

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO
VEGETAL



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

ALINE BRITO VAZ

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALINE BRITO VAZ

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

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Proteção de plantas

Orientadora: Dra. Edna Dora Martins
Newman Luz

**ILHÉUS- BAHIA
2010**

ALINE BRITO VAZ

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

Ilhéus – BA, 22/10/2010

**Dra. Edna Dora M. Newman Luz – PhD
(CEPLAC/CEPEC) - Orientadora**

**Dr. Marival Lopes de Oliveira - PhD
(CEPLAC/CEPEC)**

**Dra. Arlete José da Silveira - DS
(DCAA /UESC)**

DEDICATÓRIA

“A você que sempre confiou em mim, nunca me deixou desistir de lutar e acreditar que meu sonho se realizaria...”

AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora Dra. Edna Dora Martins Newman Luz pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela amizade, pelo carinho maternal e incondicional, pelo respeito e pela honra de ter trabalho com ela.

Ao meu co-orientador querido Dr. Marival Lopes de Oliveira pelas explicações, sugestões e contribuições de suma importância, cooperando significativamente para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também a oportunidade de ter convivido com uma pessoa tão sábia.

A minha amiga “mãe” Ana Rosa Niella, pelos momentos alegres na convivência diária, pelo carinho, companheirismo e conforto durante os momentos de preocupações e receios dentro e fora do laboratório, além dos ensinamentos de técnicas de laboratório.

A Dra. Stela Dalva Vieira Midlej Silva pelo carinho, dedicação, paciência que sempre disponibilizou durante os trabalhos de microscopia eletrônica de varredura.

Ao querido Lindolfo Pereira dos Santos Filho pela paciência e imensa contribuição na realização das análises estatísticas.

A querida Maria da Graça Parada pelo inestimável carinho, cuidado, amizade e dedicação, sempre honrando seus compromissos.

A amiga Dilze Maria Argôlo pelos conselhos, ensinamentos, carinho, dedicação, companheirismo e amizade, além das noites sem dormir!

A bondosa Márcia Paim sempre disposta a ensinar com muito carinho, dedicação sempre apoiando nos momentos difíceis.

Ao querido mestre Dr. José Luiz Bezerra pelo apoio, ensinamentos na sala de aula, conselhos, por todos os momentos.

A minha amiga, “mãe”, Glória Paixão pelas palavras sábias nos momentos certos, pelo carinho e apoio incondicional.

Aos Engenheiros Agrônomos Ricardo Castro, gerente da Fazenda Duas Barras, município de Itagi, BA, e Manoel Aboboreira Neto, Diretor da Inaceres Agrícola SA, município de Uruçuca, BA, pelas mudas de pupunha cedidas para a realização das pesquisas.

Aos queridos funcionários de campo do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), notadamente o Senhor Ananias (Nani), pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

A equipe do PHYTO LAB constituída por Daniele Araújo, Tita Primo, Denise Argôlo, Ademilde e Cenilda, que muito contribuíram para elucidação da pesquisa e pela agradável convivência e ajuda nos momentos mais difíceis que surgiram ao longo dessa jornada. Agradeço também a querida Lurdinha pelo apoio incondicional e carinho.

A Virginia pela amizade, pelas horas utilizadas no laboratório que colaboraram com a formação do trabalho.

A querida Valéria Fernandes funcionária do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UESC, pela atenção, dedicação e pela grandiosa ajuda que muito contribuiu nesse trabalho.

A Dra. Adriana chefe da Unidade da Microscopia Eletrônica, FIOCRUZ, agradeço a oportunidade do uso para observação de amostras no Microscópio Eletrônico de Varredura contribuindo de maneira enriquecedora neste trabalho.

À Prof. Dra. Arlete Silveira pela amizade e carinho.

A Caroline Tavares, secretária do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pelas orientações e informações.

As amigas, Érica Sfalsin e Milena Campos Kruschewsky pelos momentos de descontração e felicidade e também ao colega Emerson Santos pela contribuição importante nas análises estatística, sempre disposto a ajudar.

A CEPLAC, pela concessão da infra-estrutura para a realização dos experimentos;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo;

A minha família, pais, irmãs e sobrinhos pela torcida, apoio incondicional em todos os momentos difíceis e alegres. Proporcionando inspiração nas horas difíceis mesmo distantes, e ensinamentos para a busca dos meus ideais, nesses dois anos que dediquei aos estudos.

Enfim, a todas as pessoas que, de forma singular, contribuíram para o meu crescimento profissional e humano, o meu obrigado, hoje e sempre!

“Creio que não existe uma estrada principal na ciência... estamos numa floresta e descobrimos o nosso caminho por ensaio e erro, construindo nossas próprias estradas à medida que avançamos”.

Max Born

SUMÁRIO

EXTRATO	x
ABSTRACT	xii
INDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE TABELAS	xvii
1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Origem e distribuição da pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth).....	5
2.2 Caracterização botânica.....	6
2.2.1 Estipe.....	7
2.2.2 Inflorescência.....	8
2.2.3 Frutos.....	8
2.2.4 Sementes.....	9
2.3 Importância econômica.....	9
2.4 Condições edafo-climáticas para produção.....	10
2.5 Principais pragas e doenças.....	11
2.5.1 Podridão-do-estipe da pupunheira e sua etiologia.....	13
2.5.2 Ciclo da doença.....	14
2.5.3 <i>Phytophthora palmivora</i>	15
2.6 Controle biológico.....	16
2.6.1 Mecanismos de ação dos agentes de biocontrole.....	18
2.6.1.1 Parasitismo.....	19
2.6.1.2 Antibiose.....	19
2.6.1.3 Competição.....	20
2.6.1.4 Indução de resistência.....	20
2.6.2 Gênero <i>Trichoderma</i>	20
2.6.3 Espermosfera e rizosfera.....	21
2.6.4 Controle biológico de <i>Phytophthora sp.</i>	22
3.0 CAPÍTULO 1- AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE <i>Phytophthora palmivora</i> EM PLÂNTULAS DE PUPUNHEIRA	
Resumo	24
Abstract	26
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.2.1 Preparo das plântulas.....	29
3.2.2 Preparo do inóculo.....	30
3.2.3 Inoculações com <i>Phytophthora palmivora</i> em pupunheira.....	31
3.2.4 Delineamento experimental.....	34
3.2.5 Avaliação.....	34
3.2.6 Análise dos dados.....	34
3.3 RESULTADOS	34
3.4 DISCUSSÃO	43
4.0 CAPÍTULO 2- FERIMENTOS SÃO NECESSÁRIOS À INFECÇÃO NO PATOSSISTEMA <i>Phytophthora palmivora</i> x PUPUNHEIRA?	
Resumo	47
Abstract	48
4.1 INTRODUÇÃO	49

4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.3	RESULTADOS.....	51
4.4	DISCUSSÃO.....	54
5.0	CAPÍTULO 3- HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO <i>Phytophthora palmivora</i> (Butler) Butler X PUPUNHEIRA	
	Resumo.....	56
	Abstract.....	57
5.1	INTRODUÇÃO.....	58
5.2	MATERIAL E MÉTODO.....	59
5.3	RESULTADOS.....	60
5.4	DISCUSSÃO.....	63
6.0	CAPÍTULO 4- SELEÇÃO <i>in vitro</i> DE FUNGOS ANTAGÔNICOS A <i>Phytophthora palmivora</i> DA PUPUNHEIRA	
	Resumo.....	65
	Abstract.....	66
6.1	INTRODUÇÃO.....	67
6.2	MATERIAL E MÉTODO.....	69
	6.2.1 Obtenção e manutenção de isolados de <i>Phytophthora palmivora</i>	69
	6.2.2 Obtenção e manutenção de isolados de candidatos a agentes antagônicos	70
	6.2.3 Confronto entre isolados de <i>Phytophthora palmivora</i> e <i>Trichoderma spp.</i>	70
	6.2.4 Estudos histopatológicos das interações entre <i>P. palmivora</i> e <i>Trichoderma spp.</i> utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura.....	73
6.3	RESULTADOS.....	74
6.4	DISCUSSÃO.....	78
7.0	CONCLUSÕES.....	82
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

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 R² 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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO
VEGETAL



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

ALINE BRITO VAZ

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL
2010

ALINE BRITO VAZ

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

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Proteção de plantas

Orientadora: Dra. Edna Dora Martins
Newman Luz

**ILHÉUS- BAHIA
2010**

ALINE BRITO VAZ

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

Ilhéus – BA, 22/10/2010

**Dra. Edna Dora M. Newman Luz – PhD
(CEPLAC/CEPEC) - Orientadora**

**Dr. Marival Lopes de Oliveira - PhD
(CEPLAC/CEPEC)**

**Dra. Arlete José da Silveira - DS
(DCAA /UESC)**

DEDICATÓRIA

“A você que sempre confiou em mim, nunca me deixou desistir de lutar e acreditar que meu sonho se realizaria...”

AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora Dra. Edna Dora Martins Newman Luz pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela amizade, pelo carinho maternal e incondicional, pelo respeito e pela honra de ter trabalho com ela.

Ao meu co-orientador querido Dr. Marival Lopes de Oliveira pelas explicações, sugestões e contribuições de suma importância, cooperando significativamente para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também a oportunidade de ter convivido com uma pessoa tão sábia.

A minha amiga “mãe” Ana Rosa Niella, pelos momentos alegres na convivência diária, pelo carinho, companheirismo e conforto durante os momentos de preocupações e receios dentro e fora do laboratório, além dos ensinamentos de técnicas de laboratório.

A Dra. Stela Dalva Vieira Midlej Silva pelo carinho, dedicação, paciência que sempre disponibilizou durante os trabalhos de microscopia eletrônica de varredura.

Ao querido Lindolfo Pereira dos Santos Filho pela paciência e imensa contribuição na realização das análises estatísticas.

A querida Maria da Graça Parada pelo inestimável carinho, cuidado, amizade e dedicação, sempre honrando seus compromissos.

A amiga Dilze Maria Argôlo pelos conselhos, ensinamentos, carinho, dedicação, companheirismo e amizade, além das noites sem dormir!

A bondosa Márcia Paim sempre disposta a ensinar com muito carinho, dedicação sempre apoiando nos momentos difíceis.

Ao querido mestre Dr. José Luiz Bezerra pelo apoio, ensinamentos na sala de aula, conselhos, por todos os momentos.

A minha amiga, “mãe”, Glória Paixão pelas palavras sábias nos momentos certos, pelo carinho e apoio incondicional.

Aos Engenheiros Agrônomos Ricardo Castro, gerente da Fazenda Duas Barras, município de Itagi, BA, e Manoel Aboboreira Neto, Diretor da Inaceres Agrícola SA, município de Uruçuca, BA, pelas mudas de pupunha cedidas para a realização das pesquisas.

Aos queridos funcionários de campo do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), notadamente o Senhor Ananias (Nani), pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

A equipe do PHYTO LAB constituída por Daniele Araújo, Tita Primo, Denise Argôlo, Ademilde e Cenilda, que muito contribuíram para elucidação da pesquisa e pela agradável convivência e ajuda nos momentos mais difíceis que surgiram ao longo dessa jornada. Agradeço também a querida Lurdinha pelo apoio incondicional e carinho.

A Virginia pela amizade, pelas horas utilizadas no laboratório que colaboraram com a formação do trabalho.

A querida Valéria Fernandes funcionária do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UESC, pela atenção, dedicação e pela grandiosa ajuda que muito contribuiu nesse trabalho.

A Dra. Adriana chefe da Unidade da Microscopia Eletrônica, FIOCRUZ, agradeço a oportunidade do uso para observação de amostras no Microscópio Eletrônico de Varredura contribuindo de maneira enriquecedora neste trabalho.

À Prof. Dra. Arlete Silveira pela amizade e carinho.

A Caroline Tavares, secretária do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pelas orientações e informações.

As amigas, Érica Sfalsin e Milena Campos Kruschewsky pelos momentos de descontração e felicidade e também ao colega Emerson Santos pela contribuição importante nas análises estatística, sempre disposto a ajudar.

A CEPLAC, pela concessão da infra-estrutura para a realização dos experimentos;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo;

A minha família, pais, irmãs e sobrinhos pela torcida, apoio incondicional em todos os momentos difíceis e alegres. Proporcionando inspiração nas horas difíceis mesmo distantes, e ensinamentos para a busca dos meus ideais, nesses dois anos que dediquei aos estudos.

Enfim, a todas as pessoas que, de forma singular, contribuíram para o meu crescimento profissional e humano, o meu obrigado, hoje e sempre!

“Creio que não existe uma estrada principal na ciência... estamos numa floresta e descobrimos o nosso caminho por ensaio e erro, construindo nossas próprias estradas à medida que avançamos”.

Max Born

SUMÁRIO

EXTRATO	x
ABSTRACT	xii
INDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE TABELAS	xvii
1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Origem e distribuição da pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth).....	5
2.2 Caracterização botânica.....	6
2.2.1 Estipe.....	7
2.2.2 Inflorescência.....	8
2.2.3 Frutos.....	8
2.2.4 Sementes.....	9
2.3 Importância econômica.....	9
2.4 Condições edafo-climáticas para produção.....	10
2.5 Principais pragas e doenças.....	11
2.5.1 Podridão-do-estipe da pupunheira e sua etiologia.....	13
2.5.2 Ciclo da doença.....	14
2.5.3 <i>Phytophthora palmivora</i>	15
2.6 Controle biológico.....	16
2.6.1 Mecanismos de ação dos agentes de biocontrole.....	18
2.6.1.1 Parasitismo.....	19
2.6.1.2 Antibiose.....	19
2.6.1.3 Competição.....	20
2.6.1.4 Indução de resistência.....	20
2.6.2 Gênero <i>Trichoderma</i>	20
2.6.3 Espermosfera e rizosfera.....	21
2.6.4 Controle biológico de <i>Phytophthora sp.</i>	22
3.0 CAPÍTULO 1- AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE <i>Phytophthora palmivora</i> EM PLÂNTULAS DE PUPUNHEIRA	
Resumo	24
Abstract	26
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.2.1 Preparo das plântulas.....	29
3.2.2 Preparo do inóculo.....	30
3.2.3 Inoculações com <i>Phytophthora palmivora</i> em pupunheira.....	31
3.2.4 Delineamento experimental.....	34
3.2.5 Avaliação.....	34
3.2.6 Análise dos dados.....	34
3.3 RESULTADOS	34
3.4 DISCUSSÃO	43
4.0 CAPÍTULO 2- FERIMENTOS SÃO NECESSÁRIOS À INFECÇÃO NO PATOSSISTEMA <i>Phytophthora palmivora</i> x PUPUNHEIRA?	
Resumo	47
Abstract	48
4.1 INTRODUÇÃO	49

4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.3	RESULTADOS.....	51
4.4	DISCUSSÃO.....	54
5.0	CAPÍTULO 3- HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO <i>Phytophthora palmivora</i> (Butler) Butler X PUPUNHEIRA	
	Resumo.....	56
	Abstract.....	57
5.1	INTRODUÇÃO.....	58
5.2	MATERIAL E MÉTODO.....	59
5.3	RESULTADOS.....	60
5.4	DISCUSSÃO.....	63
6.0	CAPÍTULO 4- SELEÇÃO <i>in vitro</i> DE FUNGOS ANTAGÔNICOS A <i>Phytophthora palmivora</i> DA PUPUNHEIRA	
	Resumo.....	65
	Abstract.....	66
6.1	INTRODUÇÃO.....	67
6.2	MATERIAL E MÉTODO.....	69
	6.2.1 Obtenção e manutenção de isolados de <i>Phytophthora palmivora</i>	69
	6.2.2 Obtenção e manutenção de isolados de candidatos a agentes antagônicos	70
	6.2.3 Confronto entre isolados de <i>Phytophthora palmivora</i> e <i>Trichoderma spp.</i>	70
	6.2.4 Estudos histopatológicos das interações entre <i>P. palmivora</i> e <i>Trichoderma spp.</i> utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura.....	73
6.3	RESULTADOS.....	74
6.4	DISCUSSÃO.....	78
7.0	CONCLUSÕES.....	82
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

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

1. INTRODUÇÃO

A Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmácea pertencente ao gênero *Bactris* que apresenta grande variabilidade em suas características botânicas, morfológicas e fisiológicas, sendo seus tipos agrupados de acordo com a coloração da casca dos frutos, presença de espinhos no estipe, teor de óleo na polpa e presença de semente no fruto (BENCHIMOL et al., 2001).

O centro de origem da pupunheira, no Brasil, é a região Amazônica (Pará, Amazonas, Acre, Rondônia e Mato Grosso), e a sua domesticação se deu nos sopés amazônicos dos Andes, no norte da Bolívia, no leste do Peru e no Equador, disseminando a partir daí, para as planícies tropicais da América (BERGO et al., 1999).

Segundo Clement (1999), os povos pioneiros na prática da agricultura na região Amazônica já usavam a pupunheira na fabricação de armas de caça, ferramentas e moradias. Ao longo do tempo, com a conquista das Américas pelos europeus, foi notado que os frutos eram fonte de amido, tão importante quanto o milho e a mandioca. Com isso, e devido aos sistemas agrícolas, agroflorestais e aos jardins caseiros nas aldeias indígenas (CLEMENT, 1999), a planta foi se adaptando sendo utilizada tanto na agricultura familiar tradicional, quanto na moderna agricultura de alta utilização de insumos, comportando-se bem em plantios para a produção de palmito.

Por outro lado, não tem sido observada co-evolução da pupunheira com referência à resistência a pragas e doenças, em função de sua domesticação ter se processado na região amazônica, onde não havia monocultivo da cultura, apresentando-se baixas densidades e

sofrendo, por isso mesmo, menos injúrias, mas tornando-se suscetível quando plantadas em condições de monocultivo (JOHR e JAHNS, 1999).

Atualmente, sua principal demanda é para a produção de palmito onde o mercado nacional tem absorvido quase a totalidade da produção, constituindo o Brasil no maior consumidor mundial. Apesar disso, a exploração do palmito tem se baseado, principalmente, no extrativismo a partir da exploração de palmáceas nativas tais como açaí (*Euterpe oleracea* Martius) e jussara (*Euterpe edulis* Martius), com apenas uma pequena parte sendo originária da pupunheira (PARADA, 2009). Tal exploração leva a um esgotamento dos recursos naturais, particularmente, da floresta amazônica.

Desde o evento mundial denominado “RIO 92”, ficou decidido que a importação e/ou exportação de palmito deveriam ser proveniente de áreas plantadas e não resultantes do extrativismo da mata nativa. A partir de então, o Brasil começou a viabilizar a produção do palmito, a partir do plantio da pupunheira, passando a atividade extrativista a ser direcionada, unicamente, para o mercado interno. Adicionalmente, vem sendo realizado um trabalho de conscientização objetivando o manejo adequado e o plantio de novas espécies de palmeiras (GUERREIRO, 2002).

Surgiu assim a necessidade da substituição desse extrativismo pelo plantio regular, fazendo com que a pupunheira ganhasse mais espaço (TONET et al., 1999). A grande vantagem do plantio da espécie *B. gasipaes* é a sua precocidade e seu perfilhamento ao longo dos anos (YUYAMA et al., 1996), além da não oxidação do seu palmito, ao ser extraído.

A pupunheira possui grande potencial econômico na produção de palmito, que apresenta características altamente favoráveis à comercialização, além do seu fruto ser utilizado para diversos fins alimentícios (ALMEIDA, 1994). Em função das suas excelentes características, a pupunheira tem-se destacado como um dos cultivos mais promissores para regiões de clima tropical úmido, requerendo temperaturas acima de 22°C e uma pluviosidade bem distribuída ao longo do ano. Essa é uma das principais razões pelas quais se considera a região Sul da Bahia como uma das mais privilegiadas no Brasil para o cultivo comercial da pupunheira, sem o uso de irrigação (GOMES, 1996). A região possui ainda uma cadeia produtiva estruturada, contando com a presença de indústrias que adquirem o produto, além de fornecer assistência técnica. Produzir palmito de pupunheira cultivada tem contribuído para reduzir a pressão sobre as espécies nativas ameaçadas pelo extrativismo predatório (GUERREIRO, 2002).

Com a sua expansão, o cultivo da pupunheira começou a apresentar a incidência de diversas pragas, destacando-se a podridão-do-estipe, doença causada por *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. A enfermidade já foi relatada nos Estados do Pará, Tocantins, Goiás, Pernambuco, Bahia, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (SANTOS e LUZ, 2007).

Segundo Benchimol et al., (2001), perdas de 30% de mudas enviveiradas, e 10% de plantas adultas foram relatados no Pará. Os sintomas são caracterizados pela podridão da base do estipe que adquire uma coloração pardo-escuro, clorose e seca das folhas e morte da planta (BENCHIMOL et al., 2001).

A podridão-do-estipe tem causado problemas sérios em decorrência da morte de plantas em viveiros e no campo (PARADA, acesso 2009). Em um viveiro de uma propriedade agrícola foi observado que aproximadamente, 90% das mudas foram dizimadas pelo ataque de *P. palmivora* (SANTOS e LUZ, 2007).

O gênero *Phytophthora* é constituído de, aproximadamente, 60 espécies. Todas são consideradas patogênicas e altamente destrutivas, causando podridões de raízes, caules, folhas e frutos. *Phytophthora palmivora* afeta também outros hospedeiros que possuem relevância econômica como cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.) pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), entre outros (DIANESE, 2006).

