

METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DE RESISTÊNCIA DA SERINGUEIRA (*Hevea spp.*) A *Phytophthora capsici*.

Álvaro Figueredo dos Santos ⁽¹⁾

Kiyoshi Matsuoka ⁽²⁾

Acelino Couto Alfenas ⁽²⁾

Luiz Antônio Maffia ⁽²⁾

RESUMO: Procederam-se estudos visando o desenvolvimento de metodologia para avaliação de resistência da seringueira a *Phytophthora capsici*. O uso de folíolos jovens e maduros destacados, estes últimos previamente feridos, foi adequado ao propósito previsto, pois os sintomas desenvolveram-se semelhantemente aos nos folíolos presos às plantas. Os folíolos não inoculados mantiveram-se viáveis durante o período de execução dos ensaios. Independentemente da idade dos folíolos e do clone, o período de incubação, período latente e o tamanho das lesões em folíolos destacados foram similares aos observados nos folíolos presos às plantas. No entanto, a produção de esporângios foi maior nos folíolos destacados.

ABSTRACT: A methodology to evaluate resistance of rubber plants to *Phytophthora capsici* was developed. Young, as well, as wounded mature leaflets, inoculated with the pathogen developed disease symptoms to those in undetached leaflets. Uninoculated leaflets stayed viable during the experiments and were considered suitable for screening for resistant clones. Incubation period, latent period, and size of lesions on detached leaflets were similar to those on undetached leaflets, independent of leaf age. Sporangia production was, however, higher on detached leaflets.

Palavra chave: Seringueira, *Phytophthora*, resistência

Key words: Rubber Free, *Phytophthora*, resistance

INTRODUÇÃO

Phytophthora spp. ocorre na maioria das regiões heveícolas, como Índia, Sri Lanka, Malásia, China, Tailândia e Indonésia (Wastie, 1975). No Brasil, além dos seringais da Bahia (Santos, *et al.*, 1989), ocorre na Amazônia (Stein *et al.*, 1985), em São Paulo (Cardoso *et al.*, 1983), no Espírito Santo (Ventura, 1991, Comunicação Pessoal) e em Pernambuco (Melo &

⁽¹⁾ Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental - CPAA - EMBRAPA, Cx. Postal 319, 69011-970, Manaus-AM.

⁽²⁾ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa-MG.

Fonseca, 1984). Entretanto, danos relevantes acontecem apenas nos polos baianos (Pereira *et al.*, 1989; Chee & Kai-Ming, 1985).

Dentre as três espécies patogênicas à seringueira no Brasil, *P. capsici* (Leonian), *P. palmivora* (Butler) e *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian, apenas as duas primeiras ocorrem na Bahia, e *P. capsici* parece ser a mais comum e a mais virulenta (Santos, 1991).

As doenças causadas por *Phytophthora* spp. manifestam-se em toda a parte aérea das plantas e em diferentes épocas de ano (Santos *et al.*, 1989). Em seringais adultos, os ataques do patógeno causam queda prematura de folhas maduras e podridão de frutos e do caule (Chee & Kai-Ming, 1985; Santos *et al.*, 1989). Na Bahia, predomina a queima de brotações novas, sendo que este tipo de sintoma ocorre apenas no Brasil (Chee & Wastie, 1980).

O controle da queima de brotações novas - requeima - na Bahia, tem sido feito, satisfatoriamente, com o uso de fungicidas (Santos *et al.*, 1989). Atualmente esta prática tem sido limitada em razão de seu custo elevado. Dentre as outras alternativas procuradas, o uso de clones resistentes seria a mais viável. Assim, procederam-se estudos visando ao desenvolvimento de metodologia para avaliação de resistência de seringueira a *P. capsici*.

