

RESISTÊNCIA DE PIPERÁCEAS NATIVAS DA AMAZÔNIA À INFECÇÃO CAUSADA POR *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*

Fernando Carneiro de ALBUQUERQUE¹, Maria de Lourdes Reis DUARTE²,
Ruth Linda BENCHIMOL¹, Tadamitsu ENDO³

RESUMO - A reação de resistência das espécies *Piper aduncum*, *P. arboreum*, *P. carniconnectivum*, *P. colubrinum*, *P. hispidinervium*, *P. hispidum*, *P. hostmannianum*, *P. tuberculatum*, *P. nigrum* e *Piper* sp. à infecção causada por dois isolados de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* foi determinada em condições de telado, através do cultivo em solo infestado e de inoculações no internódio de mudas com três meses de desenvolvimento. Mudas de *P. nigrum* (pimenta-do-reino) foram usadas como controle, devido a alta suscetibilidade ao patógeno. Aos 110 dias observou-se que o isolado Adu obtido de *P. aduncum* não causou podridão das raízes em todas as espécies, com exceção de *Piper* sp. e de *P. nigrum*, enquanto que o isolado Nig obtido de *P. nigrum* causou infecção apenas nas raízes desse hospedeiro. Diferenças significativas ($p < 0,01$) foram observadas no nível de resistência entre as espécies, sendo as espécies nativas mais resistentes à infecção causada pelo fungo. Os isolados apresentaram variação para virulência ($p < 0,01$), sendo o isolado Nig mais virulento do que o Adu. Não ocorreu, porém, interação entre *Piper* spp. e os dois isolados de *N. haematococca* f. sp. *piperis*. Concluiu-se, portanto, que o isolado Adu não tem habilidade de infectar os tecidos radiculares das espécies estudadas e que pelo menos sete espécies nativas apresentam uma alta resistência ao patógeno, podendo ser utilizadas como porta-enxertos resistentes para controlar doenças radiculares da pimenta-do-reino.

Palavras-chave: fontes de resistência, podridão das raízes, controle de doenças, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, pimenta-do-reino.

Resistance of Amazonian *Piper* species to *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*

ABSTRACT - The resistance of *Piper aduncum*, *P. arboreum*, *P. carniconnectivum*, *P. colubrinum*, *P. hispidinervium*, *P. hispidum*, *P. hostmannianum*, *P. nigrum*, *P. tuberculatum* and *Piper* sp. to the infection caused by two *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* isolates was detected under laboratory and shade house conditions. Due to their high susceptibility, black pepper (*Piper nigrum*) plants were used as control. When grown in soil infested with the isolate from *P. aduncum* (Adu), no root rot symptoms were observed on the majority of *Piper* spp., except on *Piper* sp. and black pepper. However, in soil infested with the isolate from *P. nigrum* (Nig) root rot was noticed on black pepper, although not on the other *Piper* spp. Significant differences ($p < 0.01$) were observed when stems of *Piper* spp. plants were inoculated with Adu and Nig isolates. On *P. nigrum* stems typical lesions were followed by yellowish, stem blight and death of plants were observed, while on *Piper* spp. canker-like tissues around stem lesions were detected, evidencing the high resistance of these related species. These results showed that the isolate from *P. aduncum* has no ability to colonise *Piper* spp. root tissues and that at least seven related species are highly resistant to *N. haematococca* f. sp. *piperis*. This suggests that these species may be used either as rootstocks or for somatic hybridisation and protoplast fusion in amelioration studies aiming to control *Fusarium* diseases on black pepper.

Key-words: resistance source, root rot, disease control, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, black pepper.

¹M.Sc. em Fitopatologia, Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Caixa Postal 48, 66095-100-Belém, Pará, Brasil.

²Ph.D. em Fitopatologia, Embrapa Amazônia Oriental.

³Convênio Embrapa/JICA.

INTRODUÇÃO

A fusariose da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) causada pelo fungo *Nectria haematococca* Berk & Br. f. sp. *piperis* Albuquerque. (anamórfico: *Fusarium solani* f. Mart. (Sacc.) f. sp. *piperis* Albuquerque.) é uma das doenças mais importantes dessa cultura no Brasil (Albuquerque & Ferraz, 1976; Duarte & Albuquerque, 1986). O patógeno pode infectar a pimenteira através do sistema radicular, onde causa o apodrecimento das raízes e das radículas, e através da região nodal, causando lesões nas hastes e secamento dos ramos. Nos tecidos infectados, o patógeno produz conidióforos, sobre os quais se originam os microconídios, macroconídios e peritécios vermelhos, contendo no interior os ascósporos. Qualquer um desses tipos de esporos pode ser responsável por novas infecções no campo (Albuquerque & Ferraz, 1976; Duarte & Albuquerque, 1986; Hamada *et al.*, 1988).