Normalmente, em ambientes saturados de umidade, é que os esporângios são produzidos. A germinação pode ser direta ou indireta, ocorrendo liberação de zoósporos, que são as principais unidades infectivas, somente quando há um filme de água em contato com o esporângio e quando a temperatura está entre 15 e 18 °C. Fatores ambientais, tais como umidade e temperatura, são de importância primordial para a ocorrência das doenças epidêmicas (HANADA, 2006).

Segundo ETHUR (2006), o controle biológico vem ganhando destaque na agricultura, quando usado num programa de manejo integrado de doenças tendo papel fundamental no equilíbrio ecológico. Cada vez mais essa forma vem sendo estudada como alternativa ao controle químico em função de problemas com contaminação ambiental e danos à saúde humana.

Trichoderma spp. é um dos fungos mais pesquisados como agente de biocontrole, sendo antagonista a vários fitopatógenos em diferentes culturas. Através da análise microbiológica, pode-se compreender como e em quais circunstâncias ocorre o controle biológico no ambiente do solo, e como se dão as relações entre patógeno, agente de biocontrole e hospedeiro (ETHUR, 2006).

O controle biológico utilizando-se espécies do gênero *Trichoderma* tem se mostrado bastante promissor tanto *in vitro*, quanto *in vivo* sobre espécie de *Phytophthora* como *P. palmivora*, *P. citrophthora* e *P. capsici* (HANADA, 2006).

Em mamoeiro, estudos têm demonstrado a eficiência de alguns isolados de *Trichoderma harzianum* e *T. stromaticum* no controle da podridão dos frutos causados por *Phytophthora palmivora* (TOCAFUNDO, 2008), assim como e *T. harzianum* e *T. asperellum* no controle da podridão-do-pé do mamoeiro, promovendo também o crescimento das plantas (TAVARES, 2009).

Os objetivos deste trabalho foram: i) selecionar métodos e concentrações de zoósporos de *P. palmivora* para inoculação de plântulas de pupunheira; ii) determinar a importância de ferimentos para a infecção do patógeno; iii) estudar a histopatologia da interação *P. palmivora* x pupunheira; iv) selecionar entre os fungos antagonistas da coleção do CEPEC/CEPLAC possíveis agentes de biocontrole à podridão do estipe da pupunheira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e Distribuição da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth).

Segundo Clement (2000), é provável que o centro de origem das espécies silvestres que compõem o táxon Guilielma, tenha sido o noroeste da América do Sul, onde as plantas foram distribuídas pelo sopé dos Andes, na Bolívia e no Panamá. O seu processo de domesticação ocorreu desde o período pré-colombiano pelos Ameríndios, originando assim a espécie de pupunheira hoje cultivada, *Bactris gasipaes* Kunth. A planta vem sendo utilizada também na produção de frutos os quais se constituem em importantes fontes alimentares para os povos de sua região de origem (BOVI, 1998).

De acordo com Chaimsohn (2000), palmeiras de pupunha são distribuídas em baixa densidade e ocorrem de forma espontânea entre os limites das regiões da Amazônia, noroeste de Honduras, região central da Bolívia, chegando à foz do rio Amazonas, estendendo-se até as Guianas, e chegando inclusive à costa do Pacífico, no Equador, e Colômbia. Para Mora-Urpí (1999), esta ampla distribuição foi, possivelmente, determinada pelo comportamento migratório das tribos indígenas que iniciaram seu cultivo nas regiões tropicais das Américas (Figura 1).

No Brasil a pupunheira é encontrada em toda a bacia Amazônica. Acredita-se que seja uma espécie muito modificada sob a influência humana, já que sua domesticação é atribuída a vários grupos indígenas. Estes, ao migrarem, selecionavam as árvores com melhores características, levando consigo sementes para onde fossem se estabelecer novamente. Segundo Mora-Urpí et al., (1997), tal agricultura migratória contribuía para formar novas populações com base genética muito restrita, o que permitia a fixação de genes. Segundo Chaimsohn (2000), plantios feitos pelas tribos indígenas ficavam, normalmente, isolados em

clareiras na floresta, o que reduzia o fluxo gênico e contribuía ainda mais para a fixação de genes.

Assim, tal processo de domesticação está relacionado, principalmente, à sua condição de alimento básico e indispensável na manutenção dos primeiros habitantes das Américas (CLEMENT, 1997).



Figura 1. Distribuição geográfica da Pupunheira.

2.2. Caracterização Botânica

A pupunheira, uma monocotiledônea, é uma planta perene e cespitosa (CLEMENT, 2000), podendo alcançar até 20 m de altura com diâmetro variando entre 15 e 30 cm Villachica (1996). A planta possui a capacidade de perfilhar, possuindo um sistema radicular fasciculado e superficial, apresentando baixa resistência à falta de água. De acordo com Parada (acesso, 2009), grande parte da biomassa radicular da pupunheira é encontrada nos

primeiros 20 cm do perfil do solo, por isso, não se recomenda a prática da capina, como forma de evitar danos mecânicos às raízes e a disseminação de doenças (Figura 2).

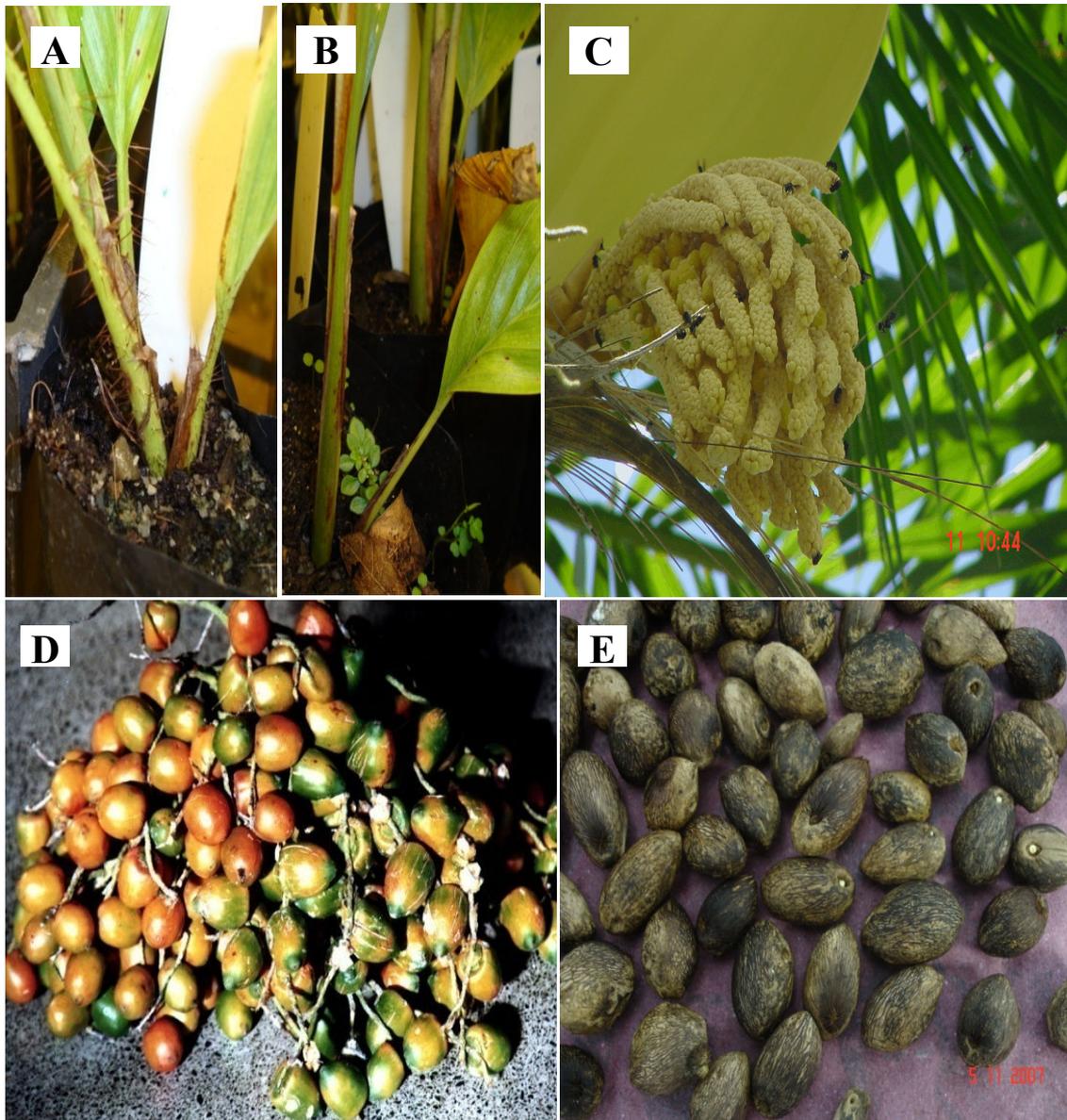


Figura 2. Aspectos botânicos da pupunheira (A-E). (A) estipe com; (B) e sem espinho; (C) flores masculinas e femininas; (D) variabilidade dos frutos num mesmo cacho verde a maduros; (E) sementes com variação no tamanho, coloração e formato.

Com relação à reprodução, a pupunheira é uma planta alógama e monóica, possuindo elevado grau de incompatibilidade (TONET et al., 1999). Tal fenômeno gera a partenocarpia muito comum na espécie, sendo freqüente a presença de frutos sem sementes em campos de produção (PARADA, acesso 2009).

2.2.1. Estipe

O estipe é cilíndrico e marcado por cicatrizes transversais, normalmente, deixadas pelas folhas que caem, podendo ou não ser recoberto por espinhos, os quais apresentam grande variação quanto ao tamanho, cor, diâmetro e local de ocorrência (Figura 2. A e B). Os espinhos podem ocorrer apenas nos folíolos, nos entrenós do estipe, ou nos pecíolos e folíolos. Segundo Villachica (1996), a presença de espinhos é uma característica primitiva que visa protegê-la contra danos mecânicos, além de evitar acúmulo de umidade que favorece o desenvolvimento de epífitos.

A parte terminal do estipe apresenta o meristema apical que é protegido por bainhas de folhas jovens, constituindo-se no palmito. As folhas têm de 2,5 a 4,0 m de comprimento com 200 a 300 folíolos cada. Em média uma planta adulta possui cerca de 20 folhas (TONET et al., 1999).

2.2.2. Inflorescência

A inflorescência mede cerca de 50 a 80 cm de comprimento e possui 20 a 60 espigas, as quais produzem de 50 a 1.000 flores femininas e de 10.000 a 30.000 flores masculinas, aparecendo entre o 3º e 4º ano após o plantio (TONET et al., 1999).

Mora-Urpí e Solis (1980), estudando a polinização da pupunheira, concluíram que as brácteas, folhas modificadas que encerram e protegem a inflorescência, se abrem geralmente no final da tarde, expondo a flor pistilada que fica receptiva de 24 a 48 horas (Figura 2C). Na tarde seguinte à abertura das brácteas, ocorre à antese das flores estaminadas, com seguidas liberações de pólen. Esse mecanismo faz com que prevaleça a fecundação cruzada entre flores de diferentes plantas.

Os autores enfatizaram que a polinização é feita predominantemente por insetos, principalmente da ordem coleóptera, havendo ainda a participação do vento e da polinização anemófila.

2.2.3. Frutos

Os frutos são drupas que, quando jovens, apresentam coloração verde, e quando maduros, são amarelos, vermelhos ou apresentam matizes dessas cores. De acordo com Clement (1997), os frutos maduros apresentam um epicarpo fibroso e um mesocarpo amiláceo

ou oleoso e úmido, com um endocarpo envolvendo um endosperma fibroso e oleoso (Figura 2D).

Os frutos apresentam também uma enzima que inibe a digestão de proteínas e um ácido, provavelmente oxálico, que causa irritação na mucosa da boca e é por isso que devem ser consumidos cozidos (TONET et al.,1999).

Villachica (1996), depois de observar grande variação no tamanho dos frutos, os agrupou em três categorias: i) microcarpa, com frutos pesando menos de 20 g; ii) mesocarpa, com frutos entre 21 e 70 g; e iii) macrocarpa, com frutos maiores que 70 g de peso. Considera-se que as formas mais primitivas da pupunheira são as que possuem frutos menores. Isso provavelmente está ligado ao tipo de seleção feita pelos ameríndios, direcionada para plantas com frutos maiores.

2.2.4. Sementes

As sementes são de cor café ou negra, e possuem endosperma branco e oleaginoso. Cada semente apresenta três poros, sendo apenas um fértil (PARADA, acesso 2009). As sementes variam segundo Mora-Urpí et al., (1997), de 1 a 4 cm de comprimento, por 1 a 2 cm de largura ou diâmetro, com peso entre 2 a 10 g.

Os formatos observados são delgado, ovóide, elíptico, cuneiforme, oblongo ou ainda arredondado. Em geral são localizadas na região central do fruto, sendo cobertas por fibras que lembram uma rede (CHAIMSOHN, 2000) (Figura 2E).

Estudos realizados por Ferreira e Santos (1992) demonstraram que as sementes são sensíveis à perda de umidades. Verificaram que a redução no teor de umidade de 45 para 30% foi suficiente para reduzir a emergência e o vigor, razão pela qual as enquadraram no grupo das recalcitrantes, ou intolerantes a grandes perdas de umidade. Semelhantemente, Carvalho e Muller (1998) mencionam 30% de umidade como nível de tolerância das sementes de pupunheira ao dessecamento.

2.3. Importância Econômica

O interesse pelo cultivo da pupunheira no Sul da Bahia aumentou com a crise da lavoura cacaueteira, motivando os produtores a buscarem novas alternativas para diversificar sua atividade agrícola, com ênfase em cultivos precoces, rentáveis e mercado em expansão.

A primeira introdução de pupunheira na Bahia foi realizada na Estação Experimental Lemos Maia – ESMAI / Ceplac, Una, Ba, em 1982. O estande foi implantado em 1983, em consórcio com pimenta do reino (*Piper nigrum*), cacau (*Theobroma cacao*), leucena (*Leucaena leucocephala*), abacaxi (*Ananas* sp) e outras culturas de ciclo curto, objetivando a produção de frutos. A partir do início da década de 90, com a divulgação da pupunheira como produtora de palmito, intensificou-se a busca por informações e por sementes para plantios em escala comercial, e a área passou a ser um campo de produção de sementes. Atualmente, mais de 600 empresas rurais na Bahia diversificaram suas atividades agrícolas com o cultivo da pupunheira para produção de palmito, com uma área cultivada estimada em 4500 ha, destes 3000 encontram-se em produção, principalmente, para extração de palmito.

Segundo Yuiyama e Chaves-Flores, (1996) a pupunheira entre as palmeiras produtoras de palmito, é a mais promissora pela sua precocidade, já que inicia a produção a partir de um ano e meio, e continua a produção por mais de 15 anos através dos perfilhos, da reprodução assexuada, ou via semente e reprodução sexuada. Dessa forma, a produção de palmito processado é superior, aumentando as possibilidades para a substituição das palmeiras nativas, viabilizando inclusive as exportações de produtos padronizados e de qualidade (TONET et. al, 1999).

Existem diversas possibilidades de aproveitamento da pupunheira, entre elas: i) os frutos podem ser consumidos cozidos, ou processados para a obtenção de farinha, utilizada na confecção de alimentos (CARVALHO et al., 1998); ii) o estipe pode servir como madeira, enquanto que as folhas, a polpa e as bainhas podem ser destinadas à alimentação animal (KULCHETSCKI et al., 2001) e; iii) as bainhas do palmito, um resíduo da indústria, constituem-se em um volumoso de alta qualidade, e o fruto apresenta potencial para substituir o milho na alimentação de ruminantes; IV) a entrecasca também pode ser triturada e usada em processo de compostagem, servindo de fertilizante orgânico (FERREIRA et al., 2005). Apesar de tantas possibilidades, o uso comercial mais nobre da pupunheira é a produção de palmito em conserva, bastante apreciado e consumido amplamente no Brasil e no exterior.

Segundo Tonet et al., (1999), a porção comestível da haste do palmito é formada pela parte basal ou caulinar; pela parte apical e; pela parte central, sendo que cada uma delas tem uma forma específica de consumo.

2.4. Condições Edafo-climáticas para Produção

Segundo Morsbach et al., (1998), a pupunheira se desenvolve melhor em regiões onde as temperaturas médias anuais situam-se entre 25 e 28 °C. É exigente em água e prefere regiões de precipitação acima de 1.600 mm anuais, bem distribuídos. Embora ocorra originalmente em florestas, é uma planta heliófila, necessitando de ampla luminosidade para o seu desenvolvimento, além de ser essencial na indução de perfilhos, primordiais para atingir elevada produtividade (MORA-URPÍ, 1999).

A ocorrência de ventos fortes provoca excesso de transpiração e redução no rendimento, além do tombamento de plantas novas devido ao seu sistema radicular superficial. Em algumas situações são eles tutores para evitar prejuízos maiores, entretanto, normalmente se recomenda o uso de quebra ventos a fim de proteger o cultivo. A ocorrência de geadas pode causar morte das plântulas em viveiros e no local definitivo até o primeiro ano de plantio, provocando também a queima das folhas em planta adultas (VIRGENS FILHO, 2002).

Plantios comerciais requerem solos com alta fertilidade natural ou que tenham recebido calagem e fertilização (TONET et al., 1999). De acordo com Bovi (1998), os solos para o cultivo da pupunheira devem ser, preferencialmente, de textura média a leve além de bem drenados. Solos compactados, sujeitos a encharcamento e de textura muito argilosa devem ser evitados, pois facilitam a ocorrência de doenças e dificultam o desenvolvimento do sistema radicular (VIRGENS FILHO, 2002). Segundo o autor, áreas planas ou levemente onduladas facilitam o manejo da cultura.

2.5. Principais Pragas e Doenças

As pragas que ocorrem na pupunheira são as mesmas observadas em outras palmáceas como coco (*Cocos nucifera*), dendê (*Elaeis guineensis*), piaçava (*Atalea funifera*), entre outras. Entre elas as que provocam maior dano são, os coleópteros *Rhynchophorus palmarum* e o *Metamasius hemipterus*. Em estágio larval abrem galerias, alimentando-se dos tecidos meristemáticos, podendo levar a planta à morte (Figura 3A) (PARADA, acesso 2009). Além dos danos físicos, os insetos podem também transmitir doenças como “anel vermelho” causado por nematóide, muito comum em plantios de coco e dendê, muito embora ainda não detectada em plantios de pupunhas.

Segundo Bergo et al., (2000), entre as doenças mais comuns da pupunheira, está a antracnose, que ataca mudas em viveiro e campo. A doença é

caracterizada por apresentar manchas escuras, circundadas por um halo amarelado (Figura 3B e C).

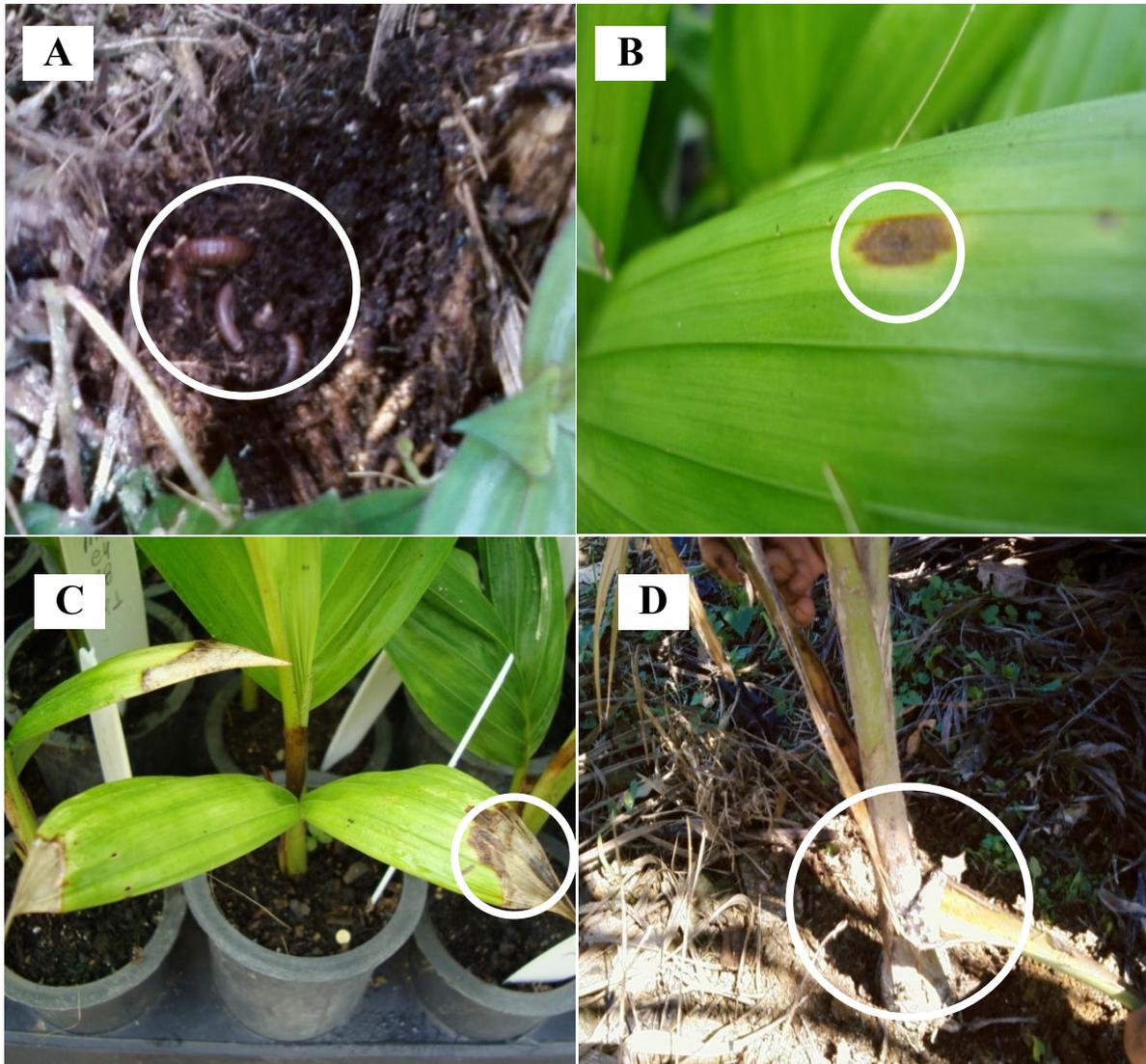


Figura 3. Pragas e doenças da pupunheira (A-D). (A) larvas de *Metamasius hemipterus* em restos do estipe; (B) e (C) Folha com sintomas de antracnose; (D) Mofo branco de *Fusarium* sp.

