ao nível de 5% de probabilidade, a 24°C ocorreu desenvolvimento de peritécios em maior quantidade. Em seguida, destacou-se, pela influência na formação de frutificação do estágio ascógeno do fungo, a temperatura de 20°C, que diferiu, estatisticamente, das outras temperaturas testadas. As médias de produção das temperaturas de 16°C e 28°C não apresentaram diferença estatística entre si.

Com o aumento de temperatura de 24°C para 28°C, verificou-se um decréscimo de 66%, aproximadamente, na produção de peritécios por tubo. A elevação de 20°C para 24°C correspondeu a um aumento médio de 53% de peritécios. Portanto, nesta faixa situa-se o ótimo de temperatura para o desenvolvimento de peritécios, devendo a temperatura ótima estar próxima de 24°C (Figura 5).

QUADRO 2 - Influência de luz na formação de peritécios de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. Viçosa, MG, 1975

Meio	Número de peritécios por tubo*		
	Luz		Escuridão
	Natural indireta	Artificial	
BSA	275	296	0
APeS	262	283	0

\* Média de 10 tubos BSA - batata-sacarose-ágar  
APeS - ágar-porção de pecíolo de soja.

QUADRO 3 - Efeito de temperatura no desenvolvimento de peritécios de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. Viçosa, MG, 1975

Temperaturas	Número médio de peritécios por tubo	
	$\log_e^x$	Antilog $_e^x$
24°C	5,70 a	298,90
20°C	4,98 b	145,50
28°C	4,59 c	98,50
16°C	4,30 c	73,70
DMS a 5% - Tukey	0,30	

*Produção de Peritécios em Diferentes Meios de Cultura*

A análise de variância apresentou diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade.

O teste de Tukey, Quadro 4, ao nível de 5% de probabilidade, feito com os dados transformados para  $\log_e^x$ , mostrou que o meio GDA se destacou dos demais, porém não apresentou diferença significativa em relação aos meios BSA, APeS e ACPR. As médias dos meios BSA, APeS, ACPR e AEFS não diferiram entre si.