Desde a identificação do agente causal, em 1959 (Albuquerque & Ferraz, 1976), o patógeno vinha sendo constatado infectando apenas os tecidos da pimenta-do-reino. Acreditava-se que o cultivo de áreas extensas com uma única cultivar de *P. nigrum* tivesse exercido pressão de seleção na população nativa de *Fusarium solani*, originando uma forma *specialis* patogênica para esse hospedeiro (Duarte & Albuquerque, 1986). Entretanto, em 1994, foi isolada pela primeira vez uma cepa de *N. haematococca* f. sp. *piperis* de ramos

infectados de *Piper aduncum* L., uma espécie nativa que cresce espontaneamente em áreas de capoeira e em locais sombreados e úmidos. Comprovou-se, desse modo, a existência de hospedeiro nativo do patógeno (Albuquerque *et al.*, 1997). Em *P. aduncum* o fungo provoca o secamento dos ramos, sem, no entanto, causar a morte da planta, como ocorre na pimenta-do-reino. Essa reação à invasão dos tecidos pelo patógeno sugere que *P. aduncum* possui um alto nível de resistência a *N. haematococca*. Cruzamentos entre isolados de *N. haematococca* obtido de *P. aduncum* com clones-teste do mesmo fungo, obtido de *P. nigrum*, deram origem a peritécios férteis, confirmando tratar-se do mesmo fungo (Albuquerque *et al.*, 1997).

Em uma coleção com 35 acessos de *P. nigrum* oriundos de países orientais não foram identificados genótipos resistentes à podridão das raízes e ao secamento dos ramos. Pesquisas vêm sendo conduzidas visando encontrar resistência em piperáceas nativas para futuros trabalhos de melhoramento (Alconero *et al.*, 1972; Garner & Beakbane, 1968; Waard, 1986; Waard & Zaubin, 1983).

Com o objetivo de detectar novas fontes de resistência entre as diferentes espécies de *Piper* e verificar se isolados de *N. haematococca* f. sp. *piperis* oriundos de *P. aduncum* e de *P. nigrum* apresentam diferenças na habilidade de infectar diferentes hospedeiros conduziu-se o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de nove diferentes espécies de *Piper* e de *P. nigrum* (pimenta-do-reino), com três meses de desenvolvimento, foram inoculadas com isolados de *N. haematococca*, oriundos de *P. nigrum* (isolado Nig) e de *P. aduncum* (isolado Adu), através do plantio em solo infestado artificialmente e da introdução de inoculo em incisões feitas nos internódios. Os isolados de *N. haematococca* f. sp. *piperis* foram obtidos no Estado do Pará, em plantios de pimenta-do-reino no município de Ipixuna, e de plantas de *P. aduncum* nativas, em Macapazinho, município de Castanhal. Ambos isolados foram altamente patogênicos aos respectivos hospedeiros.

Para infestação do solo, cultivou-se o fungo em meio de cultura, constituído de uma mistura de solo e farelo de trigo umedecida, na proporção de 4:1, distribuída em erlenmeyers de 250 ml e esterilizada (121 °C, 1,5 atm.) durante 30 minutos por dois dias consecutivos. Discos de colônias (10 mm) cultivadas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) durante uma semana foram transferidos para frascos contendo o meio de farelo de trigo e incubados à temperatura ambiente (23 °C a 27 °C) por 25 dias. O inóculo assim obtido foi incorporado ao solo desinfestado com brometo de metila, na proporção de 5 g/kg de solo. A mistura final foi distribuída em sacos de plástico escuro sanfonados

e perfurados, com capacidade de 3 kg.

