

CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO *Phytophthora palmivora* X PUPUNHEIRA QUANTO À PATOGÊNESE, HISTOPATOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO

EXTRATO

A podridão do estipe da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunt) é a mais grave doença do cultivo na Bahia. Seu agente causal, *Phytophthora palmivora*, apresenta ampla gama de hospedeiros, entre os quais, cultivos de relevância econômica para o estado da Bahia. Poucas informações existem sobre este patossistema. Os objetivos deste trabalho foram: i. Avaliar métodos de inoculação e concentrações de zoósporos de *P. palmivora*, para utilização em estudos de resistência à doença; ii. Avaliar a necessidade de ferimentos no processo de infecção; iii. Estudar a histopatologia da interação *P. palmivora* x pupunheira ao microscópio eletrônico de varredura (MEV); iv. Selecionar agentes antagônicos com potencial para serem empregados no controle da doença. As variáveis patométricas utilizadas foram: altura da parte aérea, comprimento do sistema radicular, e as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular das plântulas, avaliadas 60 ou 75 dias após as inoculações, sendo os experimentos repetidos uma vez. Para satisfazer o primeiro objetivo, quatro métodos de inoculação foram avaliados: imersão do sistema radicular em 500 mL da suspensão de zoósporos, irrigação do substrato em torno da plântula com 1 mL do inóculo, inundação + irrigação com 1 mL da suspensão de inóculo e irrigação com 30 mL de água, seguida de 2 mL da suspensão do inóculo, nas concentrações zero, 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos/mL. Todos os métodos avaliados provocaram alterações fisiológicas nas plântulas, independente das concentrações de inóculo utilizadas; no entanto, o método de imersão foi o mais drástico. Para avaliação de resistência neste patossistema recomenda-se o método de irrigação em torno do coleto das plântulas com 1 mL da suspensão de zoósporos na concentração de 5×10^5 zoósporos/mL.

Quanto à necessidade de ferimentos para a infecção por *P. palmivora*, plântulas com e sem ferimentos foram inoculadas com os seguintes métodos: inoculação com discos de micélio de 0,7 cm de diâmetro na bainha das folhas; inoculação com gotas (5ZL) de duas concentrações de zoósporos no coleto das plântulas; irrigação do solo com 1, 2 ou 5 mL de duas concentrações de zoósporos em torno do coleto das plântulas, nas concentrações 0 zero; 5×10^5 e 1×10^6 zoósporo/mL, totalizando 28 tratamentos com 10 plântulas/tratamento. Os resultados mostraram que ferimentos não são necessários à penetração do patógeno, mas são importantes na aceleração do processo de infecção em plântulas de pupunheira inoculadas com *P. palmivora*. Cortes foram efetuados 6 e 12 horas após a inoculação, na região do coleto de plântulas, com seis meses de idade, para que fossem feitas observações no MEV. Zoósporos encistados, clamidósporos e esporângios do patógeno aderidos à epiderme das plantas foram observados seis horas após a inoculação. Independentemente da metodologia de inoculação utilizada, foi observada a colonização dos tecidos em todas as plântulas inoculadas. Cinco isolados de *P. palmivora* (401, 524, 859, 870 e 1086) e 40 agentes de biocontrole (BCAs), sendo 39 isolados de *Trichoderma spp.* e um de *Gliocladium virens*, foram confrontados in vitro. O percentual de inibição foi calculado em relação às testemunhas 72 h após o confronto. Treze isolados apresentaram potencial para pesquisas futuras: ES4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B, T61 (*T. harzianum*), TC25 (*T. longibrachiatum*), 64 (*T. piluliferum*), ALF 247 (*T. martiale*), 905 (*T. viride*), 7CC (*T. atroviride*) e TC26 (*T. koningiopsis*), por apresentarem mecanismos de ação via hiperparasitismo e/ou antibiose.

**CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION *Phytophthora palmivora* x
PEACH PALM REGARDING PATHOGENESIS, HISTOPATHOLOGY AND
BIOLOGICAL CONTROL**