MATERIAL E MÉTODOS

Hospedeiro - As mudas de seringueira dos clones Fx 516 (F 4542 (clone primário de *Hevea benthamiana*)) x AV 363 (clone primário oriental de *H. brasiliensis*) e PB 86 (clone primário de *H. brasiliensis*) foram cultivadas em sacos de plásticos de 20 kg de mistura solo e areia lavada (4:1). A este substrato incorporaram-se por metro cúbico, 3,5 kg de superfosfato simples, 0,5kg de cloreto de potássio e 1,0 kg de calcário dolomítico (Pereira & Pereira, 1986).

Efetuaram-se duas adubações nitrogenadas em cobertura, com sulfato de amônio, 1g/planta/aplicação, uma após a formação do primeiro lançamento foliar (conjunto de folhas emitidas por ramo, numa mesma época) e outra após o segundo (Pereira & Pereira, 1986).

Durante a execução dos ensaios, procedeu-se à decapitação abaixo do penúltimo lançamento, para se obter maior número de plantas com folíolos jovens. Nessa época, adubava-se com macronutrientes (Almeida, 1980) e micronutrientes (Epstein, 1972). As regas e o controle de ácaros foram feitos quando necessários.

Preparo de Inóculos e Inoculação - Utilizou-se o isolado H2, virulento e esporulante, de *P. capsici*. Antes do ensaio, obtiveram-se culturas em crescimento ativo, repicando-se o isolado dos tubos para placas de Petri com BDA e incubando-o a 25°C, no escuro, por 4-5 dias.

Disco de BDA com micélio de *P. capsici* foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de cenoura - ágar (CA). As placas foram distribuídas em prateleiras submetidas à iluminação constante, fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes, 40 Watts luz do dia, colocadas a cerca de 25cm de altura (aproximadamente 2.000 lux) (Urban, 1980). Após 9 dias, adicionaram-se 15ml de água destilada esterilizada em cada placa, que foram mantidas por 20 minutos a 5-8°C e a 25 minutos na temperatura ambiente, para a liberação dos zoósporos (Lawrence & Luz, 1982). A suspensão foi, então, vertida em um béquer. Uma alíquota da suspensão de zoósporos foi submetida à agitação por 60 segundos para encistamento dos zoósporos, em com auxílio de hemacitômetro, ajustou-se a concentração de inóculo para 2×10^5 zoosporos/ml (Santos, 1991).

Inocularam-se tanto folíolos destacados como os aderidos às plantas dos clones Fx 516 e PB 86, em três fases: a) jovens - os folíolos aos 7-8 dias após a emergência foliar, acentuadamente avermelhados; b) intermediários - os folíolos aos 13-15 dias após a emergência foliar, de coloração verde-clara, textura macia e flexíveis; e c) maduros - folíolos aos 55-60 dias após a emergência foliar.

Os folíolos destacados foram colocados em bandejas de vidro (45 x 25 x 4cm), cujo fundo havia sido forrado com papel Germitest umedecido em água destilada. Na inoculação, depositavam-se, sobre a superfície do folíolo, disco de papel de filtro com 5mm de diâmetro, embebidos em suspensão de zoósporos. Nos folíolos usados como testemunhas, depositavam-se disco de papel de filtro embebidos em água destilada. A seguir, aspergia-se água destilada sobre os folíolos inoculados e as bandejas eram fechadas para garantir alta umidade. As bandejas foram deixadas no ambiente de laboratório pelo tempo necessário para a coleta das amostras.

Quando se inoculavam os folíolos presos às plantas, os discos de papel de filtro, com 5mm de diâmetro, embebidos em suspensão de zoósporos, foram depositados na superfície dos folíolos. Após a inoculação, aspergiu-se água sobre os folíolos inoculados, e as folhas inoculadas foram envolvidas em sacos de plástico contendo uma mecha de algodão embebida em água, para manter a umidade até a avaliação.

Para a inoculação, os folíolos maduros foram inicialmente feridos com um conjunto de agulhas, resultando a região em uma área circular com 5mm de diâmetro.

Os discos de papel de filtro utilizados foram retirados 24 horas após a inoculação. Inocularam-se 20 folíolos por tratamento.