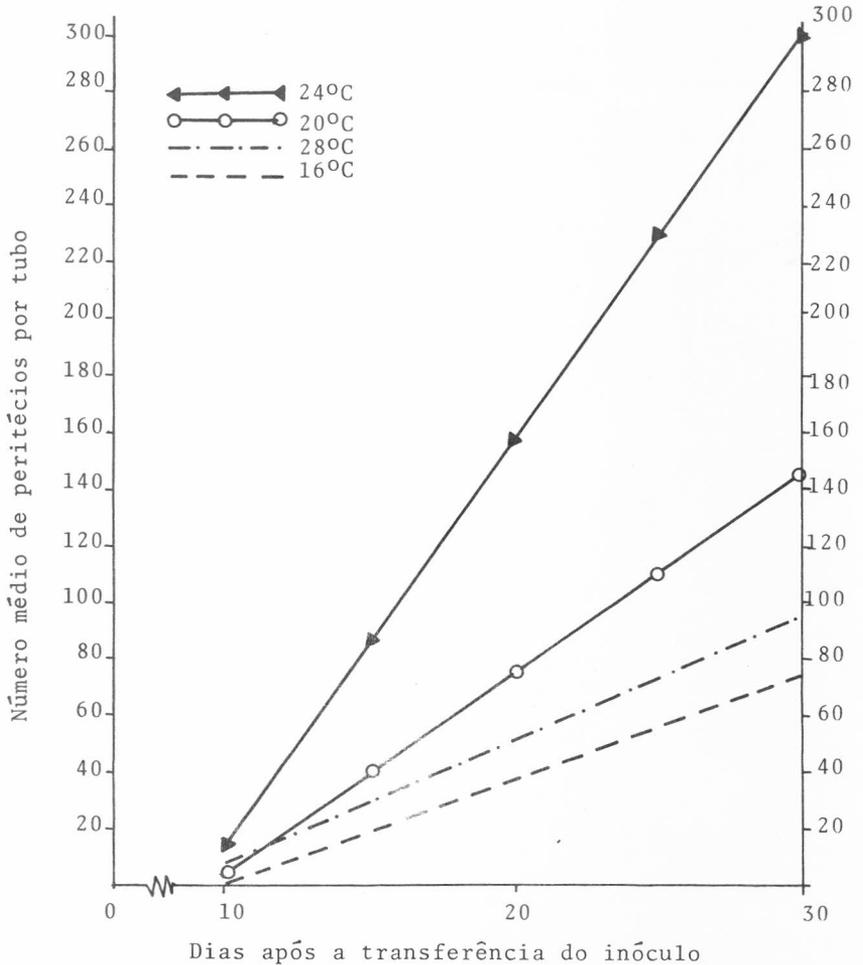


FIGURA 5 - Influência da temperatura no desenvolvimento de peritécios de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*.

Os resultados da produção de peritécios nos meios BDA e AEFPR foram semelhantes. No tratamento AM, a média da frutificação ascógena do fungo foi inferior à obtida em ágar simples.

Nos meios AD e ADP não ocorreu produção de peritécios, não sendo por isto incluídos na análise estatística.

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com a maioria dos micologistas, adotou-se a denominação específica *N. haematococca* para a classificação do estágio perfeito do patógeno (2, 3, 9, 14, 15). A denominação de *Hypomyces solani* passou a ser considerada como sinônima (2, 9, 15).

QUADRO 4 - Produção de peritécios de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* em diferentes meios de cultura

Meios	Número médio de peritécios por tubo	
	Log <sub>e</sub> <sup>x</sup>	Antilog <sub>e</sub> <sup>x</sup>
GDA	4,67 a	290,00
BSA	5,63 ab	278,70
APeS	5,61 ab	273,20
ACPR	5,60 ab	270,40
AEFS	5,38 b	217,00
BDA	5,00 c	148,40
AEFPR	4,38 c	79,90
A	2,02 d	7,50
AM	1,74 e	5,70
DMS a 5% - Tukey	0,25	

- \* GDA - ácido glutâmico-dextrose-ágar  
 BSA - batata-sacarose-ágar  
 APeS - ágar-porção de pecíolo de soja  
 ACPR - ágar-porção de caule de pimenta-do-reino  
 AEFS - ágar-extrato folha de soja  
 BDA - batata-dextrose-ágar  
 AEFPR - ágar-extrato de folha de pimenta-do-reino  
 A - ágar simples  
 AM - ágar-fubã de milho.

As características morfológicas encontradas para *N. haematococca*, patogênica à pimenta-do-reino, coincidem com a espécie associada aos tecidos de várias outras plantas descritas por BOOTH (2). Diferem ligeiramente daquelas descritas por SNYDER e HANSEN (17, 18), quando propuserem novos conceitos de classificação para sistemática das espécies da seção Martiella do gênero *Fusarium* e dos estádios perfeitos correspondentes.

Resultados de testes de patogenicidade permitiram propor a denominação de *F. solani* f. sp. *piperis* à nova "forma especialis" (1). A classificação das "formae speciales" não está regulamentada por nenhuma das regras internacionais da nomenclatura botânica (10).

De acordo com o que é proposto por MATUO e SNYDER (13), o estágio imperfeito *F. solani* f. sp. *piperis* possui características morfológicas do grupo A, o que não é suficiente para distingui-la de outras "formae speciales" da espécie. A patogenicidade, de relativa especificidade a uma espécie de planta ou a grupo de espécies da mesma família, constitui critério de distinção mais seguro (19).