Nos testes de infestação do solo foram conduzidos dois ensaios. No primeiro, 15 mudas das espécies *P. aduncum* L., *P. arboreum* Aublet, *P. carniconnectivum* C. DC., *P. colubrinum* Link., *P. hispidinervum* C. DC., *P. hispidum* S.W., *P. hostmannianum* (Miq.) C. DC., *Piper* sp. e *P. tuberculatum* Jacq. foram transplantadas de imediato para vasos contendo solo infestado com o isolado Nig, enquanto que no segundo, vinte mudas de cada espécie foram transplantadas para vasos contendo solo infestado com o isolado Adu e com o isolado Nig (dez mudas por espécie e por isolado). A cultivar Guajarina de *P. nigrum* foi usada como testemunha no primeiro ensaio, enquanto que no segundo usou-se a cultivar Kottanadan-2. As avaliações da severidade da doença, expressa em porcentagem de plantas com diferentes graus de infecção, os quais variaram de amarelecimento da folhagem, murcha a necrose completa da planta, foram feitas aos 50, 70, 90 e 110 dias após a inoculação. Cortes longitudinais nas raízes foram feitos para se observar a presença ou ausência de descoloração vascular.

A fim de avaliar a reação dos tecidos da haste em relação à infecção provocada pelo patógeno, foram feitas inoculações no internódio de mudas das espécies nativas e na testemunha (pimenta-do-reino cv. Guajarina). A técnica

consistiu em se fazer uma incisão longitudinal (0,2 cm a 0,5 cm) no internódio e introduzir um disco de cultura (4 mm de diâmetro) retirado da periferia de colônias do patógeno, cultivadas durante 12 dias em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. Foram inoculadas quatro mudas por espécie e por isolado. As avaliações foram feitas através de medições da área necrosada ao longo da área ferida, aos 12 e 22 dias após a inoculação, de acordo com uma escala de notas de oito pontos sendo: 1 = ausência de sintomas; 2 = 0,1 cm a 2,0 cm; 3 = 3,1 cm a 4,0 cm; 4 = 4,1 cm a 6,0 cm; 5 = 6,1 cm a 8,0 cm; 6 = 8,1 cm a 10,0 cm; 7 = 10,1 cm a 12,0 cm; 8 = 12,1 cm a 14,0 cm. As notas foram transformadas em *ranks* e analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os *ranks* obtidos por cada espécie foram comparados pelo teste de Tukey modificado para dados não paramétricos, ao nível de 5% de significância (Zar, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infestação do solo – Nenhuma das espécies nativas cultivadas em solo infestado com o isolado Nig apresentou sintoma de podridão das raízes durante o período de 110 dias de condução do experimento, enquanto que em mudas de *P. nigrum* cv. Guajarina os índices de infecção variaram de 33,3%, 53,3%, 80,0% e 100,0% aos 50, 70, 90 e 110 dias após a inoculação, respectivamente. No segundo

ensaio, o isolado Adu não ocasionou infecção nas raízes de nenhuma planta das espécies nativas avaliadas e nem em *P. nigrum*. O isolado Nig não infectou o sistema radicular das *Piper* spp. nativas, mas em *P. nigrum* os sintomas evoluíram com maior rapidez do que no experimento anterior, registrando-se índices de infecção da ordem de 50%, 80% e 100% aos 50, 70 e 90 dias após a inoculação, respectivamente. Em consequência do ataque no sistema radicular, as mudas de *P. nigrum* exibiram sintomas de amarelecimento, murcha, queda prematura de folhas e secamento generalizado da planta. No exame dos tecidos internos das raízes não foi observada descoloração vascular, nem podridão radicular nas espécies nativas, enquanto que as plantas de *P. nigrum*, na fase inicial da infecção, apresentaram estrias internas escurecidas e, na fase final, a necrose tornou-se generalizada em todos os tecidos das raízes, confirmando observações feitas por Albuquerque & Ferraz (1976). O isolado Adu não infectou os tecidos radiculares das piperáceas estudadas, enquanto que o isolado Nig só infectou os tecidos radiculares de *P. nigrum*, indicando que os tecidos radiculares das piperáceas nativas apresentam alta resistência à infecção pelo patógeno.

Inoculação na haste – Todas as espécies, com exceção de *P. arboreum*, *P. tuberculatum* e *Piper* sp., exibiram lesões nas hastes aos

12 dias após a inoculação, cujo comprimento médio variou de 1,0 cm (*P. hispidum*) a 4,5 cm (*P. nigrum*) quando inoculadas com o isolado Nig. Quando as espécies foram inoculadas com o isolado Adu, nenhum sintoma foi observado em *P. hispidum*, *P. arboreum* e *Piper* sp. Nas demais espécies, o comprimento médio das lesões variou de 0,1 cm (*P. tuberculatum*) a 3,0 cm (*P. aduncum*) (Tab. 1).