ABSTRACT

The heart rot of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunt) is the most serious disease of this cultivation in Bahia. Its causal agent, *Phytophthora palmivora*, presents a wide host range including economically important crops for the state of Bahia. There is little information about this pathosystem. The objectives of this work were: i. to evaluate inoculation methods and inoculum concentrations of *P. palmivora*, for use in disease resistance trials; ii. to assess the need of injuries in the infection process; iii. to study the interaction *P. palmivora* x peach palm with the aid of scanning electronic microscopy (SEM); iv. to select antagonistic agents to control the disease. The pathometric variables used were: canopy height, root system height and fresh and dried weights of seedlings canopy and root system 60 or 75 days after the inoculation. All experiments were carried out in duplicate. To achieve the first objective four inoculation methods were tested: immersion of the root system in 500 mL of the zoospores suspension; irrigation of the substrate around the seedlings with 1 mL of the inoculum; flooding + irrigation with 1 mL of the inoculum suspension; and irrigation with 30 ml of water, followed by 2 mL of the inoculum suspension at the concentrations of 0 (zero), 5×10^4 , 1×10^5 and 5×10^5 zoospores/mL. All methods caused physiological alterations in seedlings, independent of the inoculum concentration used; however, the root system immersion method was the most drastic. To assess resistance in this pathosystem is recommended the method of irrigation around the root collar of seedlings with 1 mL of the inoculum suspension of 5×10^5 zoospores/mL. To investigate the need of injury to the infection by *P. palmivora*, seedlings with and without injuries were inoculated with: 0.7 cm mycelial discs in the sheath of the leaves; drops (5ZL) of two zoospores concentrations on the root collar of the seedlings;

irrigation of the soil with 1, 2 or 5 mL of three zoospores concentrations (0 (zero); 5×10^5 and 1×10^6 zoospore/mL) around the root collar of the seedlings, totaling 28 treatments with 10 seedlings/treatment. Injuries are not necessary to pathogen penetration, but favor the infection process velocity in peach palm seedlings inoculated with *P. palmivora*. Sections of the root collar region of six months old seedlings of peach palm were made six and 12 hours after inoculation and observed under SEM. Encysted zoospores, chlamydozoospores and sporangia of pathogen were seen adhered to host epidermis six hours after inoculation. Independently of the inoculation methodology host tissue colonization was observed in all inoculated seedlings. Five isolates of *P. palmivora* (401, 524, 859, 870 and 1086) and 40 biocontrol agents (BCAs), comprising 39 isolates of *Trichoderma* spp. and one of *Gliocladium virens* were confronted in vitro. The percentage of inhibition in relation to the controls was calculated 72 hours after the confrontation. Thirteen isolates were selected as potential antagonistic agents: ES4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B, T61 (*T. harzianum*), TC25 (*T. longibrachiatum*), 64 (*T. piluliferum*), ALF 247 (*T. martiale*), 905 (*T. viride*), 7CC (*T. atroviride*) and TC26 (*T. koningiopsis*). These isolates are mycoparasites and/or show antibiosis deserving future in vivo researches.

ÍNDICE DAS FIGURAS

1.	Distribuição geográfica da pupunheira.....	6
2.	Aspectos botânicos da pupunheira (A-E). (A) estipe com espinhos; (B) e sem espinhos; (C) flores masculinas e femininas; (D) variabilidade dos frutos num mesmo cacho, verde a maduros; (E) sementes com variação no tamanho, coloração e formato.....	10
3.	Pragas e doenças da pupunheira (A-D).(A) larvas de <i>Metamasius hemipterus</i> em restos do estipe; (B) e (C) folha com sintomas de antracnose; (D) mofo branco de <i>Fusários sp</i>	16
4.	Estruturas de <i>Phytophthora palmivora</i> de pupunheira observada em microscópio esteroscópico (objetiva 40) (A-C). (A) esporângio; (B) clamidósporo e (C) hifas.....	17
5.	Ciclo vital de <i>Phytophthora palmivora</i> (Agrios, 2005 modificado)	26
6.	Sintomatologia da podridão-do-estipe (A-D). (A) sintomas de amarelecimento da folha bandeira; (B); (C) e (D) sintomas de apodrecimento do colmo.....	27
7.	Detalhes do processo de preparo das mudas (A-D). (A) escolha das sementes; (B) banco germinador de areia tinalizado; (C) plântulas no germinador por três meses e (D) plântulas em tubetes com substrato PLANTIMAX.....	39
8.	Detalhes do método 1 (A-C). (A) plântulas recém removidas dos tubetes; (B) imersão das raízes no inóculo; (C) replantio das mudas.....	40
9.	Detalhes do método 2 (A-B). Inundação (A) plântulas imersas em água para saturação do solo com água; (B) detalhe da inoculação de 1 mL da suspensão do inóculo, em torno do coleto das plântulas.....	40
10.	Detalhe do método 3. Irrigação o inóculo na superfície do solo.....	41
11.	Detalhe do método 4. Irrigação da superfície do solo com 30 mL de água destilada antes da inoculação.....	41