Ascósporos acarretaram infecções na planta hospedeira. Dos tecidos infectados originaram-se esporos da fase imperfeita, e em seguida frutificações típicas do estágio ascógeno. De maneira semelhante, macroconídios deram origem a peritécios que

produziram ascósporos em tecidos infectados de mudas em que foram feitas aspersões de esporos. Não foram observadas diferenças de sintomas entre infecção causada por macroconídios e por ascósporos. Ao contrário do que ocorre em *N. haematococca* isolada da ervilha, os ascósporos da forma patogênica da pimenta-do-reino necessitam de período de tempo maior do que os macroconídios para iniciarem a germinação (9).

Os resultados dos ensaios comprovaram que frutificações de um dos estádios do ciclo de vida do patógeno podem ser originadas por esporos formados no outro estágio, em meio de cultura ou no tecido infectado da planta.

Os ensaios de inoculação em outras espécies de planta deram resultados negativos, o que parece demonstrar que ao contrário de *N. haematococca* (*F. solani*) f. sp. *pisi*, a forma patogênica à pimenta-do-reino parece ter especificidade estreita em relação a plantas hospedeiras.

Com base nestes resultados, é proposta a denominação de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* ao estágio sexual da "forma especialis" patogênica à pimenta-do-reino. Não foi proposta nova variedade, como se adotou na classificação de *N. haematococca* var. *cucurbitae*, atualmente a mais aceita (4, 12, 15), em razão do fato de não terem sido distinguidas características morfológicas que permitissem diferenciar *N. haematococca* f. sp. *piperis* de outras "formae speciales" já descritas em outras espécies de plantas (13). Testes de inoculação com diferentes isolamentos comprovaram que alguns podem infectar indistintamente o caule e as raízes. Porém, outros, obtidos do sistema radicular, não ocasionaram lesões avançadas em tecidos do caule tendendo para maturidade, parecendo ter poder infeccioso mais restrito sobre as raízes mais tenras, em determinadas condições de ambiente. Entretanto, é provável que, mediante mutações e cruzamentos, originem os tipos capazes de infectar os tecidos mais maduros e que atingiriam o caule, onde ocorreria formação de esporos, garantindo a disseminação por meio do vento.

Como acontece com outras "formae speciales" da espécie, a luz estimulou o desenvolvimento de peritécios em *N. haematococca* f. sp. *piperis* (4, 5). Porém, nos tubos com meios de cultura batata-sacarose-ágar e porção de pecíolo de soja-ágar, que permaneceram na ausência de luz, não houve desenvolvimento de nenhum peritécio, o que difere dos resultados encontrados para as formas isoladas da ervilha por QURESHI e PAGE (15), que verificaram a formação de peritécios em meios de cultura em tubos mantidos no escuro.

A temperatura de 24°C foi a mais favorável ao desenvolvimento de peritécios de *N. haematococca* f. sp. *piperis*. Para a "forma especialis" patogênica da abóbora, esta temperatura foi adequada (13, 15). O meio porção de pecíolo de soja-ágar foi escolhido para o teste de temperatura em razão da facilidade de contagem dos peritécios, facilmente distinguidos neste substrato.

HIX e BAKER (11), MATUO e SNYDER (15), QURESHI e PAGE (15) citam os meios ácido glutâmico-dextrose-ágar e batata-sacarose-ágar como adequados ao desenvolvimento de peritécios de *N. haematococca* var. *cucurbitae*. Em relação a *N. haematococca* f. sp. *piperis*, estes substratos também foram altamente favoráveis à formação do estágio perfeito.

Não se verificou desenvolvimento de peritécios aos meios ágar-dextrose-peptona e ágar-dextrose. Em ágar-fubá de milho, a quantidade de frutificações da fase sexual foi menor do que em ágar simples. Provavelmente o desequilíbrio da relação C/N foi o principal fator que impediu ou reduziu o desenvolvimento de peritécios, considerando os resultados obtidos por HIX e BAKER (11), que comprovaram a importância das dosagens de carbono e nitrogênio na formação do estágio ascógeno de *N. haematococca* var. *cucurbitae*.