Aos 22 dias após a inoculação encontrou-se diferenças significativas ($p < 0,01$) quanto à reação das espécies de *Piper* à invasão dos tecidos pelo patógeno. Diferenças significativas foram também observadas quanto à virulência dos isolados de *N. haematococca* f. sp. *piperis* ($p < 0,025$), porém, não ocorreu interação entre espécies de *Piper* e isolados (Tab. 2). As lesões progrediram, atingindo 12,2 cm em *P. nigrum* inoculada com o isolado Nig e 4,0 cm em *P. aduncum* inoculada com o isolado Adu, hospedeiros originais dos isolados

testados. Observou-se, ainda, que os tecidos da haste das piperáceas nativas inoculadas com ambos isolados apresentaram alterações morfológicas em torno da área ferida, caracterizadas por lesões necróticas intumescidas, semelhantes a cancos, sintoma nunca observado em plantas infectadas pelo patógeno em *P. nigrum*.

O isolado Adu não causou nenhum tipo de infecção no sistema radicular das espécies testadas. Supõe-se que esse isolado tenha habilidade de infectar apenas os ramos do hospedeiro. No ambiente nativo, o patógeno tem sido encontrado associado a cancos na haste e secamento dos ramos de *P. aduncum*. Entretanto, as plantas afetadas emitem brotações abaixo do ponto de infecção e não ocorre a morte da planta, caracterizando uma reação de resistência de *P. aduncum*, observado também no presente trabalho. Plantas de *P. aduncum* com sintomas de podridão das raízes nunca foram observadas em condições de campo,

Tabela 1. Progresso da infecção causada por dois isolados de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* (Adu e Nig) no internódios de mudas de 10 espécies de *Piper* aos 12 e 22 dias após a inoculação (Média de quatro repetições).

Espécie	Comprimento das lesões (cm)			
	Isolado Nig		Isolado Adu	
	12 dias	22 dias	12 dias	22 dias
<i>P. aduncum</i>	2,8	4,4	3,0	4,0
<i>P. colubrinum</i>	1,0	3,4	0,0	0,2
<i>P. hispidinervum</i>	2,2	2,2	1,8	2,1
<i>P. hispidum</i>	1,0	1,7	0,0	0,4
<i>P. arboreum</i>	0,0	0,0	0,0	0,1
<i>P. tuberculatum</i>	0,0	0,0	0,1	0,3
<i>P. carniconnectivum</i>	1,3	1,5	0,6	1,0
<i>P. nigrum</i> (cv. Guajarina)	4,5	12,2	2,1	2,5
<i>P. hostmannianum</i>	1,2	1,5	0,2	0,3
<i>Piper</i> sp.	0,0	0,0	0,0	0,3

mesmo quando vegetando próximas de pimenteiras infectadas. Já o isolado Nig mostrou habilidade para infectar o sistema radicular apenas de *P. nigrum*, sugerindo que o sistema radicular das espécies nativas possui maior resistência à penetração e colonização pelo patógeno do que o de *P. nigrum*. Ambos isolados têm habilidade para infectar os ramos das plantas, entretanto *P. nigrum* apresentou maior resistência à invasão pelo isolado Adu, enquanto que *P. aduncum* apresentou nível semelhante de resistência a ambos os isolados.

Embora os isolados testados (Adu e Nig) fossem altamente patogênicos para seus hospedeiros originais nas condições do presente estudo, ambos demonstraram não possuir habilidade para infectar as raízes das espécies nativas. A presença de cepas com variação para virulência na população nativa do fungo patogênico poderá resultar no aparecimento de cepas do

patógeno fisiologicamente diferentes e adaptadas para infectar tanto as raízes quanto os ramos, como acontece com o isolado Nig em relação a *P. nigrum*, fato já comprovado experimentalmente (Albuquerque *et al.*, 1976; Duarte, 1993).

O papel que a população nativa de *N. haematococca* f. sp. *piperis* desempenha na patogênese em *P. nigrum* ainda não está bem estudado. Embora nunca tenham sido constatadas raças patogênicas na população de *N. haematococca* f. sp. *piperis*, a presença de indivíduos com diferentes graus de virulência poderá originar, no futuro, raças do patógeno já que esses isolados produzem livremente o estágio teleomórfico e são compatíveis para fatores heterotáticos (Albuquerque *et al.*, 1997).