Segundo Santos et al., (2001), a fusariose causada por *Fusarium* sp. caracteriza-se pela podridão da medula ou coração do palmito, cujo sintoma reflexo causa clorose, murcha e a seca das folhas, devido a podridão da base, que se estende à medula e a todo o palmito, que adquire a coloração pardo-escura. No lado interno da bainha observa-se um mofo branco (Figura 3D), constituído pelo micélio do fungo.

Entre as doenças a que provoca maior dano econômico à pupunheira está a podridão-do-estipe, causado por *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. Os principais sintomas da

doença são caracterizados pelo amarelecimento e seca das folhas centrais, como resultado da podridão da base da planta, estendendo-se para a região do meristema apical (SANTOS et al., 2001).

2.5.1. Podridão-do-estipe da pupunheira e sua Etiologia

A podridão-do-estipe da pupunheira é causada por *Phytophthora palmivora* (Butler) (Butler) que pertence ao reino Straminipila, filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae (LUZ e MATSUOKA, 2001). O patógeno produz micélio denso e cottonoso, com esporangióforos delgados, simples ou pouco ramificados. Os esporângios são papilados, caducos, ovóides, medindo em média de 30 a 50 μm . Os zoósporos biflagelados são produzidos no interior dos esporângios. Clamidósporos, sempre presentes na espécie, apresentam diâmetro médio de 3,8 μm com espessura da parede de 0,2 μm (REZENDE; MARTINS, 2005) (Figura 4).

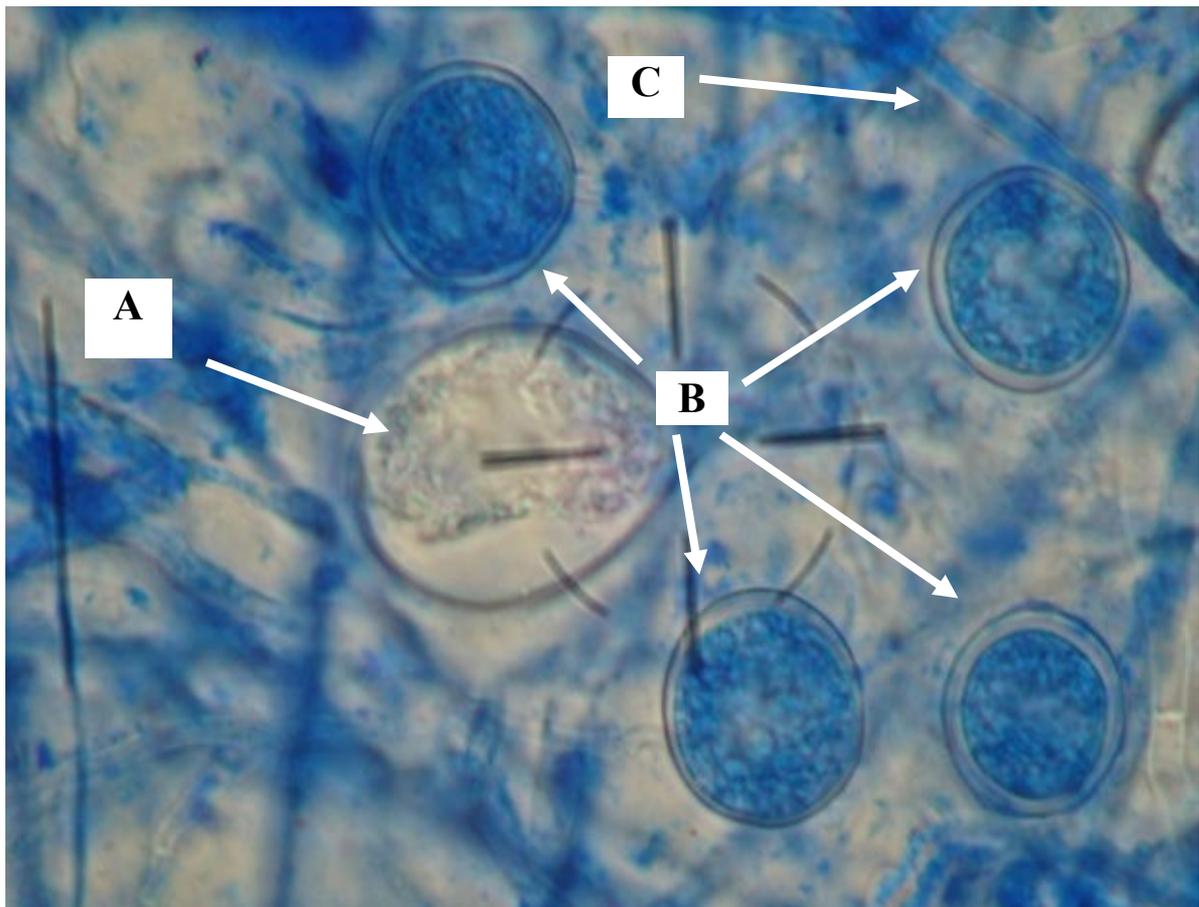


Figura 4. Estruturas de *Phytophthora palmivora* de pupunheira observada ao microscópio eletrônico (objetiva 40) (A-C). (A) esporângio; (B) clamidósporos e (C) hifas.

O patógeno causa podridão das raízes e caule, ocorrendo principalmente em locais úmidos, em condições que favorece o desenvolvimento de hospedeiro, preferencialmente em temperaturas ligeiramente baixas (BECHIMOL et al., 2001). Chuva e vento são os principais fatores de disseminação da doença. Os respingos de chuva são importantes na liberação dos esporângios de *P. palmivora* tanto da superfície dos tecidos infectados quanto do solo sendo então dispersos pelo vento. Períodos de 24 horas ou mais de saturação do solo favorecem a infecção.

Phytophthora palmivora, foi registrada em vários cultivos de valor econômico, em diversas regiões do Brasil (TONET et al., 1999; LUZ e MATSUOKA, 2001). Entre eles podridão de raízes e de frutos do mamoeiro provocando perdas significativas nos estados de Alagoas, Pernambuco, Maranhão e Bahia, tendo como agravante o fato que as cultivares comerciais não apresentam resistência a essa enfermidade (CARNAÚBA et al., 2006; SILVA, 2001). No cacaueteiro, a podridão-parda que é endêmica em todos os estados produtores brasileiros é causada por *P. palmivora*, embora ocorram outras duas espécies, sendo ela, entretanto, a mais prevalente em todo o mundo (LUZ e SILVA, 2001).

Em pupunheira, a doença ocorre de forma endêmica na região amazônica. Com a expansão do plantio a doença foi disseminada para outras regiões do país.

2.5.2. Ciclo da doença

O ciclo vital do patógeno está ilustrado na Figura 5. *Phytophthora palmivora* é uma espécie heterotática, só formando oogônio, anterídio e oósporos quando pareada com talos morfológicamente diferentes, conhecidos como tipos A1 e A2, (ASHBY, 1929; BRASIER E GRIFFIN, 1979; PAIM, 2005).

Segundo Luz e Campelo (1985), para haver infecção e desenvolvimento da doença em cacaueteiro são requeridas condições ambientais favoráveis, caracterizadas por alta umidade e temperatura média em torno de 24°C.

Com o crescimento das lesões, o patógeno esporula na sua superfície produzindo esporângios, que vão liberar esporos assexuais endógenos, uninucleares e biflagelados, os zoósporos que se locomovem em água através de flagelos para causar novas infecções (SANTOS et al., 2004; LUZ et al., 2008; MAGALHÃES, 2009).

No solo os zoósporos nadam em direção a regiões específicas de liberação de exsudatos nas raízes, encistando e emitindo tubos germinativos para iniciar a infecção e

provocar o apodrecimento das radículas, de todo o sistema radicular e do estipe (SILVA, 2001).

Em períodos desfavoráveis à doença, tais como seca, o patógeno desenvolve estruturas de sobrevivência, os clamidósporos, que são esporos assexuados de parede espessa e lisa (2 μm), que se comportam como esporos de resistência e que permitem sua sobrevivência no solo por longos períodos.

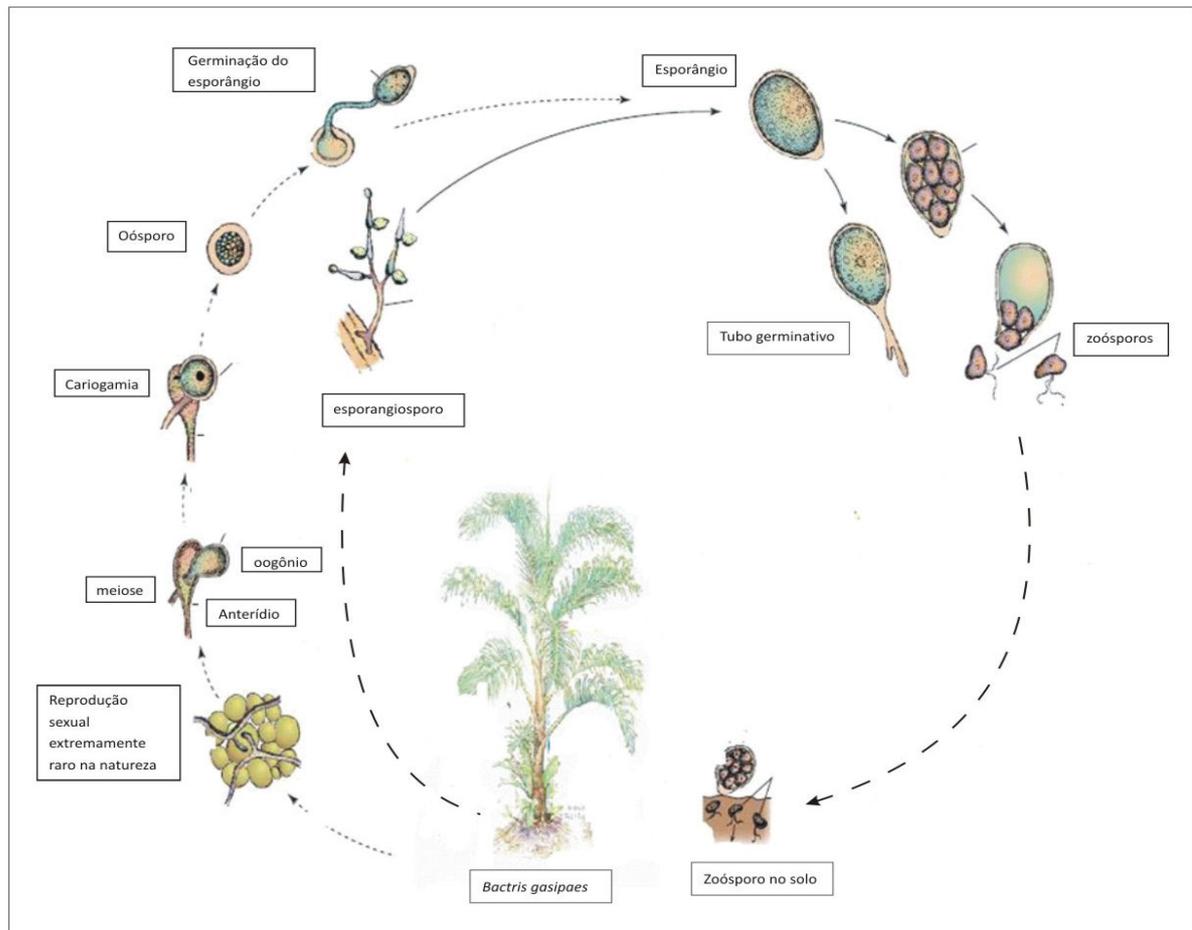


Figura 5. Ciclo vida de *Phytophthora palmivora* (Agris, 2005, modificado)

O patógeno pode retornar ao solo ou permanecer nos tecidos mortos do hospedeiro (BECHIMOL et al., 2001), reiniciando assim o ciclo da doença.

2.5.3. *Phytophthora palmivora*

Butler, em 1907, relatou *Pythium palmivorum* como o agente causal da podridão do broto de palmeiras na Índia, renomeando-o, em 1919, como *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, epíteto considerado válido para a espécie até os dias atuais (ERWIN e RIBEIRO,

1996). Amplamente distribuído em áreas tropicais e subtropicais do mundo (CHEE, 1973), infectando várias plantas, economicamente importantes, entre as quais: *Bactris gasipaes* Kunt., *Cocos nucifera* L., *Hevea brasiliense* Muel. Arg., *Theobroma cacao* L., *Carica papaya* L., *Piper nigrum* L., diversas espécies do gênero *Citrus*, de plantas ornamentais e de diversas fruteiras.

O patógeno produz nos tecidos doentes quatro tipos de propágulos infectivos: esporângios, zoósporos, clamidósporos e oósporos. Os esporângios apresentam formas variáveis, predominando os formatos elípticos e ovóides, são decíduos, com pedicelos curtos e papilas proeminentes. Os clamidósporos são globosos ou subglobosos, terminais ou intercalares. Os zoósporos, produzidos no interior dos esporângios, necessitam de água livre para se locomoverem e infectarem as plantas, constituindo-se em propágulos infectivos de *P. palmivora*. Os oósporos são esporos sexuais formados dentro do oogônio, após a fecundação da oosfera pelos anterídios, sendo igualmente estruturas de resistência que germinam produzindo esporângios ou micélio (LUZ et al., 2008).

Santos et al., (2004) relataram pela primeira vez, no ano de 2002, *P. palmivora* causando podridão do estipe da pupunheira, em Paranaguá, Paraná, em plantios com idades entre seis e 12 meses. Plantas atacadas exibiam, inicialmente, sintomas de amarelecimento da folha bandeira, posteriormente amarelecimento e seca das demais folhas (Figura 6 A). Ao se efetuar um corte transversal na base do estipe era observado o escurecimento dos tecidos internos com posterior podridão generalizada do estipe (Figura 6 B; C e D).

2.6. Controle biológico

Na agricultura tradicional o combate às enfermidades tem sido altamente dependente de agrotóxicos, que embora sejam eficazes em controlá-las podem, às vezes, ocasionar conseqüências indesejáveis como o seu uso nocivo, causando desequilíbrio ao meio ambiente e contaminando o solo e as fontes de água (LIMA et al., 2000).

No sucesso das estratégias de controle de uma determinada doença é essencial se conhecer o ciclo de vida do fitopatógeno (AGRIOS, 1998), para se saber onde e quando os agentes de biocontrole poderão atuar para reduzir a incidência da doença, pois não existem características únicas que possam ser identificadas neles para explicar a sua atuação. Os agentes de biocontrole apresentam vários mecanismos de ação (PUNJA et al., 2003).

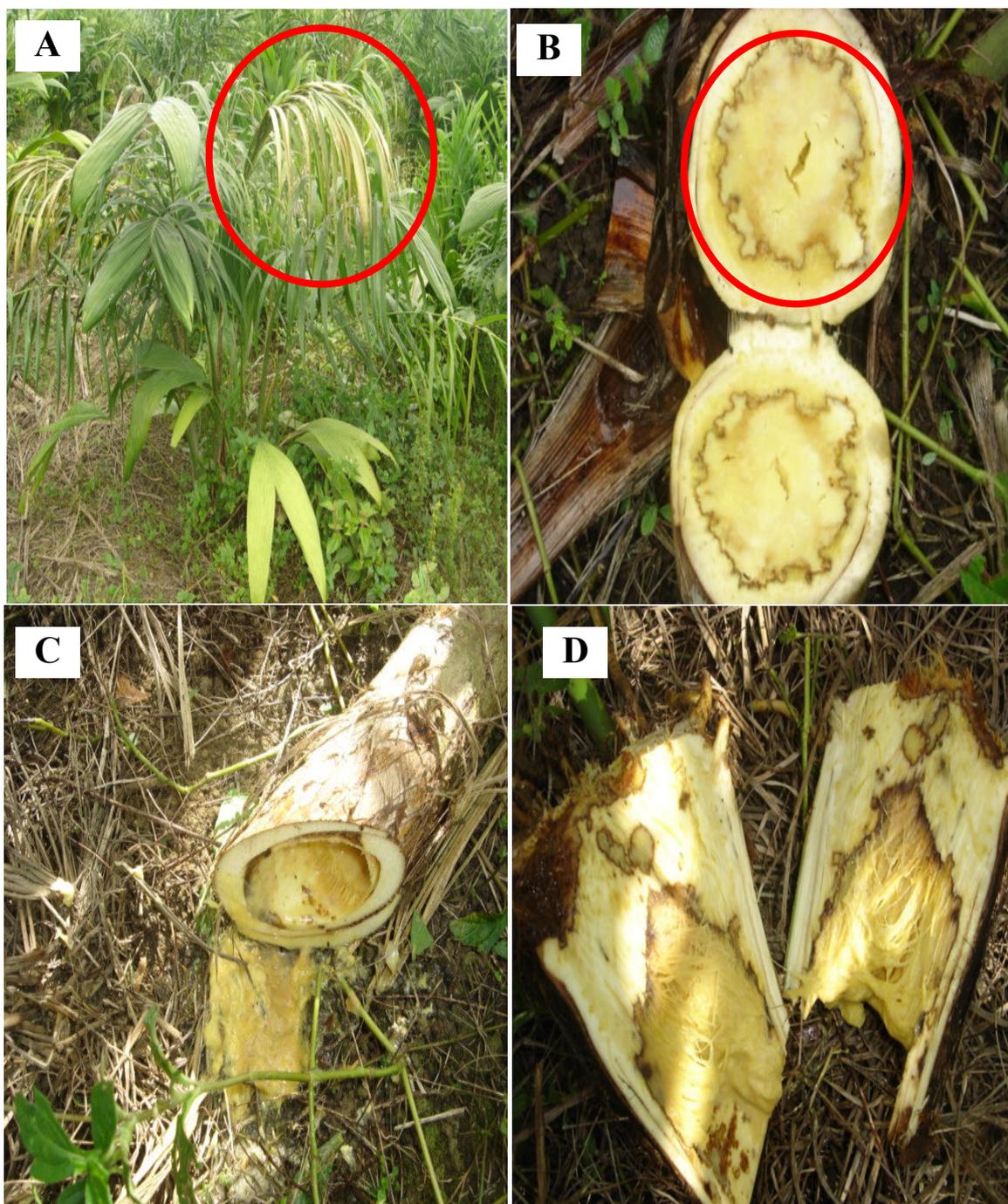


Figura 6. Sintomatologia da podridão-do-estipe: (A) Sintomas de amarelecimento da folha bandeira (B); (C) e (D) Sintomas de apodrecimento do colmo.

Os fungos antagônicos podem interferir em alguma etapa do ciclo de vida do fitopatógeno impedindo que este se complete. Tal participação pode se dar através de diversos mecanismos de ação como: prevenção à infecção, redução na colonização dos tecidos do

hospedeiro, redução na esporulação como também na sobrevivência do fitopatógeno, proporcionando assim níveis variáveis de controle (PUNJA et al., 2003).

A utilização do controle biológico em condições de campo visa evitar a penetração dos fitopatógenos nos tecidos e seu posterior desenvolvimento durante o armazenamento de frutos e hortaliças, por exemplo. O seu uso após a colheita tem dois objetivos: evitar que os fitopatógenos latentes nos tecidos causem lesões ou impedir novas infecções (BETTIOL et al., 1995).

Carabi-Adell (2003) enfatiza o sucesso de diversos fungos como agentes de biocontrole, principalmente, de patógenos de solo, tais como: *Rhizoctonia solani*; *Sclerotium rolfsii*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. Como exemplos citam-se: *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*; *T. viride*; *T. hamatum*; *T. virens* e *T. pseudokoningii*, além de muitos outros apontados como potenciais.

Pesquisas têm demonstrado que fungos epífitas ou saprófitas, normalmente, presentes no interior ou próximo às folhas e raízes, ao utilizar os nutrientes disponíveis, também apresentam características potenciais para serem utilizados como agentes de biocontrole.