Porção de pecíolo de soja-ágar constituiu meio adequado. Apresenta a vantagem de formar ascósporos facilmente distinguidos no substrato. A produção de peritécios não diferiu, estatisticamente, da quantidade formada em ácido-glutâmico-dextrose-ágar, que se destacou dos demais meios testados.

## 5. RESUMO

Foi comprovado que *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* é o estágio perfeito de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, agente causador da podridão das raízes e do secamento dos ramos da pimenta-do-reino. O fungo possui peritécios irregularmente globosos, vermelhos, isolados ou gregários, que se desenvolvem no tecido morto da planta hospedeira e em alguns meios de cultura. Ascósporos cilíndricos, ascósporos hialinos, monosseptados. Macroconídios formados em conidióforos livres ou desenvolvidos em esporodóquios, a maioria com 5 ou mais septos. Microconídios unicelulares, hialinos. Clamidósporos intercalares ou terminais, isolados ou em cadeias, com 1 ou 2 células, de parede espessa.

Em água, depois de 3 horas, a germinação dos macroconídios atingiu 100%, ao passo que a dos ascósporos, após 6 horas, alcançou apenas um índice de 10%.

Foram realizados testes de patogenicidade com isolamentos monoascospóricos, monomacroconidiais e com um proveniente de mistura de ascósporos. Os resultados de inoculações em estacas e folhas mantidas em laboratório com os isolamentos AP<sub>9</sub>, ES<sub>2</sub>C e ES<sub>2</sub>D, avaliadas pela medição da área infectada, demonstraram que o isolamento AP<sub>9</sub> possuía maior poder patogênico de que os dois outros. O isolamento 21, obtido de peritécio desenvolvido em ramo infectado, foi capaz de infectar tanto os ramos como o sistema radicular. O isolamento TB-1, proveniente do sistema radicular, teve também capacidade de causar infecção em partes do caule. Entretanto, ES<sub>2</sub>C e ES<sub>2</sub>D, isolados do sistema radicular, praticamente não foram infectivos quando inoculados em ramos. Em mudas plantadas aos pares, quando uma das plantas foi inoculada no caule e a infecção evoluiu até atingir o sistema radicular, a muda, ao lado, apresentou sintomas da enfermidade, provavelmente em razão do contacto com raízes infectadas. Não se observou diferença entre sintomas quando as infecções eram produzidas por ascósporos ou por macroconídios. Inoculações com isolamento patogênico à pimenta-do-reino, em feijão, batatinha ervilha, abóbora e soja, deram resultados negativos.

Os meios de cultura mais favoráveis à produção de peritécios foram GDA (ácido glutâmico-dextrose-ágar), BSA (batata-sacarose-ágar) e APeS (ágar-porção de pecíolo de soja). As frutificações do estágio ascógeno desenvolveram-se somente em

presença de luz. A temperatura de 24°C foi a mais favorável, destacando-se das demais que foram testadas.

## 6. SUMMARY

*Nectria haematococca* f. sp. *piperis* was confirmed to be the perfect stage of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the causal agent of root rot and blight in black pepper. This study presents a description of the sexual reproductive structures of the fungus, data on the effects of culture conditions on development of perithecia, and results of tests of pathogenicity of the fungus to plant species already known to be attacked by *F. solani*.

The fungus has the following characteristics: perithecia irregularly globose, red, isolated or gregarious, formed on dead tissue in the host plant or on some media; asci cylindrical; ascospores hyaline, monoseptated; macroconidia six-celled or more, borne on conidiophores, free or on sporodochia; microconidia 1-celled, hyaline; clamidospores intercalated or terminal, isolated or catenulated, 1 or 2-celled, wall thick.

In water, the macroconidia gave 100% germination in three hours. Only 10% of the ascospores germinated in six hours.