Avaliação - Avaliaram-se os seguintes componentes:

- **Período de Inoculação (PI)** - tempo, em horas, desde a inoculação até o aparecimento dos sintomas em área pelo menos igual à inoculada, com disco de papel embebido na suspensão de zoósporos.
- **Período Latente (PL)** - tempo, em horas, desde a inoculação até o aparecimento de 50% das lesões com esporângios. Considerou-se que cada ponto de inoculação com disco de papel com zoósporos resultou em apenas uma lesão.
- **Produção de Esporângios (PE)** - quantificada 72 horas após a inoculação. Os esporângios produzidos foram retirados, lavando-se os folíolos em 10ml de uma solução de álcool a 10%, com auxílio de um pincel. A suspensão obtida foi vertida em um béquer. Foram retiradas, com pipetador automático, 20 amostras de 0,01ml para quantificação dos esporângios em microscópio. Na impossibilidade de serem avaliadas imediatamente, as amostras foram mantidas em geladeira a 5-8°C até a contagem (Umaerus & Lihnell, 1976).
- **Tamanho da Lesão (TL)** - quantificado 72 horas após a inoculação. Para auxiliar a avaliação, preparou-se uma escala diagramática (Figura 1), confeccionada a partir de levantamento preliminar do formato e do tamanho dos folíolos, assim como do formato e do tamanho da lesão, em folíolos inoculados com *P. capsici*. As áreas foliar e lesionada foram inicialmente calculadas com o auxílio de transparência milimetrada

e, depois, aferidas pelo digitador eletrônico Summa Sketch II, acoplado a um microcomputador IBM PS/2, modelo 502.

RESULTADOS

Não houve variação dos componentes estudados entre os clones (Quadros 1 e 2). Nos folíolos jovens, intermediários e maduros destacados, observaram-se reações semelhantes às verificadas nos folíolos aderidos às plantas (Quadros 1 e 2), sem diferença no PI, no PL e no TL. O PI foi de 30 horas nos folíolos jovens, 40 horas nos folíolos intermediários e 30 a 40 horas nos folíolos maduros, enquanto, independentemente da idade e do clone, o PL foi de 48 a 50 horas (Quadro 1).

Em geral, verificou-se maior produção de esporângios nos folíolos destacados, independentemente da idade do folíolo e do clone estudados (Quadro 2).

Os folíolos de quaisquer idade destacados e os não inoculados mantiveram-se viáveis durante toda a execução dos ensaios, enquanto os folíolos jovens inoculados encontravam-se, em geral, com sintomas em toda a área foliar.

DISCUSSÃO

O uso de partes excisadas de plantas em estudos de resistência tem sido relatado por vários autores (Lonsdale *et al.*, 1988; Zilbersteins & Pinkas, 1987; Utkhede & Quamme, 1988; Utkhede, 1986; Phillips-Mora & Galindo, 1989; Tedford *et al.*, 1990; Umaerus & Lihnell, 1976; Tu, 1986). De acordo com Tedford *et al.* (1990) e Tu (1986), este método é rápido, repetível, não destrutivo e pode ser usado em etapas iniciais de seleção, para verificação de resistência a vários patógenos. Neste trabalho, folíolos jovens ou maduros destacados de seringueira foram adequados ao que se propôs, pois os sintomas desenvolveram-se semelhantemente aos nos

folíolos aderidos às plantas. Além disso, durante o período de execução dos ensaios, os folíolos não inoculados mantiveram-se viáveis.

No sistema *P. capsici* - seringueira, independentemente do clone e da idade do folíolo, foi satisfatória a metodologia empregada para quantificar PI, PL e TL em folíolos destacados; no entanto, ocorreram variações na esporulação. Em geral, nos folíolos destacados houve maior produção de esporângios que nos folíolos presos à plantas, provavelmente devido à maior uniformização das condições de incubação.