2.6.1. Mecanismos de ação dos agentes de biocontrole

Os agentes de biocontrole podem atuar interferindo na sobrevivência e em atividades relacionadas à patogênese, tais como: crescimento, infectividade, virulência, agressividade, além de aumentar a resistência da planta hospedeira (AGRIOS, 2005). Os mecanismos envolvidos no processo são: parasitismo, antibiose, hipovirulência, predação, competição, além de indução de resistência, podendo ainda atuar em sinergia durante a interação antagônica (MELO, 1998). Ademais, eles não são mutuamente exclusivos ou excludentes, uma vez que sua importância relativa pode variar de acordo com as condições ambientais e com o estado de desenvolvimento do agente biocontrolador e do fitopatógeno (MICHEREFF, 2001).

O agente antagônico apresenta alta capacidade de mobilização dos nutrientes do solo ou daqueles associados às raízes das plantas. Alguns autores definem tais espécies como simbioses, as quais produzem combinações que estimulam o crescimento e os mecanismos de defesa das plantas. Grande parte desses agentes pode exercer habilidade antagônica através do ácido harziânico, alameticinas, tricholinas, antibióticos, 6-pentil-pirano, massoilactona, viridinas, gliovirinas, glisopreninas, ácido heptelídico, além de outros metabólitos que podem

ser voláteis ou não. Também podem atuar através de combinações de enzimas hidrolíticas quitinases, glucanases, proteases, além de antibióticos que resultam em níveis elevados de antagonismo quando comparados à sua ação isolada (TAVARES, 2009).

2.6.1.1. Parasitismo

Fenômeno pelo qual determinado microrganismo se nutre de estruturas vegetativas e/ou reprodutivas de outro. Os hiperparasitas atacam hifas, estruturas de resistência e de reprodução dos fitopatógenos (MICHEREFF, 2001). Já o micoparasitismo, requer que os biocontroladores estejam fisicamente próximos dos fitopatógenos. Este tipo de mecanismo é comum na relação entre *Trichoderma* com outros fungos, incluindo *Fusarium oxysporum*, onde é observado o enrolamento de hifas, sítios de penetração, invasão de hifas e crescimento intracelular (MELO, 1991).

2.6.1.2. Antibiose

Antibiose é a interação entre microrganismos onde um ou mais metabólitos produzidos por um deles têm efeito danoso sobre o outro. Algumas espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos, voláteis ou não-voláteis, que impedem a colonização de fungos fitopatogênicos. A produção de compostos antibióticos é característica de muitos fungos utilizados como agentes de biocontrole (BETTIOL, 1991). Os principais efeitos induzidos por eles são: atividades dos tipos antifúngica, antibacteriana, antiviral, imunossupressora, citostática e inibidora de ATP (MELO, 1998). Um dos fatores atribuídos a essa alta capacidade de biocontrole deve-se à produção de enzimas líticas, extracelulares, degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como: quitinases, celulasas, β -1,3-D-glicanases, β -1,4-glicosidases e proteases, que compõem outro grupo de substâncias bastante analisadas em virtude do potencial de utilização deste microrganismo como agente de controle biológico. Tal controle pode ser realizado tanto por inibição como pela destruição dos propágulos (MELO, 1998).

A produção de enzimas extracelulares atua como filtro para determinadas moléculas e funciona como receptores para hormônios e toxinas. Terá sucesso o antagonista que tiver êxito em romper a parede celular do fitopatógeno ou interromper os processos relacionados à

sua síntese. A produção de enzimas capazes de hidrolisar os componentes da parede celular pode desempenhar um importante papel no processo antagônico (BONFIM, 2007).

2.6.1.3. Competição

Competição é a interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação, concorrendo principalmente por alimentos, nitrogênio, fatores de crescimento, espaço e oxigênio (MICHEREFF, 2001). Fitopatógenos, normalmente, necessitam de sítios de entrada para terem acesso ao interior dos tecidos do hospedeiro. No caso de parasitas obrigatórios, a penetração é direta através da cutícula e epiderme; enquanto que nos facultativos, fungos saprofiticos, a entrada se dá através de lesões, tecidos em senescência ou por aberturas naturais tais como: estômatos e lenticelas. Tais locais, de forma geral, são ricos em nutrientes em decorrência da exudação de açúcares e aminoácidos. Alguns microrganismos têm capacidade de competir por estes sítios de infecção ao utilizar nutrientes, deslocar o patógeno e impedir a germinação e infecção (BONFIM, 2007). No caso do controle da podridão do pé do mamoeiro, o agente de biocontrole precisa ser altamente competitivo para estabelecer-se no solo e impedir a ação do patógeno (TOCAFUNDO, 2008).

2.6.1.4. Indução de resistência

Este é um método de controle desencadeado através da produção de moléculas eliciadoras, compostos sinalizadores e substâncias promotoras de crescimento envolvendo estímulos desencadeados pela introdução de organismos não patogênicos ou de seus metabólitos ou mesmo pela ação de linhagens fracas ou avirulentas do patógeno (MICHEREFF, 2001).

2.6.2. Gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* apresenta potencial para a utilização em diversas áreas de interesse agrícola, ambiental e industrial. É de ocorrência mundial em quase todos os tipos de solos e em outros habitats naturais, especialmente, naqueles contendo ou consistindo de matéria orgânica. Pode ser encontrado também na superfície de raízes, em restos vegetais, ou ainda sobre estruturas fúngicas (BONFIM, 2007).

Muitas espécies do gênero são reconhecidas como organismos controladores, presentes no solo e em ambientes florestais, já que estão envolvidos em processos de decomposição da matéria orgânica, na reciclagem de nutrientes e na regulação da microbiota associada (ESPOSITO e SILVA, 1998). Decompondo compostos xenobióticos e degradando compostos clorofenólicos e photodioldrin em produtos não tóxicos e solúveis em água (TABET e LICHTENSTEIN, 1976; BONFIM, 2007).

Várias espécies de *Trichoderma* já vêm sendo usadas em formulações comerciais para o controle biológico de fungos fitopatogênicos, reduzindo a necessidade da aplicação de produtos químicos. *Trichoderma harzianum* é um exemplo, utilizado para controlar o apodrecimento pós-colheita da maçã. Uma linhagem de *T. harzianum* (AG2), obtida a partir de fusão de protoplastos, vem sendo utilizada no controle de um grande número de doenças transmitidas via solo (HARMAN, 1990). Outra formulação a base de *Trichoderma virens* (GlioGard) vem sendo utilizada na prevenção do tombamento de plântulas causado por espécies de *Pythium* e *Rhizoctonia* (LUMSDEN e LOCKE, 1989).

A influência de *Trichoderma* spp. no crescimento de plantas e no aumento da produtividade ocorrem, segundo Harman et al., (2004), graças à sua capacidade em colonizar as raízes. Por exemplo, o *T. harzianum* foi efetivo na indução à formação de raízes em tomateiro, tanto quanto, um hormônio comercial, provocando também aumento no comprimento de raízes de soja e milho, além de aumentar a produtividade de pimentão, comparado com plantas não tratadas (HARMAN, 2000).

A promoção de crescimento provocada por microorganismos de solo ocorre devido à ação de vários fatores ainda pouco conhecidos. Pode envolver a produção de hormônios vegetais e vitaminas ou ainda a conversão de materiais a uma forma utilizável pela planta, facilitando também a absorção e translocação de minerais e o controle de patógenos (KLEIFELD e CHET, 1992).

2.6.3. Espermosfera e rizosfera

De acordo com Kennedy (1998), a primeira vez que se utilizou o termo rizosfera foi em 1904 para descrever a zona do solo sob a influência das raízes. Essa é uma zona de transição difícil de ser demarcada e é justamente nesta área onde se encontra a maior atividade microbiana do solo e onde os microrganismos desenvolvem melhor.

Segundo Luz, (1998) sementes ao sair da fase de dormência e iniciar o processo de germinação, exsudam compostos que são responsáveis pelas interações plantas microorganismos e microorganismos-microorganismos. Os fungos constituem a maior parte da biomassa microbiana da espermosfera, embora em menor número que as bactérias, podendo também estar presentes protozoários, microalgas e nematóides.

A rizosfera é uma região de alta diversidade tanto em quantidade de microorganismos quanto em atividade microbiana, sendo sua interação com as raízes bastante complexa e capaz de influenciar diretamente no desenvolvimento das plantas. Os efeitos benéficos se refletem na fixação de nitrogênio, estabilização do solo e disponibilidade de água enquanto os maléficos podem originar doenças, fitotoxicidades, interferir no fluxo de nutrientes, liberação de enzimas, alelopatia e competição. Só ocorrendo o último caso se houver desequilíbrios entre eles com relação à umidade, temperatura, tipo de solo, exsudatos da semente, fertilizantes e produtos empregados no tratamento de semente (KENNEDY, 1998; LUZ, 1998; TAVARES, 2009).

2.6.4. Controle biológico de *Phytophthora* sp.

Segundo Roiger e Jeffers (1991), o uso do fungo antagonista *Trichoderma* sp. é uma importante opção para auxiliar no manejo integrado da podridão do colo da macieira (*Phytophthora* spp.), sendo recomendado, que seja realizada primeiramente a desinfestação do solo, com alguns produtos, antes da incorporação do controle biológico.

Dianese et al. (2006) encontraram que dois isolados de *Trichoderma* spp., cen162 e cen235, foram eficazes sobre *P. palmivora* em mudas de mamoeiro.

Segundo Boneti e Katsurayama (2001) microorganismos que se apresentam como antagonistas *in vitro*, nem sempre se comportam bem em condições de campo. Testes *in vitro* realizados por Tocafundo (2008) ilustram bem este fato. De 18 isolados de *Trichoderma* spp. avaliados, encontrou-se que 14 foram capazes de inibir o crescimento micelial de *P. palmivora*, entretanto, quando avaliados sobre frutos, apenas dois, um de *Trichoderma stromaticum*, (2995) e outro de *T. asperellum*, (SF04), mostraram-se promissores. Por outro lado, em avaliações em casa-de-vegetação, utilizando-os para controlar *P. palmivora* em mudas de mamoeiro, não foi observada qualquer ação consistente não só no controle da doença, quanto no desenvolvimento das mudas.

Tavares (2009), por outro lado, obteve resultados positivos no controle da podridão das raízes do mamoeiro com dois isolados de *Trichoderma* spp., um de *T. harzianum* e outro de *T. virens*, que adicionalmente apresentaram efeitos estimulantes no crescimento das mudas.

Em função da falta de estudos de controle de *P. palmivora* em pupunheira utilizando-se agentes de biocontrole, a despeito do uso freqüente de BCAs, preconizados para outros fitopatógenos na cultura da pupunheira no sul da Bahia, e considerando-se as elevadas perdas provocadas pela doença em viveiros, é que se decidiu avaliar e selecionar entre os isolados de *Trichoderma spp* pertencentes à coleção do CEPEC/CEPLAC, aqueles mais promissores.

3. CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA INOCULAÇÃO DE *Phytophthora Palmivora* EM PLÂNTULAS DE PUPUNHEIRA

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar métodos de inoculação e concentrações de zoósporos de *Phytophthora palmivora*, para utilização em estudos de resistência à podridão-do-estipe da pupunheira. O isolado 870 de *P. palmivora* oriundo de Una, da coleção Arnaldo Medeiros CEPLAC/CEPEC, BA, foi utilizado. O experimento foi instalado em blocos casualizados com 10 plântulas por tratamento e cinco repetições, totalizando 50 plântulas para cada método e concentração de inóculo utilizada. Os métodos foram: imersão do sistema radicular em 500 mL da suspensão de zoósporo; irrigação do substrato em torno do coleto da plântula com 1 mL do inóculo; inundação + irrigação com 1 mL da suspensão de inóculo; e irrigação com 30 mL de água e em seguida com 2 mL da suspensão do inóculo. As concentrações de inóculo testadas foram: 0 (zero), 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos/mL, sendo o experimento repetido duas vezes. Aos 75 dias após a inoculação, foram avaliadas a altura da parte aérea, o comprimento do sistema radicular e as massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular das plântulas. Na análise da variância para determinação das melhores concentrações em cada método por variável patométrica avaliada, foi utilizada a regressão polinomial, sendo as médias das variáveis comparadas pelo teste Tukey ($p > 0,05$). Todos os métodos de inoculação testados causaram alterações fisiológicas nas plântulas, independentemente das concentrações de inóculo utilizadas, no entanto, o método de imersão do sistema radicular nas suspensões de inóculo 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos/mL foi o mais drástico. Na avaliação da resistência no patossistema *P. palmivora* x pupunheira deve ser

utilizado 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.

Palavras-chave: Podridão-do-estipe, metodologia de inoculação, resistência, *Bactris gasipaes*

EVALUATION OF METHODS TO INOCULATE *Phytophthora palmivora* ON PEJIBAYE SEEDLINGS

ABSTRACT

This paper aims to evaluate inoculation methods and zoospores concentrations of *Phytophthora palmivora* (*Pp*) for utilization in resistance studies against pejibaye foot rot. The isolate 870 of *Pp* from the municipality of Una, Bahia, Brazil, deposited in the Phytophthora collection “Arnaldo Medeiros” CEPLAC/CEPEC was used. An experiment was set in randomized block design with 10 plants per treatment and five replications, totaling 50 seedlings for each method and inoculum concentration. The methods were: root deeping in 500 mL of zoospore suspension; irrigation of the substrate around the plant 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. The inoculum concentrations tested were: 0 (zero), 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 zoospore/mL. The experiment was repeated twice. After 75 days of the inoculations the height of the canopy, the length of the root system and the weight of aerial and root system of the plants were assessed. For variance analysis the polynominal regression was used to determine the best concentration in each method per pathometric variable evaluated. The average of the means where then compared by Tukey test ($p \geq 0,05$). All methods of inoculation caused physiological alterations in the plants independently of the inoculum concentration used. However, the root deeping method was the most drastic one. To evaluate resistance in the *P. palmivora* x pejibaye pathosystem is recommended the method of irrigating 1 mL of the zoospore suspensions around the stem base of the plants in the concentration of 5×10^5 zoospore/mL.

Keywords: Heart rot, methodology of inoculation, resistance, *Bactris gasipaes*.

3.1 INTRODUÇÃO

O cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) para produção de palmito vem despertando o interesse de agricultores de todo o país, desde a década de 70. Isso se deve, à alta demanda tanto interna quanto externa, de palmito de boa qualidade e à alta lucratividade do setor (BOVI, 2000). Devido ao potencial comercial, muitos países latino-americanos estão investindo no seu cultivo e industrialização (VILLACHICA, 1996). Dois fatores têm contribuído para este aumento: a existência de mercado a nível mundial e a disponibilidade de tecnologia para o cultivo e industrialização (VERRUMA-BERNARDI, et al., 2007).

Em 2008, o Brasil exportou 1.624 toneladas de palmito, o que corresponde a US\$ 7,1 milhões, sendo que a maior parte destas exportações foi destinada para os Estados Unidos, com 1.072 toneladas (66% do total), e para a França, com 133 toneladas (AGRIANUAL, 2009).

A produção de palmito no Brasil em 2007 foi de 61.429 toneladas, o que representa uma área colhida de 10.035ha. As regiões Centro-Oeste e Nordeste são responsáveis por 78,5% dessa produção, com os estados de Goiás e Bahia se destacando nessas regiões e a nível nacional, com uma produção de 23.092 e 21.253 toneladas, respectivamente (IBGE, 2007).

A tendência de crescimento do mercado de palmito de pupunha tende a reduzir drasticamente o extrativismo das palmáceas nativas. O incentivo à preservação de tais espécies vem ocorrendo desde a década de 70, e ao longo dos anos, a busca pelo consumo de alimentos produzidos sem imposição de dano ambiental, tem aumentado. Essa tendência vem propiciando ganhos relevantes ao meio ambiente, evitando que muitas espécies sejam extintas, além de possibilitar o surgimento de outras oportunidades de negócios, alicerçadas em práticas agrícolas com responsabilidade social (ANEFALOS, et al., 2009).

De acordo com o IBGE (2007), desde a década de 90 tem diminuído o extrativismo vegetal das palmeiras juçara (*Euterpe edulis* Mart.) e açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) no

Brasil, enquanto, o cultivo da pupunheira aumentou predominantemente. Especificamente, no período de 2000 a 2005, houve um incremento de aproximadamente 157% da área plantada com palmeiras produtoras de palmito.

Doenças tem se constituído no principal fator limitante ao aumento da produção e exportação de palmito. Dentre os problemas fitossanitários causados por patógenos, o mais importante é a podridão-do-estipe, causada por *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. Este patógeno é onívoro, de ocorrência registrada em diversas regiões do Brasil, e também em outras culturas de valor expressivo, como: cacauzeiro, plantas cítricas, coqueiro, cupuaçuzeiro, mamoeiro, pimenta-do-reino e seringueira (BENCHIMOL et al., 2001).

Os sintomas da podridão-do-estipe se manifestam como clorose e seca das folhas, resultantes do apodrecimento dos tecidos da base do estipe, os quais adquirem coloração pardo-escuro, evoluindo posteriormente, para a morte da planta. O processo de patogênese de *P. palmivora* em pupunheira ainda é pouco estudado, no entanto, a produção de enzimas que maceram e degradam a parede celular do hospedeiro, pode ter importante papel na colonização dos tecidos pelo patógeno. Apesar de metabólitos tóxicos terem sido isolados de culturas do patógeno, não foi demonstrada ainda a sua participação na colonização do hospedeiro (BENCHIMOL et al., 2001).

De acordo com Luz (1989), *Phytophthora* spp. têm um complicado ciclo de vida por apresentar quatro tipos de esporos, incluindo os zoósporos, que são esporos móveis, produzidos no interior dos esporângios, os clamidósporos e os oósporos. Os três primeiros tipos são assexuais, e o último é resultado da reprodução sexual que ocorre quando dois talos de compatibilidade sexuais opostos se unem. Os zoósporos são considerados os mais importantes esporos na infecção dos hospedeiros de *P. palmivora*, requerendo água livre para garantir a sua movimentação e penetração nas plantas.

Segundo Benchimol et al. (2001), no Pará, a podridão-do-estipe da pupunheira, endêmica na região amazônica, tende a agravar-se devido a pressão de seleção para cultivares do tipo sem espinho no estipe, característica desejável para produção de palmito por facilitar a colheita. Esta característica parece estar presente em plantas aparentemente menos resistentes à doença. Com a expansão do plantio da pupunheira para outras regiões do país, a doença passou a ocorrer também nestas novas áreas cultivadas. Santos et al., (2004) relataram a doença no Paraná, no ano de 2002, constatando a morte de plantas com idade entre seis e 12 meses. Na Bahia, onde existem cerca de 4.500 ha plantados, as perdas são principalmente de plântulas em viveiro, mas ocorrem também no campo (SANTOS e LUZ, 2007).

A literatura sobre métodos de inoculação para o patossistema pupunheira x *P. palmivora* é escassa. Por isso, na avaliação de um grande número de materiais visando resistência à doença torna-se essencial a seleção de um método de inoculação que se assemelhe a realidade da infecção no campo. Para a podridão-do-pé em mamoeiro, doença causada pelo mesmo patógeno, diversos métodos de inoculação já foram adotados: imersão do sistema radicular em suspensão de zoósporos ou esporângios; irrigação de suspensões de zoósporos ou de clamidósporos diretamente no substrato ao redor do colo da planta (TRUJILLO; HINE, 1965; SILVA, 2001; SANTOS, 2009); infestação do solo, antes do plantio com suspensão de zoósporos ou clamidósporos (RAMIREZ; MITCHELL, 1975); e utilização de solo naturalmente infestado para cultivar plântulas do hospedeiro (DIANESE, 2006).

Em pupunheira não foram encontrados relatos de inoculação com *P. palmivora* a exceção do apresentado por Varjão et al., (2008), que utilizaram o método de encharcamento do solo por 1 hora e aplicação da suspensão de zoósporos (5×10^5) ao redor do coleto da plântula. Também não foram encontrados registros na literatura de testes para determinação da concentração de zoósporos adequada para inocular pupunheira. No entanto, para o mamoeiro, as concentrações 5×10^4 e 10^5 zoósporos por mL são recomendadas para testar material para avaliar resistência a *P. palmivora* (SANTOS, 2009).

Com os objetivos de testar quatro métodos de inoculação e três concentrações de inóculo foi realizado este trabalho visando estabelecer uma metodologia de inoculação que pudesse ser utilizada em seleções futuras de materiais genéticos de pupunheira quanto à resistência a *Phytophthora palmivora*.

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em laboratórios e casa-de-vegetação do CEPEC/CEPLAC, em Ilhéus, Bahia, contando com o apoio da empresa INACERES, da cooperativa COOPAM e de outros produtores de pupunha do sul da Bahia, que gentilmente cederam as mudas utilizadas nos experimentos.

3.1.1. Preparo das plântulas

No preparo das mudas foi retirada a mucilagem das sementes com água, aplicado cloro puro, e depois de secas colocadas no germinador com areia lavada e esterilizada, durante dois

meses. Ao final desse período, após o início da germinação, foram removidas cuidadosamente e transplantadas para tubetes (288 cm³) contendo o substrato: areia 10%; solo 10%; Plantimax 20%; fibra de coco 60%; Endurene 2,5kg/m³; supertríplo 1,2kg/m³; FTE – Br 0,2 kg/m³ e KCl 500g/m³. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação, e o sistema de irrigação automatizado ligado conforme as condições climáticas: nos dias de pleno sol, o sistema era ligado três vezes ao dia, com um turno de irrigação de 10 minutos e, nos dias chuvosos, desligado (Figura 7).