12. Detalhe do processo da avaliação do procedimento (A-F). (A) lavagem das plântulas; (B) eliminação do excesso de umidade; (C) medição da parte aérea; (D) determinação do comprimento do sistema radicular; (E) pesagem da parte aérea e (F) das raízes.....42
13. Alturas médias (cm) da parte aérea de plântulas inoculadas por diferentes métodos e concentrações de inóculo.....45
14. Médias da massa (g) fresca da parte das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentração de inóculo.....45
15. Massa (g) seca da parte aérea das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentração de inóculo.....46
16. Média do comprimento (cm) das raízes das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentração de inóculo.....46
17. Médias da massa (g) fresca das raízes das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentração de inóculo.....47
18. Médias da massa (g) seca das raízes das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentração de inóculo.....47
19. Plântulas de pupunheira inoculadas com *Phytophthora palmivora* dos métodos de inoculação(A-C). (A) disco; (B) gota (C) irrigação do solo com inóculo ao redor do coleto. (D-F) sintomas da podridão-do-estipe. (D) inoculação com disco de micélio; (E) inoculação com gota e (F) inoculação com suspensão de zoósporos; (G-I) sintomas internos em plântulas inoculadas.....62
20. Processamento das amostras (A-I). (A) inoculação com gota da suspensão de zoósporos/ mL (B) irrigação do solo em torno do coleto da plântula com 5 mL; (C) disco de micélio; (D) corte do colmo; (E) fragmentos do colmo; (F) amostras no gluteraldeído; (G) fixação das amostras trocando álcool e acetona (H) ponto crítico e (I) final do processo de metalização.....70
21. (A-D) MEV de estruturas de *Phytophthora palmivora*. (A e B) zoósporos encistados; (C) esporângio; (D) zoósporo aderido à superfície do hospedeiro.....75
22. (A-B) Penetração e colonização de *P. palmivora* nos tecidos do estipe da pupunheira. (A) zoósporo iniciando a formação de apressório; (B) haustórios no interior do xilema.....75

23. (A-D) Clamidósporo no interior das células do hospedeiro colonizadas, setas indicando clamidósporos (D) clamidósporos e hifas.....76
24. (A-B) Teste para revitalização dos isolados de *Phytophthora palmivora* inoculando em folhas de plântulas de pupunheira (A) Detalhe da inoculação em discos de micélio e (B) folhas inoculadas em câmara-úmida.....85
25. Confronto entre isolados de *P. palmivora* e *Trichoderma spp.*: (A) Cultura de *P. palmivora*; (B) Cultura de *Trichoderma sp.* (C-D) Confronto entre *P. palmivora* e um BCA. Culturas confrontadas 24h (C), e 72 (D) após a colocação do BCA.....85
26. (A-F) Obtenção e processamento de amostras para serem examinadas ao MEV. Processo de metalização: (A) antagonismo, (B) Corte na inserção e (C) amostras em glutaraldeído. Preparo das amostras: (D) estante com as amostras; (E) fixação e (F) ponto crítico (Battec- CPD 030 Critical Point Dryer). (G) stubs com as amostras colocadas no metalizador; (H) final do processo de metalização com a deposição de uma fina camada de ouro, por 80 s utilizando-se o metalizador (Battec-SCD 050 Sputter Coater); e (I) amostras metalizadas.....89
27. (A-C) Classificação das interações: (A) impasse; (B) entrelaçamento e (C) substituição.....95
28. (A-D) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando o parasitismo e interações de *Trichoderma sp.* com *Phytophthora palmivora* (A) esporângio de *P. palmivora* sendo parasitado pela hifa de *Trichoderma sp.* (B, C e D) hifas de *Trichoderma sp.* enroladas nas hifa de *P. palmivora*.....96

LISTA DE TABELAS

1. Valores de R^2 utilizados na definição do modelo linear ou quadrático da relação método de inoculação concentração de inóculo, e as variáveis patométricas utilizadas.....36
2. Concentrações de inóculo selecionadas por método de inoculação e por variável patométrica.....41
3. Médias de altura e massas frescas e secas da parte aérea de plântulas de pupunheira obtidas aos 75 dias após a inoculação com *Phytophthora palmivora*, através de 4 métodos de inoculação nas concentrações em que os seus efeitos foram mais drásticos..... 42
4. Médias de altura e massas frescas e secas do sistema radicular de plântulas de pupunheira obtidas aos 75 dias após a inoculação com *Phytophthora palmivora*, através de 4 métodos de inoculação nas concentrações em que os seus efeitos foram mais drásticos..... 42
5. Valores das massas frescas e seca da parte aérea e do sistema radicular (g) obtidos de plântulas de pupunheira 60 dias após a inoculação com *Phytophthora palmivora*, sem ferimento.....53
6. Relação de isolados de diferentes espécies de *Trichoderma* e *Gliocladium* utilizados no trabalho.....71
7. Porcentagem de redução do crescimento das colônias de três isolados de *Phytophthora palmivora* (401,870,1086) por ação de 40 agentes de biocontroles potenciais (BCAs), observados 72 após o confronto.....76