Diferentes métodos para a inoculação de folhas e de frutos destacados têm sido relatados: pincelamento (Tu, 1986), disco de meio com micélio (Tedford *et al.*, 1990) e atomização de inóculo em área limitada (Umaerus & Lihnell, 1976) ou em toda a folha (Figueiredo, 1990). Neste trabalho, o método de inoculação com discos de papel de filtro foi eficiente, podendo ser útil em futuros ensaios sobre resistência. Nesse método, a retenção de água pelo disco de papel garante a umidade necessária nas fases de pré-penetração e penetração de *Phytophthora*.

CONCLUSÕES

- O uso de folíolos jovens e maduros destacados foi adequado para avaliação de resistência da seringueira a *Phytophthora*, pois os sintomas desenvolveram-se semelhantemente aos folíolos presos às plantas.
- O PI, o PL e o TL em folíolos destacados foram similares aos observados nos folíolos presos às plantas.

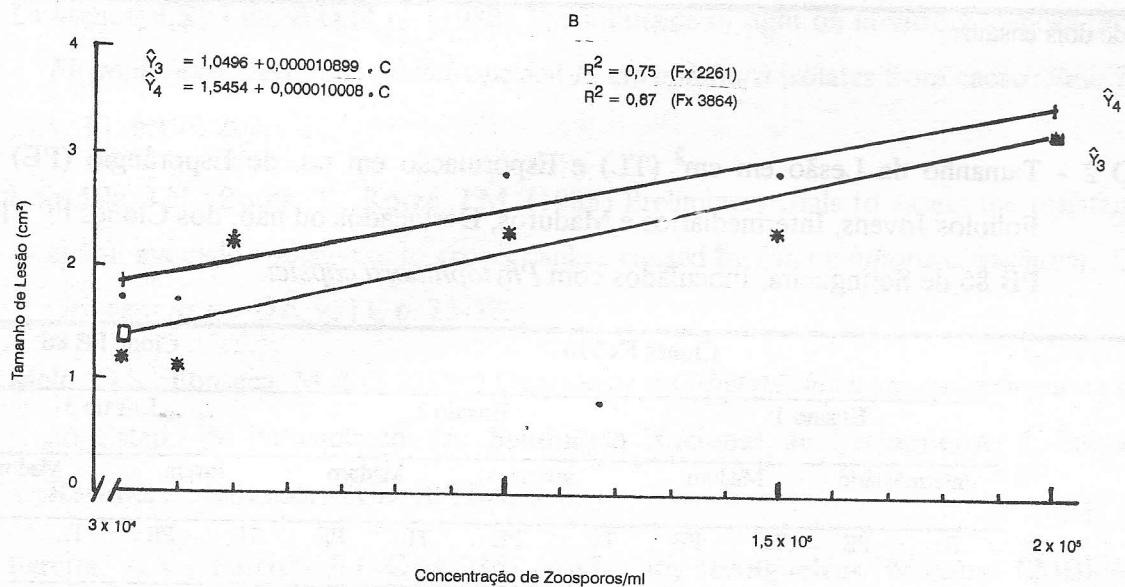
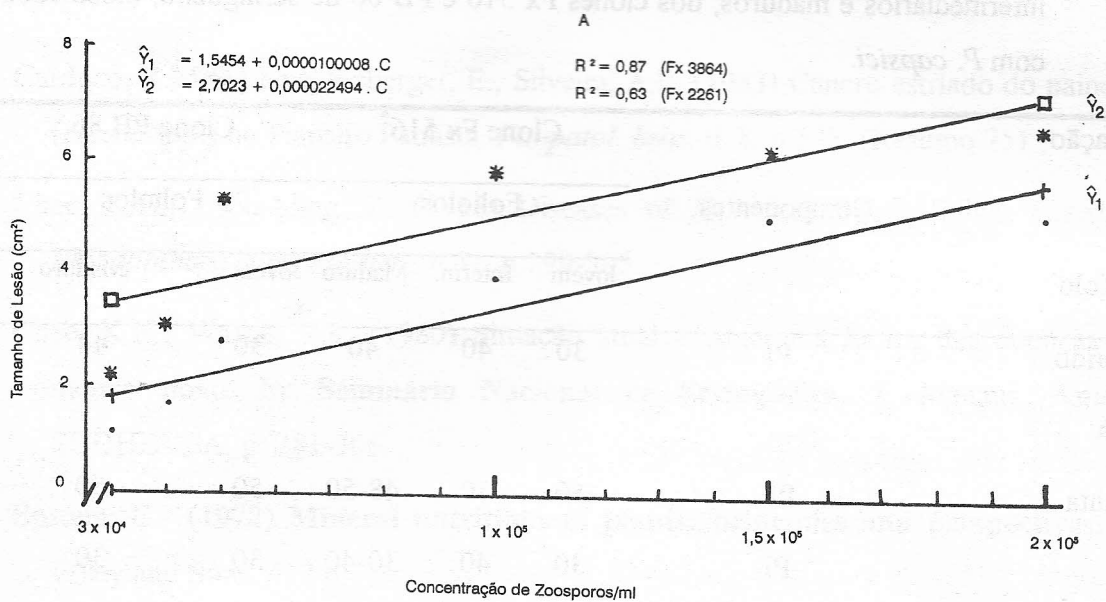