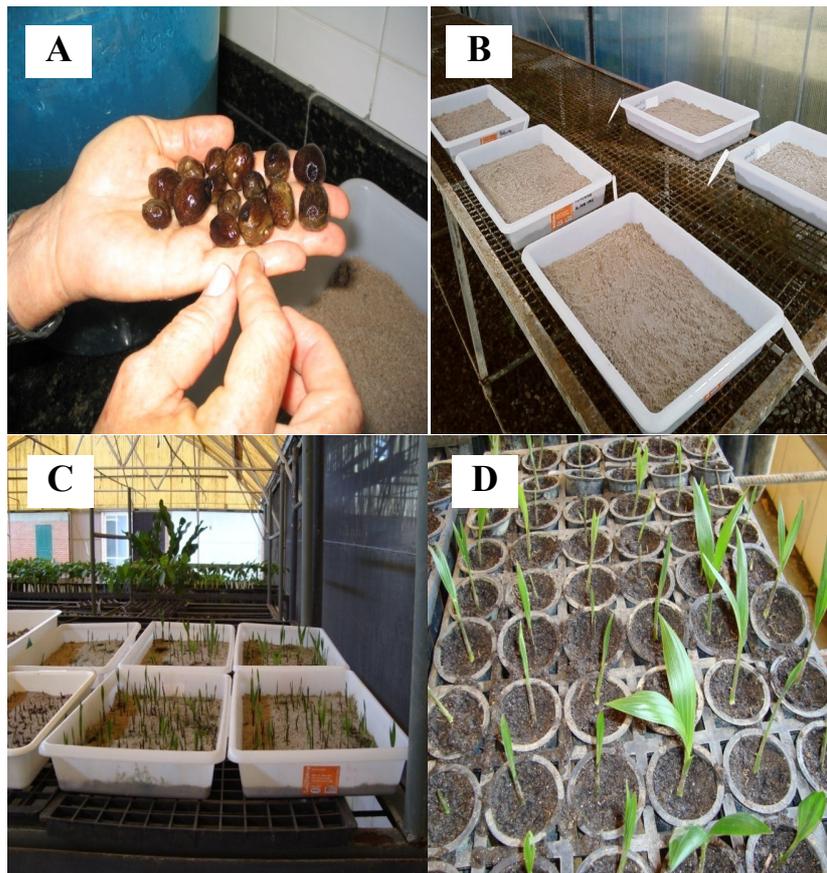


Figura 7. Detalhes do processo de preparo das mudas: (A) escolha das sementes; (B) banco germinador de areia tinalizado; (C) plântulas no banco germinador por três meses e (D) plântulas transplantadas.

3.1.2. Preparo do inóculo

Nos ensaios foram selecionados cinco isolados de *Phytophthora palmivora*, 870, 1086, 401, 859 e 524, obtidos de pupunheira no sul da Bahia e pertencentes à coleção Arnaldo Medeiros do CEPEC/CEPLAC. Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo o meio seletivo para *Phytophthora* PARPH (pimaricina, 10mg; ampicilina, 250 mg; rifampicina, 10mg; PCNB, 100mg; cornmeal-ágar, 17 g; água p.s.p. 1000 mL)

(KANNWISCHER e MITCHELL, 1978). Depois de três dias, as colônias foram repicadas para meio de Cenoura Agar (CA), realizando-se o teste de liberação de zoósporos para selecionar os de maior liberação. O isolado 870, obtido da Inaceres, Uruçuca, BA, foi o escolhido para ser utilizado nos experimentos de inoculação.

Na produção de inóculo os isolados foram repicados para CA, e incubados a 25 °C durante oito dias, sob luz constante. Ao final deste período, 8 mL de água destilada esterilizada e gelada foram adicionados a cada placa, sendo estas, colocadas em geladeira por 20 minutos para liberação dos zoósporos. As placas foram então mantidas à temperatura ambiente, durante 25 minutos.

A suspensão de zoósporos de cada placa foi vertida cuidadosamente em um béquer o qual foi então mantido na geladeira para evitar a germinação dos zoósporos. Uma alíquota foi retirada para que fosse aferida, a concentração de zoósporos com o auxílio de um hemacitômetro. Posteriormente, a suspensão foi ajustada para as concentrações de 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos/mL.

3.1.3. Inoculações de *Phytophthora palmivora* em pupunheira.

As plântulas a serem inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação, à temperatura média de 27°C, até a época da inoculação aos quatro meses de idade. Foram testadas quatro concentrações de inóculo: zero (testemunha), 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 zoósporo/mL e quatro métodos de inoculação:

Método 1- Imersão das raízes em suspensão de zoósporos

As plântulas de pupunha foram cuidadosamente retiradas dos tubetes para não causar danos ao sistema radicular, lavadas em água corrente, e o sistema radicular imerso por 20 minutos nas respectivas suspensões de zoósporos, de acordo o tratamento. A seguir foram transplantadas para os tubetes, sendo mantida a irrigação diária. As testemunhas foram submetidas ao mesmo procedimento excetuando que o sistema radicular foi imerso em água destilada e esterilizada (Figura 8).

Método 2 – Inundação com saturação do solo com água

Os tubetes contendo as plântulas de pupunha foram imersos em água até o nível da superfície para atingir o ponto de saturação, por uma hora. Em seguida, o solo foi irrigado em torno do coleto das plantas com 1 mL da suspensão de zoósporos nas respectivas

concentrações. As plantas inoculadas permaneceram imersas por mais uma hora, sendo a seguir retiradas, lentamente, da água e mantidas novamente em casa de vegetação com irrigação diária após o segundo dia da inoculação (Figura 9).

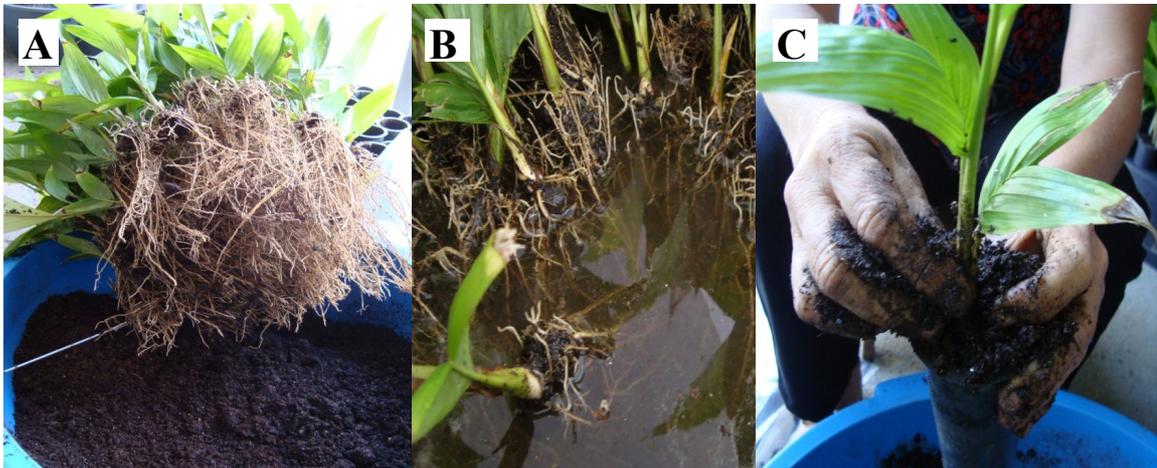


Figura 8. Detalhes do método 1: (A) plântulas recém removidas dos tubetes; (B) imersão das raízes no inóculo; (C) replantio das mudas

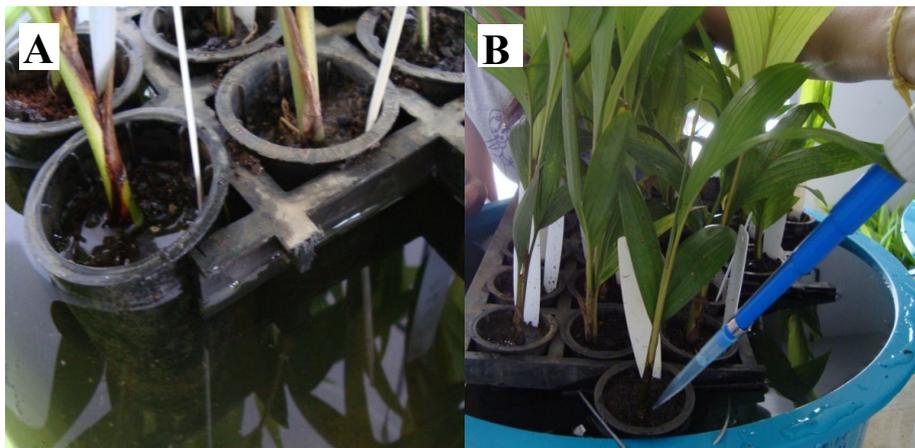


Figura 9. Detalhes do método 2 (Inundação): (A) plântulas imersas em água para saturação do solo (B) detalhes da inoculação de 1 mL da suspensão de inóculo, em torno do coleto das plantas.

Método 3- Irrigação do solo com a suspensão de inóculo

As plântulas foram inoculadas próximo ao coleto através da irrigação de 1 mL da suspensão de zoósporos nas concentrações pré determinadas, sendo mantidas plantas como testemunhas (sem acesso ao inóculo). As plântulas foram então mantidas em casa-de-vegetação com regime diário de irrigação após o segundo dia da inoculação (Figura 10).

Método 4- Irrigação da superfície do solo com 30 mL de água destilada antes da inoculação

Foram adicionados 30 mL de água destilada em torno do coleto das plântulas e em seguida 2 mL da suspensão de zoósporos nas respectivas concentrações de acordo com o tratamento. As plântulas testemunhas ao invés do inóculo receberam 2 mL de água estéril. Ao final da inoculação as plântulas foram colocadas novamente em casa de vegetação com irrigação após o segundo dia da inoculação (Figura 11).



Figura 10. Detalhes do método 3: Irrigação com inóculo na superfície do solo.

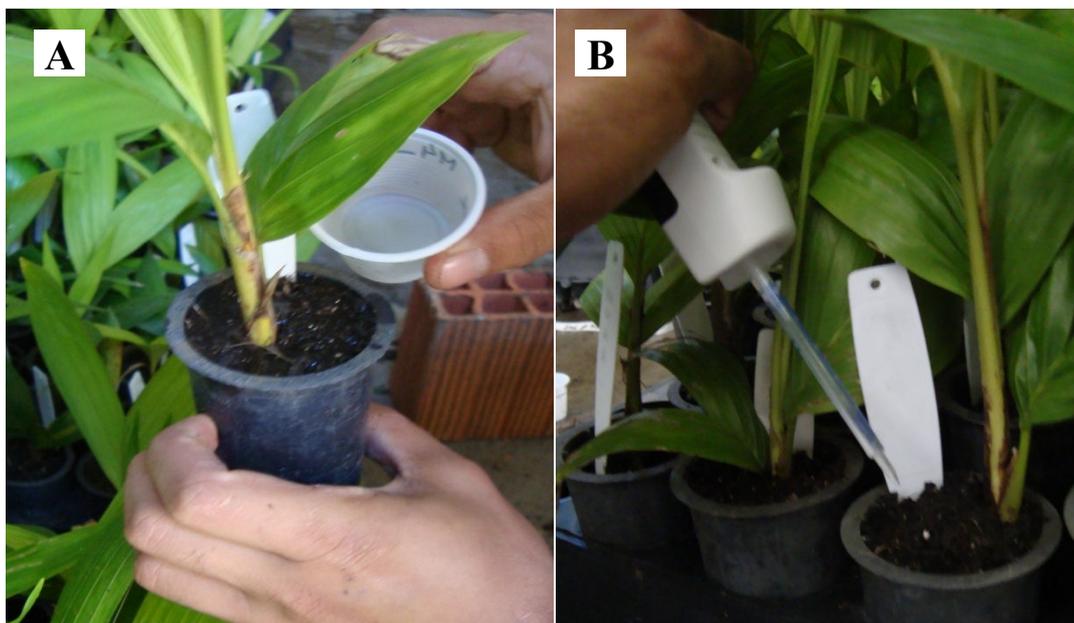


Figura 11. Detalhe do método 4. (A) irrigação do solo com 30 mL de água antes da inoculação (B); irrigação com 1mL do inóculo.

3.1.4. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em blocos casualizados com 16 tratamentos e cinco repetições de 10 plântulas/tratamento, totalizando 160 tratamentos (4 métodos e 4 concentrações de inóculo, incluindo a testemunha), e 50 plântulas/tratamento sendo o experimento repetido duas vezes.

3.1.5. Avaliação

Setenta e cinco dias após a inoculação foram feitas as avaliações do experimento, considerando-se as seguintes variáveis: i) Massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular; ii) Altura da parte aérea das plântulas; e iii) Comprimento do sistema radicular (Figura 12). Procedeu-se então ao re-isolamento do patógeno após a separação do sistema radicular. As raízes foram lavadas em água e submetidas à desinfecção superficialmente com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, e as secções de raiz inseridas em placas de Petri contendo meio seletivo PARPH (pimaricina, 10mg; ampicilina, 250 mg; rifampicina, 10mg; PCNB, 100mg; cornmeal-ágar, 17g; água p.s.p. 1000 mL) (KANNWISCHER e MITCHELL, 1978), as quais foram a seguir incubadas, no escuro, por 72 horas.

3.1.6. Análise dos dados

Os dados dos experimentos foram analisados através da regressão polinomial na análise da variância. Quando os valores de R^2 para os modelos linear ou quadrático foram significativos, optou-se pela utilização daquele com maior valor absoluto. A análise ANOVA foi utilizada na comparação dos métodos de inoculação e concentrações em que a expressão das variáveis patométricas foi mais forte. A significância estatística entre os tratamentos foi feita utilizando-se o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Em todos os procedimentos foi utilizado o pacote estatístico SAS (SAS Institute, 1987, user's guide: statistic. 5. ed. Cary, NC, 956).

3.3. RESULTADOS

Os experimentos foram avaliados aos 75 dias após a inoculação, em função do fato de que a maioria das plântulas inoculadas, independente do método ou da concentração de inóculo não apresentou sintomas da doença, exceto as inoculadas através do método de imersão das raízes, no qual 50 plântulas apresentaram amarelecimento da folha bandeira.

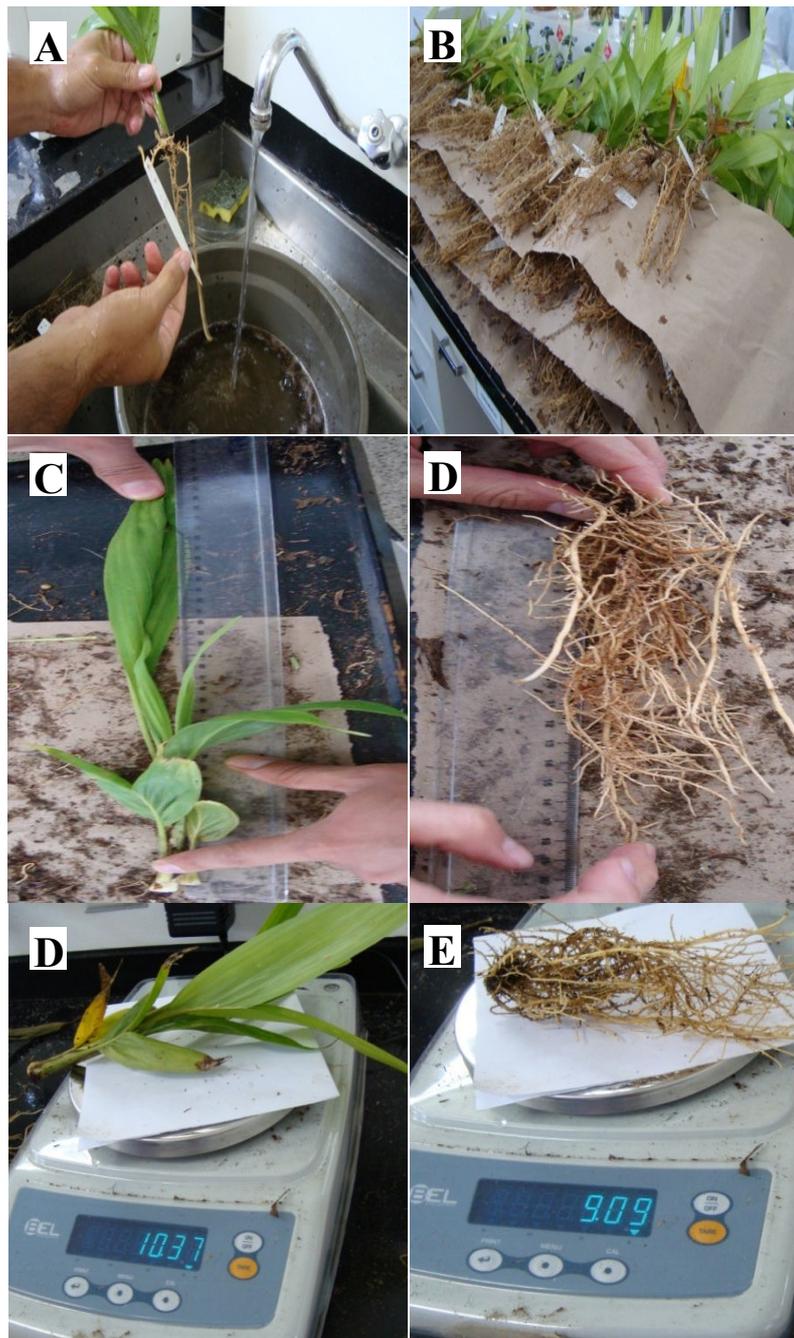


Figura 12. Detalhes do processo de avaliação do experimento: (A) lavagem das plântulas; (B) eliminação do excesso de umidade; (C) medição da parte aérea; (D) determinação do comprimento do sistema radicular; (E) pesagem da parte aérea e (F) das raízes.

Foi efetuada análise de regressão dos dados para determinar quais métodos e concentrações de inóculo foram mais eficientes na inoculação das plantas (Tabela1).

Em função dos valores de R que melhor definiram as equações de regressão serem, predominantemente, do modelo quadrático, observou-se que dentro de cada método houve

variação no comportamento em relação às concentrações. Foi então efetuada uma análise exploratória, plotando as médias de cada uma das variáveis para as diferentes concentrações inóculo em relação aos métodos de inoculação utilizados. Com relação à variável altura da parte aérea foi observado, como era de se esperar, que as testemunhas de todos os métodos apresentaram maior crescimento que as plântulas inoculadas (Figura 13), com as alturas médias das plântulas, variando de 35,3 a 44,7 cm. Em todos os métodos utilizados, a exceção

Tabela 1. Valores de R^2 utilizados na definição do modelo linear ou quadrático da relação método de inoculação/concentrações de inóculo, e as variáveis patométricas utilizadas.

VALORES DE R^2 PARA MÉTODO DE INOCULAÇÃO				
VARIÁVEIS PATOMÉTRICAS	Imersão do sistema radicular	Inundação do solo sistema radicular	Deposição do Inóculo	Deposição de 30mL água+inóculo
Altura da parte Aérea	0,9897	0,9995*	0,6177*	0,8912
Massa fresca da parte aérea	0,7139*	0,8608*	0,7095*	0,8921*
Massa seca da parte Aérea	0,6917	0,7537	0,9165	0,8821*
Comprimento do sistema radicular	0,6683	0,7703	0,8562	0,8501
Massa fresca do sistema radicular	0,1744*	0,8111*	0,8034*	0,62113*
Massa seca do sistema radicular	0,8217*	0,4728*	0,6055*	0,9230*

*= R^2 para modelo quadrático.

do de inundação, as alturas das plântulas diminuíram com o incremento na concentração do inóculo. Pelo método de inundação, a menor altura (37 cm) foi observada para a concentração de 1×10^5 zoósporos/mL. Para a concentração 1×10^5 zoósporos/mL as plântulas inoculadas pelos métodos de imersão e inundação apresentaram um ligeiro crescimento em relação a concentração 5×10^4 zoósporo/mL, voltando a decrescer na concentração mais elevada (5×10^5 zoósporo/ mL).