A presença de fontes de resistência a *N. haematococca* f. sp. *piperis* na população de piperáceas

Tabela 2 Resposta de 10 espécies de *Piper* à infecção causada por dois isolados de *N. haematococca* f. sp. *piperis* oriundos de *P. aduncum* (Adu) e de *P. nigrum* (Nig), 22 dias após a inoculação (Média de quatro repetições).

Isolado Adu		Isolado Nig	
Espécie	Ranks	Espécie	Ranks
<i>P. aduncum</i>	289,0a	<i>P. nigrum</i>	304,0a
<i>P. nigrum</i>	245,0b2	<i>P. aduncum</i>	289,0 ab
<i>P. hispidum</i>	17,0c	<i>P. colubrinum</i>	271,5c
<i>P. carniconnectivum</i>	143,5d	<i>P. hispidum</i>	222,5c
<i>P. hispidinervium</i>	113,0e	<i>P. hispidinervium</i>	185,0d
<i>P. hostmannianum</i>	92,5e	<i>P. carniconnectivum</i>	182,0d
<i>P. arboreum</i>	72,0e	<i>P. hostmannianum</i>	182,0d
<i>P. colubrinum</i>	72,0e	<i>P. arboreum</i>	72,0e
<i>P. tuberculatum</i>	72,0e	<i>P. tuberculatum</i>	72,0e
<i>Piper</i> sp.	72,0e	<i>Piper</i> sp.	72,0e

Ranks seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si a nível de 5% de significância ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey modificado (Zar, 1999).



Figura 1. Plantas de *Piper nigrum* com sintomas de secamento dos ramos (à esquerda) causado por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*, ao lado de plantas de *Piper tuberculatum* (à direita) resistentes ao patógeno, 22 dias após a inoculação de hastes de mudas com três meses de desenvolvimento.

nativas da Amazônia constitui uma opção para o desenvolvimento de novos testes para selecionar novas combinações de enxerto e porta-enxertos mais compatíveis, a fim e controlar a podridão das raízes. Outra alternativa seria a transferência de genes de resistência dessas espécies para *P. nigrum* através de técnicas modernas de cultura de tecidos envolvendo hibridação somática, fusão de protoplastos ou cultura de embriões.

Bibliografia citada

Albuquerque, F.C.; Duarte, M.L.R. 1991. *Comportamento de germoplasma de*

pimenta-do-reino, em áreas de ocorrência de fusariose no Estado do Pará. Documentos nº 12, Embrapa-CPATU, Belém 40p.

Albuquerque, F.C.; Ferraz, S. 1976. Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e sua patogenicidade à pimenta-do-reino. *Experientia*, 22(6):133-151.

Albuquerque, F.C.; Ferraz, S.; Sediyaama, C.S. 1976. Influência da técnica de inoculação e da concentração de esporos na patogenicidade de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* sobre pimenta-do-reino. *Experientia*, 22(6):165-174.

Albuquerque, F.C.; Hamada, M; Duarte, M.L.R. 1997. *Piper aduncum*, espécie nativa da Amazônia brasileira, hospedeira de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. *Fitopatologia Brasileira*, 22(2):201-204.

- Alconero, R.; Albuquerque, F.C.; Almeyda, N.; Santiago, G. 1972. *Phytophthora* foot rot of black pepper in Brazil and Puerto Rico. *Phytopathology*, 62(1):144-148.
- Duarte, M.L.R.; Albuquerque, F.C. 1986. Secamento dos ramos da pimenta-do-reino. In: Anais do 1º Simpósio do Trópico Úmido, 1984, Belém, PA. vol. 4. Embrapa-DID Brasília. pp. 383-394.
- Duarte, M.L.R. 1993. Toxic metabolites and their role in pathogenesis of *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* on black pepper, *Piper nigrum* L. Ph.D. Thesis, Imperial College of Science, Technology and Medicine/ University of London, Ascot, England. 213p.
- Garner, J.R.; Beakbane, A.B. 1968. A note on the grafting and anatomy of black pepper. *Experimental Agriculture*, 4(3):187-192.
- Hamada, M.; Uchida, T.; Tsuda, M. 1988. Ascospore dispersion of the causal agent of *Nectria blight of Piper nigrum*. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 54:303-308.
- Waard, P.W.F. 1986. Current state and prospective trends of black pepper (*Piper nigrum* L.) production. *Outlook on Agriculture*, 15(4):186-195.
- Waard, P.W.F.; Zaubin, R. 1983. Callus formation during grafting of woody plants. A concept for the case of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Tropical Agriculture*, 9(10):9-19.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed., Prentice Hall, New Jersey. 718p.