FIGURA 1. Escala diagramática utilizada na avaliação da área foliar lesionada por *Phytophthora* sp. em seringueira (*Hevea* spp.).

QUADRO 1 - Período de incubação (PI) e período Latente (PL), em horas, em folíolos jovens, intermediários e maduros, dos clones Fx 516 e PB 86 de seringueira, inoculados com *P. capsici*.

Situação do Folíolo	Componentes	Clone Fx 516*			Clone PB 86	
		Folíolos			Folíolos	
		Jovem	Interm.	Maduro	Jovem	Maduro
Aderido à Planta	PI	30	40	40	30	44
	PL	50	50	48-50	50	50
	PI	30	40	30-40	30	30
Destacado	PL	50	48	48-50	40	50

(*) Dados de dois ensaios.

QUADRO 2 - Tamanho da Lesão em cm² (TL) e Esporulação em no. de Esporângio (PE) em Folíolos Jovens, Intermediários e Maduros, Destacados ou não, dos Clones Fx 516 e PB 86 de Seringueira, Inoculados com *Phytophthora capsici*.

Situação do Folíolo	Clones Fx 516						Clone PB 86					
	Ensaio 1				Ensaio 2		Ensaio 3					
	Intermediário		Maduro		Jovem		Maduro		Jovem		Maduro	
	TL	PE	TL	PE	TL	PE	TL	PE	TL	PE	TL	PE
Aderido à Planta	5,5a**	10,3a	3,5a	32,5a	4,3a	25,3a	3,2a	8,1a	4,7a	14,2a	3,7a	17,3a
Destacado	5,5a	35,6a	3,9a	41,0a	4,8a	216,0b	3,9a	28,6b	5,1a	146,5b	4,1b	45,5b