Em relação à massa fresca da parte aérea das plântulas (Figura 14), o comportamento dos métodos inundação, irrigação com 30 mL + 2mL do inóculo e irrigação com 1 mL em relação as concentrações de inóculo foi similar ao observado para a variável altura das plântulas. Porém, mesmo no método de imersão das raízes, foi observado aumento da massa

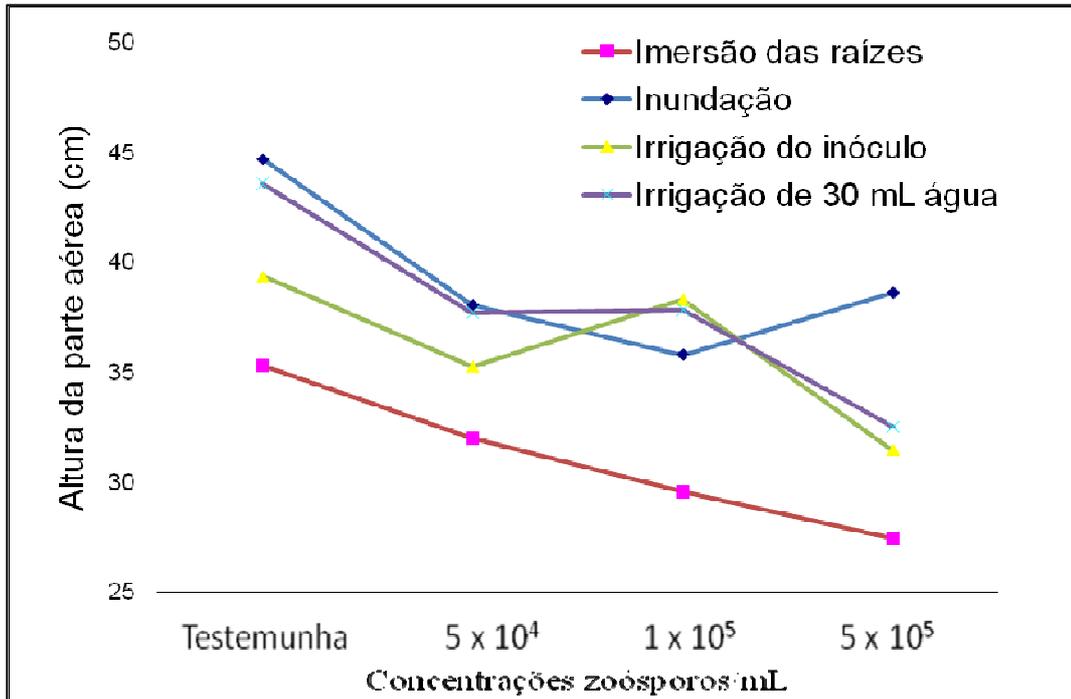


Figura 13. Alturas médias (cm) da parte aérea de plântulas inoculadas por diferentes métodos e concentrações de inóculo.

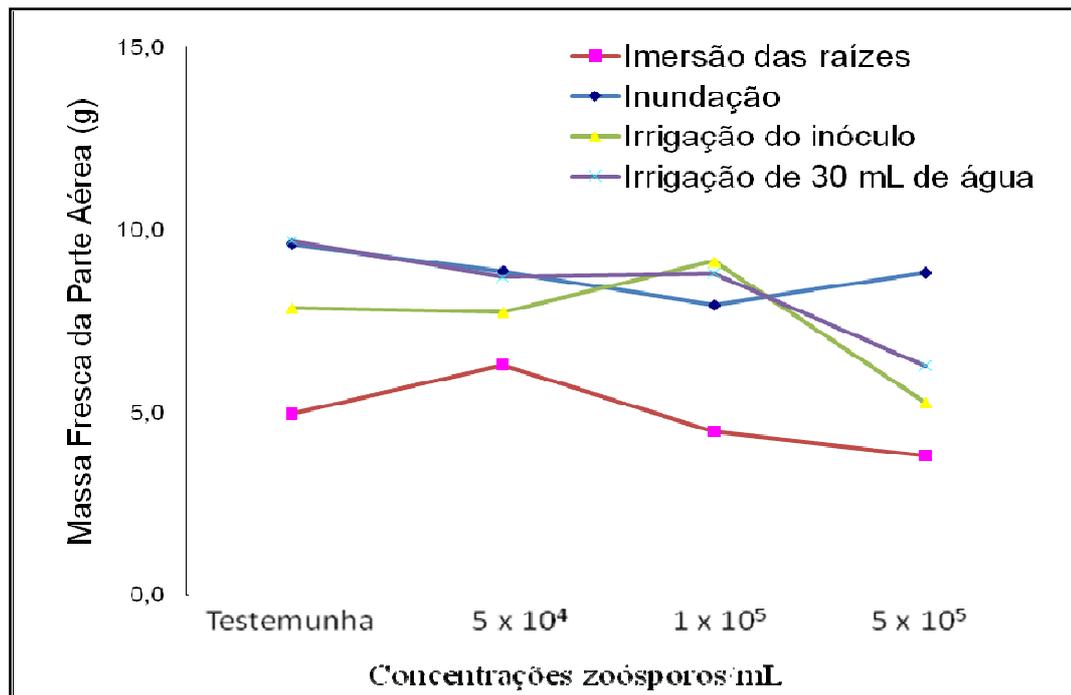


Figura 14. Médias da massa fresca (g) da parte aérea de plântulas inoculadas por diferentes métodos e concentrações de inóculo.

a concentração de 5×10^4 zoósporos/mL, não só em relação à testemunha, quanto as demais concentrações. As menores massas frescas para todos os métodos foram observadas para a

concentração 5×10^5 zoósporos/mL, à exceção do método de inundação. Novamente, os menores valores para massa fresca, variando de 6,3g para a concentração 5×10^4 zoósporos/mL a 3,8g para a concentração 5×10^5 zoósporos/mL, foram obtidos pelo método de inundação, para o qual a concentração 1×10^5 zoósporos/mL foi a que mais reduziu a massa seca da parte aérea.

Em todos os métodos testados, à exceção do método de inundação, a massa seca das plântulas diminuiu com o aumento da concentração de inóculo (Figura 15). Pelo método de inundação, a menor massa seca (1,5g) foi observada para a concentração de 1×10^5 zoósporos/mL. O método de imersão das raízes destacou-se dos demais em todas as concentrações avaliadas, com as plântulas apresentando as menores massas secas da parte aérea. Na concentração de 1×10^5 zoósporos/mL as plântulas inoculadas pelos métodos de imersão e inundação apresentaram um ligeiro aumento no crescimento em relação a concentração de 5×10^4 zoósporos/mL, voltando a decrescer na concentração de 5×10^5 zoósporos/mL.

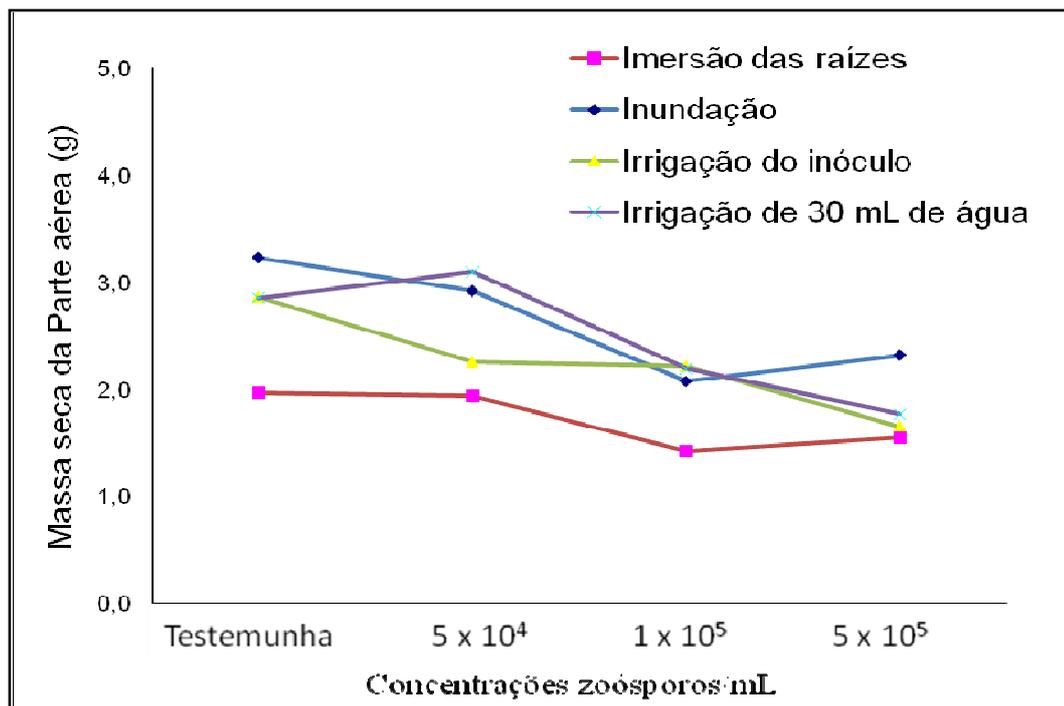


Figura 15. Médias da massa (g) seca da parte aérea das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentrações de inóculo.

Em relação à variável comprimento da raiz, as testemunhas de todos os métodos foram as que apresentaram o maior crescimento do sistema radicular (de 18 a 21 cm) (Figura 16). Em todos os métodos, a exceção do método de imersão, o comprimento do sistema radicular

das plântulas decresceu com o aumento da concentração de inóculo. No método de imersão o menor comprimento (13,5 cm) foi observado para a concentração 1×10^5 zoósporos/mL. Observa-se pela (Figura 16) que os métodos de inundação e irrigação do inóculo com e sem adição de 30 mL, comportaram-se de maneira semelhante, destacando-se mais uma vez o método de imersão das raízes.

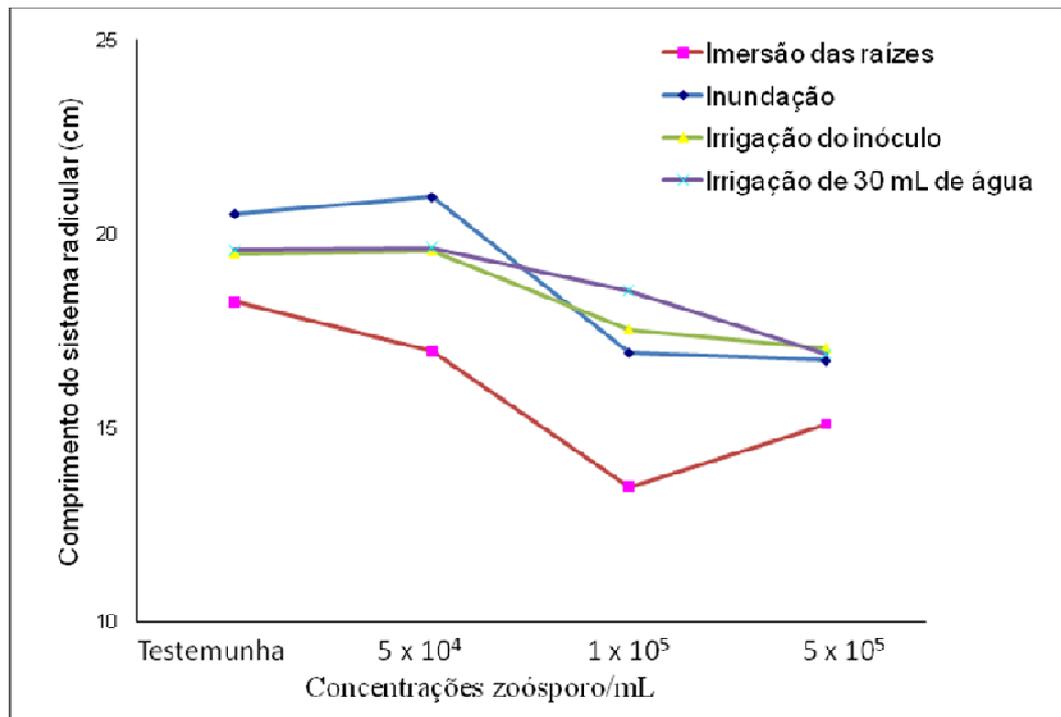


Figura 16. Médias do comprimento (cm) das raízes das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentrações de inóculo.

Em relação aos pesos de massa fresca das raízes (Figura 17), observou-se também destaque para o método de imersão de raízes em relação aos demais, os quais tiveram um comportamento similar. Plântulas inoculadas pelos métodos de irrigação do inóculo, com e sem adição de água, à concentração de 1×10^5 zoósporos/mL, apresentaram um leve aumento da massa fresca do sistema radicular em relação aquelas inoculadas com a concentração de 5×10^5 zoósporos/mL. Nas plântulas inoculadas pelo método de inundação, não foi observada alteração na massa fresca do sistema radicular quando se variou as concentrações. Quanto ao método de imersão das raízes a menor massa fresca foi observada para a concentração 1×10^5 zoósporos/mL.

Para a variável massa seca do sistema radicular (Figura 18), as plântulas testemunhas quase não apresentaram variação de peso (2,3 a 2,6g) o mesmo ocorrendo em relação às

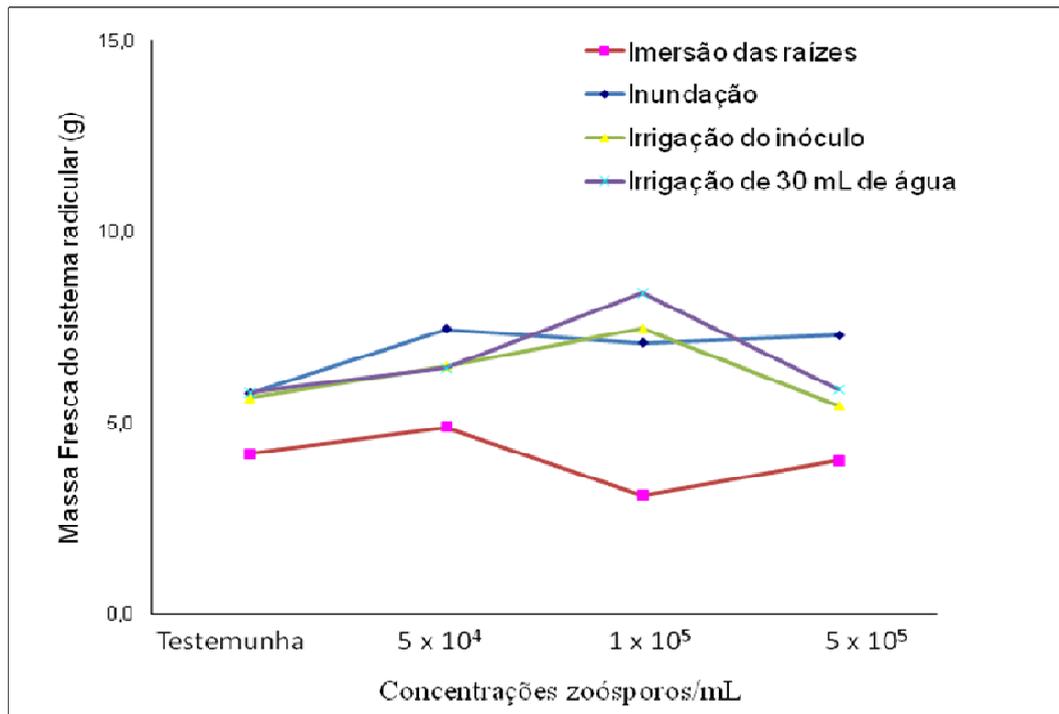


Figura 17. Médias da massa (g) fresca das raízes das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentrações de inóculo.

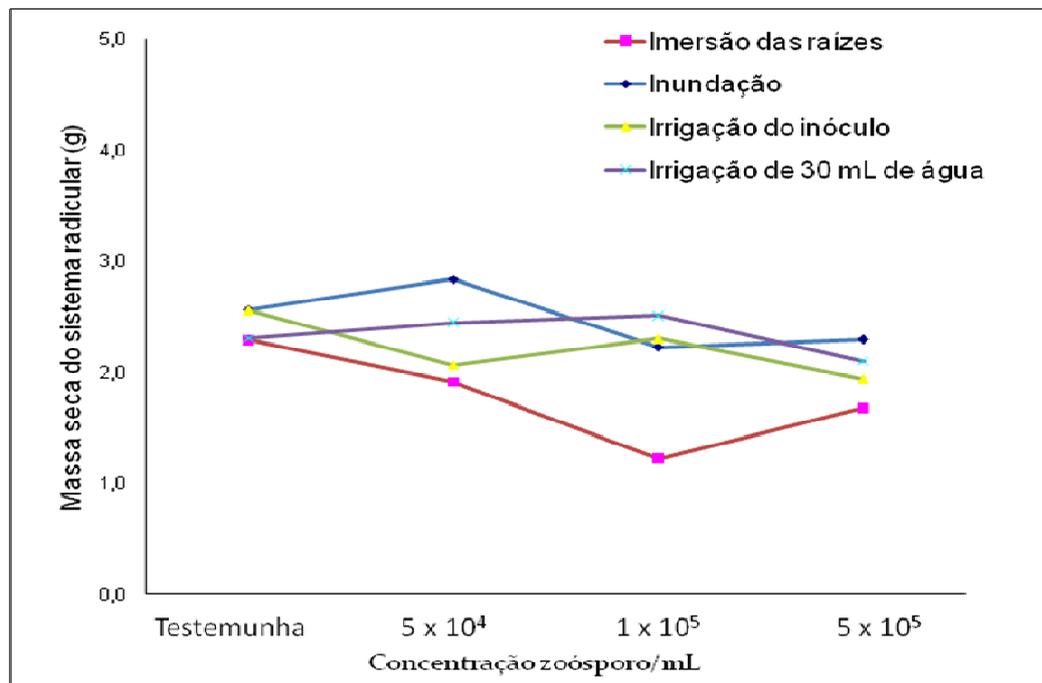


Figura 18. Médias da massa (g) seca das raízes das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos de inoculação e concentrações de inóculo.

plântulas inoculadas, a exceção daquelas que tiveram o sistema radicular imerso em suspensão e inóculo na concentração de 1×10^5 zoósporos/mL, que apresentaram a menor média de massa seca do sistema radicular (1,2g). A variação de peso entre o sistema radicular das plântulas testemunhas e as demais inoculadas neste experimento foi de 1,2 a 2,8g (método de inundação e concentração de 5×10^4 zoósporo/mL).

Baseando-se na análise visual das Figuras 13-18, foram selecionadas as concentrações que mais se destacaram, tanto pelo método de inoculação quanto pela variável patométrica (Tabela 2).

Como pode ser observado na Tabela 2, quando as plântulas foram inoculadas pelos métodos de imersão e inundação, a concentração 1×10^5 zoósporos/mL foi ideal para a expressão da maioria das variáveis patométricas, a exceção da massa fresca da parte aérea em relação ao método de imersão, e, massa fresca do sistema radicular para o método de inundação. Para as duas variáveis a concentração 5×10^5 zoósporos/mL foi a que apresentou

Tabela 2. Concentrações de inóculo selecionadas por método de inoculação e por variável patométrica.

CONCENTRACÕES DE NÓCULO/ MÉTODO DE INOCULACAO				
VARIÁVEIS PATOMÉTRICAS	Imersão do sistema radicular	Inundação do sistema radicular	Irrigação do inóculo	Irrigação de 30 mL de água+inóculo
Altura da Parte Aérea	5×10^5	1×10^5	5×10^5	5×10^5
Massa fresca da Parte aérea	5×10^5	1×10^5	5×10^5	5×10^5
Massa seca da Parte Aérea	1×10^5	1×10^5	5×10^5	5×10^5
Comprimento do sistema radicular	1×10^5	1×10^5	1×10^5	5×10^5
Massa fresca do sistema radicular	1×10^5	5×10^5	5×10^5	1×10^5
Massa seca do sistema radicular	1×10^5	1×10^5	5×10^5	5×10^5

maior destaque. Em relação aos métodos de irrigação do inóculo com ou sem adição de água a concentração de inóculo mais elevada (5×10^5 zoósporos/mL) expressou melhor a doença

com algumas exceções, onde a concentração de maior destaque foi a de 1×10^5 zoósporos/mL.

Após a escolha das concentrações por método e variável, foi realizada a ANOVA para comparação dos métodos e concentrações eleitas anteriormente para cada uma das seis variáveis patométricas avaliadas neste experimento (Tabelas 3 e 4).

Tabela 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.

Parte Aérea	Métodos	Variáveis		
		Altura(m)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
	Imersão das raízes (1×10^5 zoósporo/mL)	29.6 b	4.5 c	1.4 b
	Inundação (1×10^5 zoósporo/mL)	35.8 a	7.9 a	2.1 a
	Deposição do Inóculo (1×10^5 zoósporo/mL)	31.4 ab	5.3 bc	1.7 ab
	Deposição 30 mL de água + Inóculo (1×10^5 zoósporo/mL)	32.5 ab	6.3 b	1.8 ab
		CV = 5.99	CV = 52.35	CV = 49.78

Médias seguidas das mesmas letras em coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. 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.

Sistema radicular	Métodos	Variáveis		
		Comprimento	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
	Imersão das raízes (1×10^5 zoósporo/mL)	13.5 b	3.1 b	1.2 b
	Inundação (1×10^5 zoósporo/mL)	16.9 a	7.1 a	2.2 a
	Deposição do Inóculo (1×10^5 zoósporo/mL)	17.0 a	5.5 a	1.9 a
	Deposição 30 mL de água + Inóculo (1×10^5 zoósporo/mL)	16.9 a	5.9 a	2.1 a
		CV = 21.56	CV = 61.83	CV = 53.14

Médias seguidas das mesmas letras em coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Menores valores para todas as variáveis foram obtidos para inoculações com o método de imersão das raízes em suspensões de inóculo de 10^5 zoósporos/ mL (Tabelas 3 e 4). Porém para as variáveis da parte aérea, as médias das plântulas inoculadas por este método não

diferiram, estatisticamente, daquelas do método de irrigação com 1 mL de 10^5 zoósporos/ mL e, para as variáveis altura e massa fresca também para o método de Irrigação com 30 mL de água + 2 mL do inóculo (Tabela 3).

Os dados do segundo experimento, embora aqui não apresentados, confirmaram os resultados obtidos em relação aos métodos de inoculação e as concentrações de inóculo.