The best media for perithecium production were GDA (glutamic acid-dextrose-agar), BSA (potato-sucrose-agar) and APeS (pieces of soybean petioles in agar). Perithecia were formed only under light, and the best temperature was 24°C.

Pathogenicity tests were made with isolates from the States of Pará and Espírito Santo. Cuttings and detached leaves were inoculated under lab conditions. These isolates showed differences in pathogenicity. One isolate obtained from an infected branch and another from roots were able to attack both branches and roots, which other isolates did not do. When pairs of plants were potted, and one plant in each was inoculated in the stem, the disease reached the roots and, probably due to root contact, the other plant became infected. No differences in symptoms were observed in plants inoculated either with ascospores or macroconidia. Snap bean, potato, pea, squash and soybean plants were inoculated with an isolate pathogenic to black pepper and gave negative results.

## 7. LITERATURA CITADA

1. ALBUQUERQUE, F.C. Pimenta-do-reino. In: *Livro anual de agricultura*. Brasília, Ministério da Agricultura, 1968. p. 215-223.
2. BOOTH, C. *The genus Fusarium*. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1971. 321 p.
3. BOOTH, C. The present status of *Fusarium* taxonomy. *Ann. Rev. Phytopatol.* 13:83-93. 1975.
4. CURTIS, C.R. Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. II. Effects of radiant energy on sexual reproduction. *Phytopathology* 54 (9): 1141-1145. 1969.

5. CURTIS, C.R. Action spectrum of the photoinduced sexual stage in the fungus *Nectria haematococca* Berk. and Br. var. *cucurbitae* (Snyder & Hansen) Dingley. *Plant Physiol.* 49(2):235-239. 1971.
6. DENNIS, R.W.G. *British ascomycetes*. 2nd ed. Lehere, Verlag Von J. Cramer, 1968. 455 p.
7. GORDON, W.L. The taxonomy and habitats of the *Fusarium* species in Trinidad, B.W.I. *Can. J. Botany* 34(6):847-864. 1956.
8. GORDON, W.L. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. *Can. J. Botany* 38(4): 643-658. 1960.
9. HANLIN, R.T. Morphology of *Nectria haematococca*. *Amer. J. Bot.* 58(1):105-116. 1971.
10. HAWKSWORTH, D.L. *Mycologist's handbook*. Kew. Commonwealth Mycological Institute, 1974. 231 p.
11. HIX, S.M. & BAKER, R. Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. I. Influence of carbon and nitrogen. *Phytopathology* 54(5):584-586. 1964.
12. KAPPAS, A. & GEORGOPOULOS, S.G. Independent inheritance of avirulence and dodine resistance in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*. *Phytopathology* 61(9):1093-1094. 1971.
13. MATUO, T. & SNYDER, W.C. Use of morphology and mating populations in the identification of *formae speciales* in *Fusarium solani*. *Phytopathology* 63(5):562-565. 1973.
14. MULLER, E. & von ARX, T.A. Pyrenomycetes: Meliolales, Coronophorales, Sphaeriales. In: AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S., eds., *The fungi. An advanced treatise*. Vol. IV. New York, Academic Press, 1973. p. 87-132.
15. QURESHI, A.A. & PAGE, D.T. Observations on morphological and nutritional aspects of perithecial formation of *Nectria haematococca* and *Hypomyces solani*. *Can. J. Botany* 50(12):2443-2448. 1972.
16. ROGERSON, C.T. The hypocrealean fungi (Ascomycetes, Hypocreales). *Mycologia* 62(5):865-910. 1971.
17. SNYDER, W.C. & HANSEN, H.N. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *Amer. J. Botany* 28(9):738-741. 1941.
18. SNYDER, W.C. & HANSEN, H.N. Species concept, genetics and pathogenicity in *Hypomyces solani*. *Phytopathology* 44(7):338-342. 1954.
19. TOUSSOUN, T.A. & NELSON, P.E. Variation and speciation in the *Fusaria*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13:71-82. 1975.