(**) Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem a 1% de probabilidade, pelo teste t.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cardoso, R.M.G., Feichtenberger, E., Silveira, A.P. (1983) Cancro estriado do painel seringueira (*Hevea spp.*) no Planalto Paulista. *Fitopatol. bras.* n. 8, p.578. (Resumo 75).
- Chee, K.H., Kai-Ming, Z. (1985) Diseases of *Hevea* in South Bahia, Brazil, caused by *Phytophthora spp.* *Planter.*, v.61, p.299-305.
- Chee, K.H., Wastie, R.L. (1980) Situação atual e panorama futuro das doenças de Hevea o mundo novo. In: **Seminário Nacional de Seringueira**, 3. Manaus. **Anais**. Manaus, SUDHEVEA. p. 281-306.
- Epstein, E. (1972) **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. New York: Wiley and Sons. 412 p.
- Figueiredo, G. de (1973) **Padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de raças de *Colletotrichum lindemuthianum***. Viçosa: UFV. Imp. Univ., 144 p. (Tese M.S.).
- Lawrence, J.S., Luz, E.D.M.N. (1982) The influence of light on in vitro zoospore production by *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* and *P. citrophthora* isolates from cacao. *Rev. Theobroma*. v. 13, p.199-202.
- Lonsdale, J.H., Botha, T., Kotzé, J.M. (1988) Preliminary trials to assess the resistance of three clonal avocado rootstocks to crows canker caused by *Phytophthora cinnamomi*. *SA Avocado Growers Assoc Yrb.* v. 11, p. 35-37.
- Melo, G.S., Fonseca, M.A.C. (1984) Ocorrência de *Phytophthora sp.* em seringueira (*Hevea sp.*) no Estado de Pernambuco. In: **Seminário Nacional da Seringueira**, 4, Salvador, 1984. **Resumos...** Salvador: SUDHEVEA, p. 6.
- Pereira, A.V., Pereira, E.B.C. (1986) **Mudas de seringueiras**. Manaus: EMBRAPA, 52 p. (Circular Técnica, 7).
- Pereira, J.C.R.; Santos, A.F. dos, Albuquerque, P.E.P. (1989) **Doenças incitadas por *Phytophthora spp.* em seringueira (*Hevea spp.*) no Brasil**. CEPLAC. 12 p. (Boletim Técnico, 165).

- Phillips-Mora, W., Galindo, J.J. (1989) Método de inoculação Y evaluación de la resistência a *Phytophthora palmivora* em frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Turrialba*, v. 29, p.488-496.
- Santos, A.F. dos. (1991) **Identificação de *Phytophthora* em *Hevea*, histopatologia e resistência do hospedeiro.** Viçosa: UFV. Imp. Univ., 139 p. (Tese D.S.).
- Santos, A.F. dos, Pereira, J.C.R., Ferreira, F.A. (1989) Doenças da copa da seringueira causadas por *Phytophthora* spp. - requeima e queda anormal das folhas. In: Ferreira, F.A. (ed.). **Patologia Florestal - principais doenças florestais no Brasil.** Viçosa: SIF, p. 314-325.
- Stein, R., Tabosa, S., Nunes, M.A. (1985) Requeima (*Phytophthora* spp.): um novo problema para a heveicultura no Estado do Pará. *Fitopatol. bras.* v. 10, p. 81.(Resumo 82).
- Tedford, E.C., Miller, T.L., Wielsen, M.T. (1990) A detached - leaf technique for detecting resistance to *Phytophthora* para sitica var nicotiana in tabacco. *Plant Dis.* v. 74, p.313-316.
- Tooley, P.W. Variation in resistance to *Phytophthora* infestans among 21 *Solanum verrucosum* plant introductions. *Amer. Potato J.* v. 67, p.491-498.
- Tu, J.C. (1986) A detached technique for screening beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in vitro against anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Can. J. Plan Sci.* v. 66, p.805-809.
- Umaerus, V., Lihnell, A. (1976) A laboratory method for measuring the degree of attack by *Phytophthora* infestans. *Potato Res.* v. 19, p.91-107.
- Urban, A.F. (1980) ***Phytophthora capsici* Leonian, agente etiológico da murcha de *Capsicum annum* L. em Minas Gerais.** Viçosa: UFV. Imp. Univ., 63 p. (Tese M.S.).
- Utkhede, R.S. (1986) In vitro screening of the world apple germplasm collection for resistance to *Phytophthora cactorum* crown rot. *Sci. Hort.* v. 29, p.205-210.
- Utkhede, R.S., Quamme, H.A. (1988) Use of the excised shoot assay to evaluate resistance do *Phytophthora cactorum* of apple rootstock cultivars. *Can, J. Plant Scil.* v. 68, p. 851-857.
- Wastie, M., Pinkas, Y. (1987) Detached root inoculation - new method to evaluate resistente to *Phytophthora* root rot in avocado trees. *Phytopathology.* v. 77, p.841-844.