3. 4. DISCUSSÃO

O trabalho abrange os efeitos de quatro métodos de inoculação e quatro concentrações de inóculo (0 , 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos/mL) de *P. palmivora* sobre plântulas de pupunheira, aos 4 meses de idade, visando determinar qual a melhor combinação método x concentração para ser utilizada futuramente em trabalhos para seleção de matrizes de pupunheira resistentes à podridão-do-estipe, uma vez que não foram encontradas informações na literatura sobre uma metodologia de inoculação para este patossistema (*P. palmivora* x pupunheira).

Os efeitos dos métodos e concentrações de inóculo foram avaliados aos 75 dias após as inoculações, considerando as seguintes variáveis patométricas: altura das plantas inoculadas, massas fresca e seca da parte aérea, comprimento do sistema radicular, e massas fresca e seca do sistema radicular.

Segundo pesquisas realizadas em mamoeiro (SANTOS, 2009), o intervalo de 30 dias após a inoculação foi suficiente para avaliar a reação de acessos de germoplasma à podridão das raízes causadas por *P. palmivora*, uma vez que, grande parte das plantas já haviam morrido neste período. Em cacauero (LUZ e MITCHELL, 1994), 60 dias foram suficientes para esta e outras espécies que ocorrem na cultura provocarem sintomas nas plantas inoculadas, permitindo estabelecer diferenças entre cultivares ou clones resistentes ou suscetíveis à podridão-parda. Em plântulas de espécies cítricas inoculadas com *P. nicotianae*, foi utilizado o período de 15-30 dias, como tempo máximo para avaliar o efeito de diferentes métodos de inoculação (SIVIEIRO et al., 2001). Inicialmente havia a pretensão de se avaliar as plantas de pupunheira aos 60 dias, entretanto, apenas algumas plantas inoculadas pelo método de imersão de raízes com as suspensões de zoósporos a 10^5 e 5×10^5 zoósporos/mL apresentavam sintomas de amarelecimento da folha bandeira. Sendo assim, aos 75 dias foi efetuada a remoção das plantas e a avaliação patométrica.

Nas análises das interações entre métodos de inoculação x concentrações de inóculo, os modelos de regressão quadrática predominaram explicando melhor 13 interações (método/concentração), enquanto 11 foram lineares (Tabela 1). Observou-se, portanto, variações no comportamento das plântulas inoculadas por um mesmo método recebendo diferentes concentrações de inóculo. Em alguns casos, uma concentração menor reduziu mais uma variável do que a concentração mais alta (5×10^5 zoósporos/mL) ou ainda, apresentando valores maiores que para as testemunhas (Figuras 13-18). No segundo experimento, houve também predominância dos modelos quadráticos, confirmando a variação da reação das plantas às diferentes concentrações de inóculo.

Como observado, as plântulas inoculadas pelo método de imersão do sistema radicular nas diferentes concentrações de inóculo, destacaram-se daquelas inoculadas pelos outros métodos, apresentando redução nos valores das seis variáveis avaliadas, embora, tenham sido observadas variações em relação às concentrações testadas. Tais resultados eram esperados, uma vez que se trata de um método mais drástico, envolvendo a exposição do sistema radicular ao patógeno e ao meio ambiente. Além disso, mesmo que as plântulas tenham sido retiradas do substrato com o máximo de cuidado, algum dano pode ter ocorrido ao sistema radicular, facilitando assim a penetração do patógeno, acelerando o processo de patogênese e resultando em maiores danos às plântulas.

Somente Plântulas inoculadas por este método, principalmente nas concentrações 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos/mL apresentaram sintomas externos da doença. Quando o coleto foi cortado para que fosse realizado o plaqueamento do sistema radicular e o re-isolamento do patógeno, foi observado o escurecimento e necrose dos tecidos demonstrando uma provável morte das plântulas. O patógeno foi reisolado de todas as plântulas apresentando sintomas.

Resultados similares foram observados por Santos (2009) em plântulas de mamoeiro inoculadas por este método em relação aos demais testados.

No caso específico da pupunheira, que apresenta sistema radicular fasciculado e volumoso, o uso do método de imersão não é prático, podendo citar-se quatro desvantagens para o seu uso: 1) A demanda por maior quantidade de inóculo; 2) A necessidade de um espaço físico amplo e uma equipe de pessoas para realizar a tarefa, tendo em vista o período de viabilidade do inóculo; 3) O tempo e os cuidados gastos na inoculação são maiores que para os outros métodos; 4) Apresenta limitações na inoculação, simultaneamente, de um grande número de plantas de diferentes acessos de pupunheira, como requerido em avaliações para resistência.

Ressalta-se por isso mesmo, que pelo fato do método de imersão ser o mais agressivo dentre os avaliados, o seu uso para avaliação de resistência não deve ser descartado, uma vez que, através dele, poderiam ser estabelecidas diferenças mais tênues entre os materiais genéticos avaliados.

Quanto aos demais métodos avaliados observou-se que, de modo geral, tiveram comportamento similar segundo as variáveis patométricas utilizadas. Foi observado que, aparentemente, não houve necessidade de encharcamento do solo para facilitar a penetração do patógeno. Luz e Mitchell (1994) também observaram o mesmo quando compararam os efeitos das de inoculações com suspensão de zoósporos de *Phytophthora* spp em plântulas de cacaueteiro com e sem encharcamento do solo.

Desse modo, o método de mais fácil execução, requerendo também menor quantidade de inóculo, foi o de irrigação do solo com 1 mL da suspensão de zoósporos, podendo ser utilizado para separar materiais genéticos suscetíveis dos resistentes, como também para testes de patogenicidade. A única referência encontrada sobre avaliação da patogenicidade de *P. palmivora* em pupunheira foi de Varjão et al. (2008) que utilizaram o método de encharcamento do solo com irrigação de 1 mL de inóculo a 5×10^5 zoósporos/mL, na avaliação da resposta das plântulas ao patógeno, 100 dias após a inoculação, obtendo inclusive a reprodução de todos os sintomas da doença, como clorose, secamento das folhas e morte das plântulas .

Quanto às concentrações de inóculo utilizadas neste trabalho, a seleção foi por método de inoculação e variável patométrica avaliada (Tabela 2), tendo sido selecionado as concentrações de 10^5 zoósporos/ mL, para os métodos de imersão e inundação; e de 5×10^5 zoósporos/mL para os de irrigação do inóculo no solo com ou sem adição suplementar de água. É interessante observar neste caso a eleição das concentrações de acordo com a similaridade dos métodos. Os de imersão e inundação, que implicam em, expor o sistema radicular das plântulas a condições de stress, no primeiro caso pela remoção, e no segundo pela manutenção das plântulas por 2 horas em condições de saturação de água, menor quantidade de inóculo foi necessária (10^5 zoósporos/mL) do que para os outros dois métodos de inoculação nos quais as plantas não eram submetidas às condições de stress. Nestes casos, cinco vezes mais inóculo foi necessário para provocar alterações na fisiologia das plântulas, mesmo que, externamente os sintomas não ficaram tão evidentes.

De acordo com o observado na comparação de métodos de inoculação, apenas para as concentrações onde ficou evidente a ação das condições externas para cada um deles, foi confirmado o que as observações visuais dos gráficos haviam evidenciado. O método de imersão na concentração 10^5 zoósporos/mL apresentou as maiores reduções nos valores médios obtidos para todas as variáveis relacionadas aos efeitos da doença no sistema radicular, com os demais métodos não apresentando diferenças entre si (Tabela 4). No caso das variáveis relativas à parte aérea das plântulas, embora o método de imersão à concentração de 10^5 zoósporos/mL tenha apresentado valores mais baixos, estes não diferiram pelo teste de Tuckey ($p \leq 0,5$) para altura das plântulas e massa seca, daqueles obtidos pelos métodos de irrigação do solo com 1 mL do inóculo na mesma concentração de zoósporos.

Isto, vem confirmar a seleção já feita em relação aos métodos de imersão ou de irrigação com 1 mL da suspensão na concentração de 5×10^5 zoósporos/mL para realização de testes de patogenicidade e de resistência.

Outro ponto a ser discutido é a necessidade do uso de todas estas variáveis para avaliar a reação das plântulas de pupunheira quando inoculadas com *P. palmivora*. Pela análise gráfica, foram observadas algumas variações nas medidas das plântulas pelos diferentes métodos de inoculação. Entretanto, ao se efetuar análise multivariada, notou-se que se poderia eliminar uma ou duas, dependendo dos coeficientes de correlação observados.

Embora este trabalho seja pioneiro no estudo da patogênese no patossistema *P.palmivora* x pupunheira, mostra quantos pontos ainda precisam ser elucidados para que seja recomendada uma metodologia de inoculação para avaliação de resistência à doença.

Muitas barreiras tiveram que ser vencidas durante a realização destas pesquisas, entre elas, a obtenção de sementes e plântulas de pupunheira em idade uniforme para realizar todos os tratamentos. No entanto, foi possível demonstrar o papel do patógeno em causar danos à planta e seus reflexos em sua fisiologia utilizando-se qualquer dos métodos de inoculação avaliados.

4. CAPÍTULO 2

FERIMENTOS SÃO NECESSÁRIOS À INFECÇÃO NO PATOSSISTEMA

Phytophthora Palmivora x PUPUNHEIRA?

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a necessidade de ferimentos no processo de infecção de *Phytophthora palmivora* sobre plântulas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunt.). As inoculações foram efetuadas com e sem ferimentos utilizando-se os seguintes tratamentos: inoculação com discos de micélio de 0,7 cm de diâmetro na bainha das folhas; inoculação com gotas (5µL) de duas concentrações de zoósporos no coleto das plântulas e irrigação do solo com 1, 2 ou 5 mL de duas concentrações de zoósporos em torno do coleto das plântulas. Nas inoculações foram utilizadas as seguintes concentrações de zoósporos 0 (zero), 5×10^5 e 1×10^6 zoósporos/mL. O experimento foi conduzido obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, com 28 tratamentos de 10 plântulas/tratamento, sendo os ensaios repetidos duas vezes. Aos 60 dias após as inoculações foram avaliadas as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular das plântulas, sendo os dados analisados pelo método de agrupamentos e pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Aproximadamente 50% das plântulas inoculadas, principalmente com ferimentos, apresentaram sintomas da doença e/ou morreram. Apesar dos tratamentos com ferimentos não diferirem entre si pelo teste F, foram observadas, entretanto, diferenças significativas para os tratamentos com ferimentos, nas quatro variáveis patométricas avaliadas. Pela análise de agrupamentos observou-se a tendência das testemunhas agruparem entre si formando um grupo com os menores valores de massa fresca e massa seca tanto para a parte aérea como para o sistema radicular. Ferimentos não são essenciais à penetração mais são importantes na aceleração do processo de infecção em plântulas de pupunheira inoculadas com *P. palmivora*.

Palavras-chave adicionais: podridão-do-estipe, *Bactris gasipaes*, patogênese, metodologia de inoculação.

IS WOUNDING NECESSARY TO INFECTION IN THE PATHOSYSTEM

Phytophthora palmivora x peach palm?

ABSTRACT

This paper aimed to investigate the necessity of wounding in the infection process of *Phytophthora palmivora* on seedlings of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunt.). Inoculations were done with and without wounding according to the following treatments: inoculation with 0.7 cm mycelial discs on the leave sheaths; drops (5 μ L) of two zoospores concentrations on the root collar of the seedlings; irrigation of the soil with 1, 2 or 5 mL of two zoospores concentrations around the root collar of the seedlings. The following inoculum concentrations were used: zero; 5 x 10⁵ e 1 x 10⁶ zoospores/mL. The experiment was done following an entirely randomized design, with 28 treatments containing 10 plants/plot. Sixty days after inoculations the fresh and dry weight of the seedlings canopy and root systems were assessed and analyzed using the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$). About 50% of inoculated plants, mainly the wounded ones, showed disease symptoms or died. Wounding treatments did not differ from one another but significant differences among the four pathometric variables were demonstrated for treatments without wounding. Through group analyses a tendency was found of the controls to group together forming a grouping with the greater values of wet and dry weight of aerial and root parts. Wounding is not necessary for penetration but is important to accelerate infection process in peach palm seedlings inoculated with *P. palmivora*.

Additional key-words: stem rot, *Bactris gasipaes*, pathogenesis, inoculation methodology

4.1. INTRODUÇÃO

Tanto no Brasil como na Costa Rica, diversos patógenos, principalmente fungos, tem causado problemas fitopatológicos na pupunheira em viveiro e em plantios adultos, sendo *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão-do-estipe, um dos mais importantes (SANTOS et al., 2001).

Phytophthora palmivora é uma espécie altamente virulenta que sob condições favoráveis pode causar epidemias sérias, em curto espaço de tempo, em diferentes hospedeiros. Pode ser disseminada por via aérea, podendo seus propágulos viajar a distâncias razoáveis em gotículas de água. A disseminação dos zoósporos, que são esporos móveis, pode também ocorrer através da água (WATERHOUSE et al., 1963; LUZ e SILVA, 2001).

Embora existam muitos estudos com esta espécie em outros hospedeiros, o processo de patogênese no patossistema *P. palmivora* x Pupunheira ainda é desconhecido, havendo, portanto a necessidade da realização de estudos que busquem esclarecer os mecanismos de penetração e colonização do patógeno no hospedeiro.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de pupunheira com 6 ou 8 meses de idade, cultivadas em sacos de polietileno contendo 500g da mistura solo/plantimax (1:1) foram utilizadas no experimento. O ensaio foi conduzido em casa-de-vegetação onde a temperatura média variou em torno de 27°C.

O isolado 870 de *P. palmivora* pertencente à coleção de Phytophthora Arnaldo Medeiros, do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), foi cultivado em meio de cenoura agar (CA) por 5 dias para ser utilizado no ensaio com disco de micélio de 0,7cm de diâmetro, e por 8 dias, no preparo das suspensões de zoósporos utilizadas nos experimentos,

de acordo com procedimentos descritos por Luz *et al.* (2008). Nas inoculações com ferimentos foram efetuadas pequenas incisões com bisturi na bainha das folhas ou no coleto das plântulas. Em todas as plantas inoculadas, incluindo as testemunhas, foi colocado um chumaço de algodão umedecido em água e envolto em plastifilme, sobre os locais de inoculação. Os seguintes métodos de inoculação foram utilizados: 1. Inoculação com gotas de uma suspensão de 5×10^5 zoósporos/mL, com ferimentos; 2. Idem, sem ferimentos; 3. Inoculação com gotas de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos/mL, com ferimentos; 4. Idem, sem ferimentos; 5. Testemunha – sem a aplicação da suspensão de zoósporos, com ferimentos; 6. Testemunha – idem, sem ferimentos; 7. Irrigação do solo, em torno do coleto, com 1 mL de uma suspensão de 5×10^5 zoósporos/mL, com ferimentos; 8. Idem, sem ferimentos; 9. Irrigação do solo, em torno do coleto, com 1 mL de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos/mL, com ferimentos; 10. Idem, sem ferimentos; 11. Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo, com ferimentos; 12. Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo, sem ferimentos; 13. Irrigação do solo, em torno do coleto, com 2 mL de uma suspensão de 5×10^5 zoósporos/mL, com ferimentos; 14. Idem, sem ferimentos; 15. Irrigação do solo, em torno do coleto, com 2 mL de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos/mL, com ferimentos; 16. Idem, sem ferimentos; 17. Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo, com ferimentos; 18. Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo, sem ferimentos; 19. Irrigação do solo, em torno do coleto, com 5 mL de uma suspensão de 5×10^5 zoósporos/mL, com ferimentos; 20. Idem, sem ferimentos; 21. Irrigação do solo, em torno do coleto, com 5 mL de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos/mL, com ferimentos; 22. Idem, sem ferimentos; 23. Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo, com ferimentos; 24. Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo, sem ferimentos; 25. Inoculação com um disco de micélio de 0,7 cm, com ferimentos; 26. Idem, sem ferimentos; 27. Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo, com ferimentos e 28. Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo, sem ferimentos.

Após as inoculações as plântulas foram mantidas em condições de casa de vegetação com as temperaturas médias em torno de 27 °C, sendo observado diariamente o aparecimento de sintomas ou a morte das plântulas. Sessenta dias após a inoculação foram avaliadas as massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular. Procedeu-se também ao reisolamento das plântulas inoculadas, em meio seletivo PARPH (KANNWICHER e MITCHELL, 1978), sendo as placas incubadas, no escuro, por 72 horas.

Os dados foram analisados utilizando-se as análises de variância ANOVA ($p \leq 0,05$) e de agrupamentos teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), através do software R, versão 9.0.

4.3. RESULTADOS

Aproximadamente 50% das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos apresentaram sintomas típicos da doença (Figura 19).

Pela ANOVA não foram observadas diferenças estatísticas significativas para ensaio em relação a nenhuma das variáveis patométricas avaliadas. Sendo assim os dois ensaios foram analisados em conjunto como 20 repetições para cada um dos 28 tratamentos. Na análise conjunta dos dados foram observadas diferenças estatísticas significativas para todas as variáveis, entretanto quando se separou os tratamentos com e sem ferimento, os valores de F só foram significativos para os tratamentos sem ferimentos, em todas as variáveis.

Através da análise de agrupamento Teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) os tratamentos sem ferimento, para a variável massa fresca da parte aérea apresentaram três grupos: Grupo A, constituído pelas testemunhas dos métodos de irrigação do solo com 1 mL (T12); do de gota, além do tratamento de irrigação do solo com deposição de 1 mL de 5×10^5 zoósporos/mL, que apresentaram os maiores pesos de massa fresca da parte aérea; no Grupo B apenas a testemunha do tratamento de irrigação do solo com 2 mL (T18) (Tabela 5). Isto é interessante, pois três das testemunhas estão nestes dois grupos. No Grupo C ficaram 10 tratamentos com o peso de massa fresca variando de 7g (tratamento 5 mL a 1×10^5 zoósporos/mL) a 12,3g (testemunha do método de disco).

Para a variável massa seca (MS) da parte aérea também foram encontrados três grupos similarmente aos observados para a variável massa fresca (MF) da parte aérea.

Quando as mesmas variáveis foram avaliadas para o sistema radicular, também só foram observadas diferenças estatísticas para os tratamentos sem ferimento. Três grupos foram também encontrados para cada uma das variáveis. Para MS do sistema radicular o Grupo A ficou constituído dos tratamentos: testemunhas dos métodos de irrigação do solo com 1 e 2 mL; método de gota; método de disco de micélio e de irrigação com 1 mL de 5×10^5 zoósporo/mL, com os pesos variando de 7,8g a 11,4g. O Grupo B foi constituído por apenas um tratamento, o de irrigação do solo com 5 mL 5×10^5 zoósporo/mL. No Grupo C ficaram oito tratamentos, com os pesos médios de MF variando de 4,1g (gota 1×10^6) a 6,8g (testemunha de irrigação do solo com 5 mL).

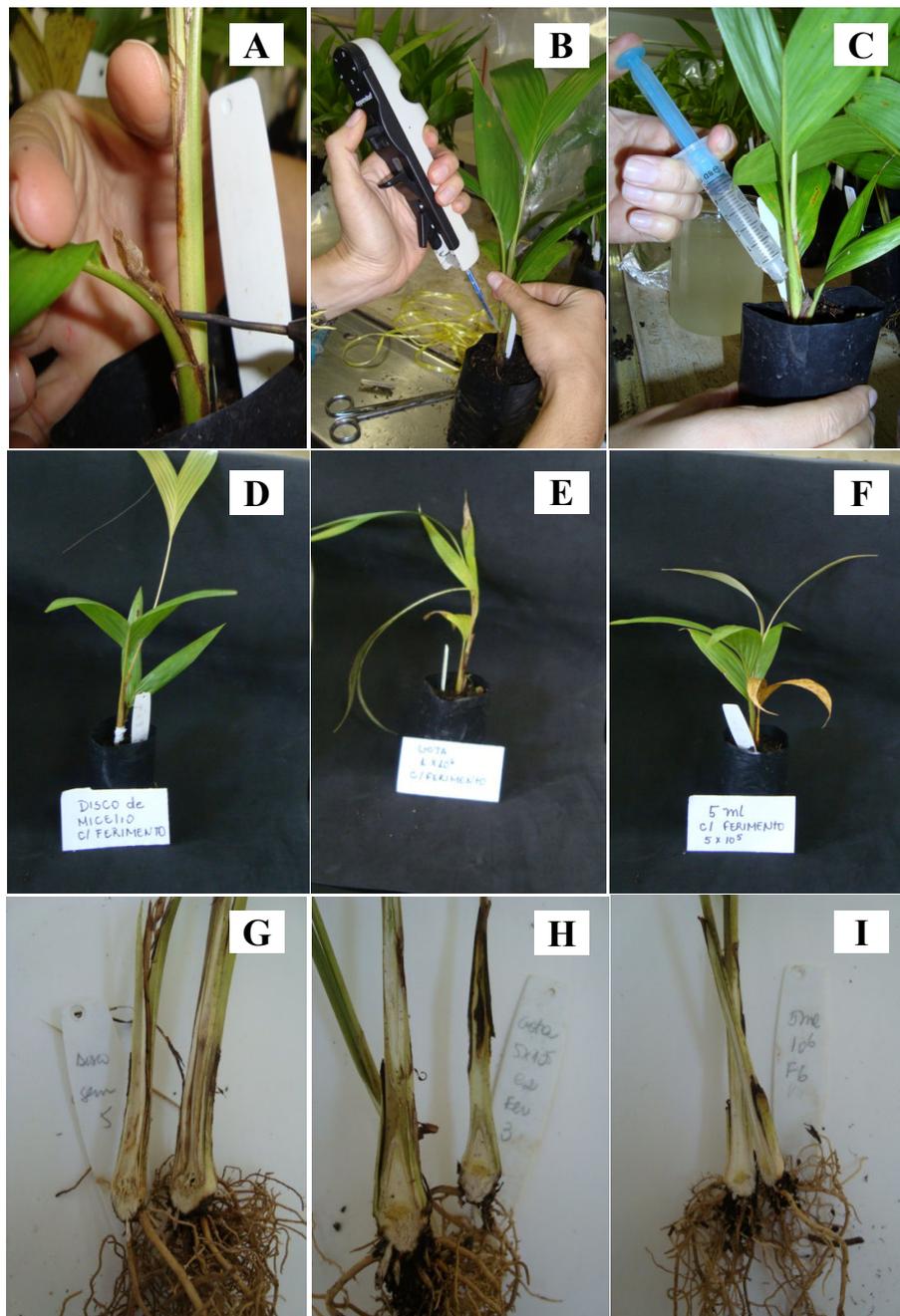


Figura 19. Plântulas de pupunheira inoculadas com *Phytophthora palmivora*. Detalhes dos métodos de inoculação: (A) disco; (B) gota; (C) irrigação do solo com 5 mL do inoculo ao redor do coleto. Sintomas da podridão-do-estipe: (D) inoculação com disco de micélio; (E) inoculação com gota e (F) inoculação com suspensão de zoósporos; (G-I) sintomas internos em planas inoculadas.

Para MS os tratamentos de gota (testemunha), disco de micélio e de irrigação com 1 mL da suspensão de 5×10^5 zoósporo/mL, juntamente com 5 mL de 5×10^5 zoósporo/mL

formaram o Grupo A, com maior peso de massa seca do sistema radicular. No Grupo B ficou o tratamento testemunha de irrigação do solo com 1 mL, e os demais, formaram o Grupo C, cujos pesos de MS do sistema radicular variaram de 0,8g (irrigação com 5 mL 1×10^6 zoósporos/mL) a 1,6g (testemunha para irrigação do solo 2mL).

De modo geral, como era de se esperar, observou-se que as testemunhas dos diferentes tratamentos, especialmente dos métodos de gota e de irrigação com 1 mL, sempre apresentaram pesos de MF e MS mais elevados tanto para parte aérea como para o sistema radicular.

Um fato interessante observado (Tabela 5), refere-se aos tratamentos de gota e de irrigação do solo com 5 mL da concentração 1×10^6 zoósporo/mL que apresentaram para as quatro variáveis avaliadas pesos com os menores valores. Os outros dois tratamentos de irrigação do solo com 1 e 2 mL da suspensão de inóculo também apresentaram redução do peso das variáveis. Em função dos tratamentos correspondentes utilizando a concentração 5×10^5 e 1×10^6 zoósporos/mL ficarem agrupados torna-se difícil estabelecer distinção dos efeitos de uma concentração da outra.

Tabela 5. Valores das massas seca e fresca da parte aérea e do sistema radicular (g) obtidos de plântulas de pupunheira 60 dias após a inoculação com *Phytophthora palmivora*, sem ferimento.

Tratamentos	Peso da parte aérea (g)		Peso do sistema radicular (g)	
	MF	MS	MF	MS
T 12 - Testemunha 1 mL	16,4 A	3,6 A	7,8 A	1,7 B
T 8 – Irrig. 1 mL (5×10^5)	15,9 A	4,1 A	8,7 B	2,4 A
T6- Testemunha Gota	14,8 A	3,6 A	11,4 A	2,7 A
T18 - Testemunha 2 mL	12,7 B	3,1 B	7,8 A	1,6 C
T28- Testemunha disco	12,3 C	2,9 C	9,9 A	2,6 A
T16- Irrig. 2 mL (1×10^6)	12,0 C	3,0 C	6,2 C	1,6 C
T 20- Irrig. 5 mL (5×10^5)	11,7 C	2,7 C	7,0 B	2,4 A
T2- Método gota (5×10^5)	11,4 C	2,6 C	6,6 C	1,5 C
T 24- Testemunha 5 mL	11,2 C	2,9 C	6,8 C	1,2 C
T14- Irrig. 2 mL (5×10^5)	11,1 C	2,4 C	6,0 C	1,4 C
T10- Irrig. 1 mL (1×10^6)	10,2 C	2,4 C	4,9 C	1,5 C
T26- Disco de micélio	9,9 C	2,4 C	5,4 C	1,2 C
T 4- Método gota (1×10^6)	7,5 C	2,0 C	4,1 C	0,9 C
T22- Irrig. 5 mL (1×10^6)	7,0 C	2,3 C	4,3 C	0,8 C

Médias seguidas das mesmas letras, na mesma coluna, ficaram no mesmo grupo segundo o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.4. DISCUSSÃO

No patossistema *Phytophthora palmivora* x pupunheira não foram encontrados relatos na literatura sobre o processo de patogênese, referente à importância de ferimentos ou injúrias causadas por insetos ou danos mecânicos na penetração e a colonização dos tecidos do hospedeiro pelo patógeno. Visando esclarecer tal ponto foi realizado o presente experimento, ao se avaliar métodos de inoculação com e sem ferimentos.

Foi observado que os maiores percentuais de plantas com sintomas foram obtidos nos métodos de inoculação com ferimentos (45% para T19, 55% T25 e 60% para T1), com os primeiros sintomas de amarelecimento aparecendo 12 dias após a inoculação, vindo as plantas a morrer algumas semanas depois. O número de plântulas inoculadas sem ferimentos que apresentaram sintomas foi bastante inferior ao daquelas inoculadas pelos mesmos métodos com ferimento, no mesmo período de tempo (15% para o T20, 5% para o T26, e 15% para o T2). Desta forma, e aparentemente, a presença de injúrias mecânicas ou causadas por insetos, contribui para acelerar o processo de colonização do fungo. Para ilustrar tal fato, tem sido constatado em condições de campo, que em áreas onde são registradas grandes populações do coleóptero *Metamizium* sp. é que se tem observado maiores números de touceiras de pupunheira com sintomas da podridão-do-estipe .

Como era de se esperar, as testemunhas ficaram nos grupos com maiores massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular (Tabela 5), apesar do tratamento T24 ter ficado no Grupo C para todas as variáveis, e o tratamento T28 para as da parte aérea. No Grupo C, aquele de menores pesos para todas as variáveis, foi onde a maioria dos tratamentos com inoculação se agrupou. Embora os tratamentos em que a maior concentração de inóculo foi utilizada tenham, de modo geral, estado no limite mais baixo de peso para todas as variáveis, com destaque para os métodos T4 e T22, e com menor ênfase naqueles em que a concentração foi 5×10^5 zoósporo/mL, também ficaram no mesmo grupo, exceto o tratamento T8 que ficou no Grupo A para as variáveis MF e MS da parte aérea e MS do sistema radicular, e no B para MF do sistema radicular. Pode-se inferir daí que quando o patógeno foi inoculado com qualquer das duas concentrações testadas, causou redução na massa fresca e seca, mesmo sem apresentar sintomas externos. Algumas vezes plântulas inoculadas com e sem ferimentos, apresentavam o colmo inteiramente escurecido (Figura 19), muito embora, aparentassem sadias. Em tais casos, o patógeno foi sempre reisolado.

Quanto aos três métodos de inoculação utilizados: com deposição de gotas em um

ponto do coleto (simulação de respingos de chuva); irrigação do inóculo ao redor do coleto (simulação da presença do inóculo no solo), ou mesmo, a artificialidade dos discos de cultura, usados para reprodução *in vitro* de sintomas, não se distinguiram uns dos outros pelo Teste de Scott-Knott, ficando no grupo C. A quantidade de inóculo utilizada, aparentemente também não influenciou na expressão da doença nas plântulas de pupunheira de acordo com os resultados aqui apresentados, pois os tratamentos com irrigação de 1, 2 ou 5 mL das suspensões de zoósporos ficaram no grupo C.

Segundo Benchimol et al. (2001), se houver inóculo de *P. palmivora* no solo e condições ambientais adequadas, a infecção irá ocorrer tanto na presença quanto na ausência de injúrias, não obstante tal presença venha contribuir sobremaneira na aceleração do processo de patogênese.

5. CAPÍTULO 3

HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler X PUPUNHEIRA

RESUMO

Visando estudar a interação de *Phytophthora palmivora* x pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunt.), foram efetuados cortes histológicos nos locais onde plântulas, com seis meses de idade, foram inoculadas com ferimentos na base do estipe, para que fossem examinados ao microscópio eletrônico de varredura. Os métodos de inoculação utilizados foram: i) inoculação com gotas (5 μ L); ii) Irrigação com 5 mL da suspensão de 1×10^6 zoósporos mL; e iii) inoculação com discos de micélio de 0,7 cm de diâmetro. Os cortes foram realizados seis e 12 horas após a inoculação seguindo-se as etapas de fixação, desidratação e metalização. Zoósporos encistados, clamidósporos e esporângios do patógeno aderidos à epiderme das plantas foram observados seis horas após a inoculação. Foi observado que a fase de pré-infecção teve ocorrência anterior ao horário da primeira coleta (seis horas). Da mesma forma, foi observado que a colonização dos tecidos das plântulas inoculadas foi independente do método de inoculação utilizado.

Palavras-chave: *Bactris gasipaes*, métodos de inoculação, Microscopia Eletrônica de varredura

HISTOPATOLOGY OF THE INTERACTION *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler x PEJIBAYE

ABSTRACT

Aiming to study the interaction *Phytophthora palmivora* x pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunt.) with the aid of the scanning electronic microscopy (SEM), section were made of the stem base of pejibaye plants in the locals where six month old pejibaye seedlings were inoculated. The inoculation methods used were: i) inoculation with 5 μ L drops of zoospore suspension; ii) irrigation around the stem base of seedlings, with 5 mL of a zoospore suspension of 1×10^6 zoospores/mL; and iii) inoculation with 0.7 cm diameter mycelial discs. Sections were made six and 12 hours after inoculation, following fixation, dehydration and metallization steps. Encysted zoospores, chlamydospores and sporangia of the pathogen attached to host epidermis were seen six hours after inoculation, with the pre-infection phase occurring before that stage. Independently of the inoculation method employed, host tissue colonization was observed in all inoculated plants.

Additional key-words: *Bactris gasipaes*, inoculation methods, scanning electronic microscopy

5.1. INTRODUÇÃO

A pupunheira encontra-se em expansão no Sul da Bahia onde as condições edafoclimáticas são muito favoráveis para a cultura (BOVI, 2000). A agroindústria do palmito é uma excelente alternativa, desde que se faça um manejo adequado da plantação (ROCHA, 2003). O monocultivo e a expansão do plantio trouxeram conseqüências para o cultivo da pupunheira entre os quais problemas fitossanitárias com ênfase na podridão-do-estipe causada por *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler (SANTOS e LUZ, 2007).

Os sintomas da doença são muito drásticos tanto em mudas enviveiradas como em plantas adultas. Os sintomas iniciais são caracterizados pela clorose com posterior secamento das folhas e apodrecimento dos tecidos internos da base do estipe, os quais adquirem coloração pardo-escura, evoluindo então para a morte da planta (BENCHIMOL et al., 2001).

O patógeno pertencente ao Reino Straminipila (Filo Oomycota), sendo favorecido por temperaturas entre 25 e 30°C e alta umidade, quando pode ocasionar epidemias em qualquer dos seus hospedeiros (ERWIN e RIBEIRO, 1996; OLIVEIRA e LUZ, 2005). O micélio de *P. palmivora* é asseptado, os zoosporângios são papilados, ovóides e decíduos e os clamidósporos são terminais e intercalares. Sendo uma espécie tipicamente heterotática. Os zoósporos constituem-se nas principais unidades infectivas do patógeno. A formação dos zoosporângios é favorecida por condições de solo ligeiramente mais secas, todavia, a produção e liberação dos zoósporos são favorecidas por solos saturados (KO, 1994). Os fatores ambientais, entre os quais umidade e temperatura, são de importância primordial para que ocorram epidemias (HANADA, 2006).

Embora *P. palmivora* seja um patógeno importante que afeta diversas culturas de relevância econômica como o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), entre outros (DIANESE, 2006), não foram encontrados

relatos na literatura quanto ao seu processo de patogênese em pupunheira. A elucidação de alguns aspectos deste processo e das alterações tissulares decorrentes da infecção é muito importante.

Este trabalho teve como objetivo estudar alguns aspectos relacionados à patogênese, envolvendo penetração e colonização dos tecidos de plântulas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunt.) artificialmente inoculadas com *P. palmivora*.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de pupunheira, com seis meses de idade, cultivadas em sacos de polietileno contendo mistura solo + PLANTIMAX (1:1), em casa-de-vegetação, foram inoculadas com o isolado 870 de *P. palmivora* cultivado em meio de cenoura-agar (CA) por 8 dias, sob luz contínua. Antes da inoculação foram feitos ferimentos leves no estipe, com o auxílio de um bisturi, e em seguida as plantas foram inoculadas através dos seguintes métodos: i) Inoculação com gotas (5µL) de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos/mL, ii) Irrigação do solo, em torno do coleto, com 5 mL de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos/mL, e iii) Inoculação com disco de micélio de 0,7 cm de diâmetro. Foram mantidas plantas testemunhas para cada um dos métodos, utilizando água no lugar da suspensão dos zoósporos e um disco do meio de cultura.

Seis e 12h após as inoculações foram retirados fragmentos dos pontos de inoculação com um bisturi, colocando-os em seguida em uma placa de vidro onde gotas de gluteraldeído foram adicionadas para em seguida serem efetuados cortes de aproximadamente 1 mm^3 de espessura (5 cortes por amostra), os quais foram mantidos por 4 horas em frascos etiquetados contendo uma solução de gluteraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2.

Após este período, as amostras foram lavadas por seis vezes consecutivas durante 10 minutos em tampão cacodilato e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) foram deixadas em tampão cacodilato 0,1 M, por 4 horas. A seguir foram lavadas, novamente, por seis vezes, durante 10 minutos, com o mesmo tampão. Procedeu-se então a desidratação seqüencial em série alcoólica 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 95%, em intervalos de 10 minutos, e por três vezes seguidas, em álcool 100%, a cada 20 minutos.

As amostras foram então submetidas à desidratação em soluções álcool/acetona, 3:1, 1:1 e 1:3, em intervalos de 10 minutos, e por duas vezes consecutivas, em acetona (P.A.), por 15 minutos. Em seguida, foram submetidas ao processo de ponto crítico, por 40 minutos, utilizando-se o equipamento Point Driyer, modelo CPD 030, marca Battec-Critical, e

montadas em “Stubs”, com fita dupla face de carbono. Ao final, procedeu-se a metalização utilizando-se o equipamento Battec-Sputter Coater, modelo SCD 050, que consistiu na deposição de uma fina camada de ouro, com cerca de 20 nm de espessura, durante 80 segundos (Figura 20).

Os cortes foram então examinados ao microscópio eletrônico de varredura pertencente ao Centro de Microscopia eletrônica da Fundação Osvlado Cruz, em Salvador-BA.

5.3. RESULTADOS

Foi observado nas amostras coletadas 6 horas após a inoculação que o processo de infecção já havia ocorrido e a colonização dos tecidos do hospedeiro encontrava-se em andamento. Independentemente do método de inoculação utilizado foram encontrado zoósporos encistados e germinados bem como clamidósporos e esporângios (Figura 21).

Provavelmente, as duas últimas estruturas são fruto da germinação dos zoósporos depositados na superfície do hospedeiro durante a inoculação. Embora em plântulas inoculadas por todos os três métodos tenham sido visualizados esporângios e clamidósporos, foram observadas diferenças entre os métodos em relação à quantidade de tais estruturas assim como de zoósporos encistados.

Foi observada a ocorrência de infecção nas plântulas inoculadas pelos três métodos avaliados, como também o encistamento e a germinação dos zoósporos de *P. palmivora* através da emissão de tubos germinativos, não sendo, entretanto, possível medir o seu comprimento (Figura 21). Observou-se também, a penetração direta nas células da epiderme após a formação de apressórios (Figura 22 A). Seis e 12 horas após a inoculação, não foram, entretanto, observadas alterações nos tecidos das plântulas de pupunha, embora haustórios estivessem presentes no interior das células do xilema, demonstrando assim a rápida colonização do mesofilo pelo patógeno (Figura 22B).

Os eventos da fase de pré-penetração (germinação e emissão de apressório) não puderam ser observados neste trabalho durante os períodos de avaliação utilizados (seis e 12 horas após a inoculação) em plântulas de pupunheira inoculadas pelos três métodos, sendo provável que esta fase tenha ocorrido logo após a inoculação. Manço (1974) citado por Luz e Silva (2001) relata a penetração de *P. palmivora* nas folhas do cacauzeiro, diretamente ou através dos estômatos, com a formação de apressório, três horas após a germinação. Se, eventualmente, o patógeno apresentar o mesmo comportamento, as primeiras observações

teriam que ser feitas duas e quatro horas após a inoculação para que se pudesse evidenciar a fase de pré-penetração.

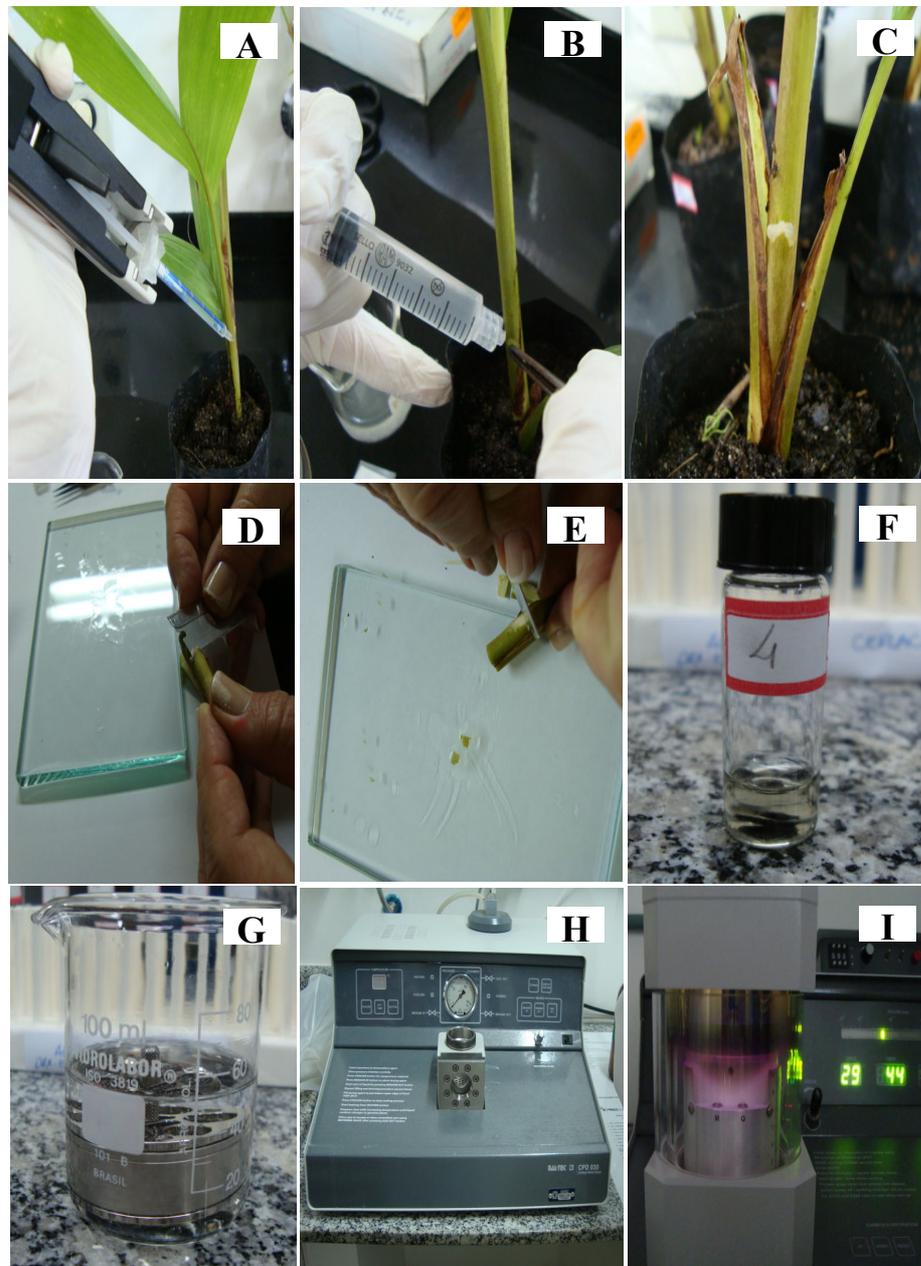


Figura 20. Processamento das amostras: (A) método de gota; (B) método de irrigação com 5mL; (C) método disco de micélio; (D) corte do colmo; (E) fragmentos do colmo; (F) amostra em gluteraldeído; (G) fixação das amostras trocando álcool e acetona; (H) ponto crítico; (I) final do processo de metalização.

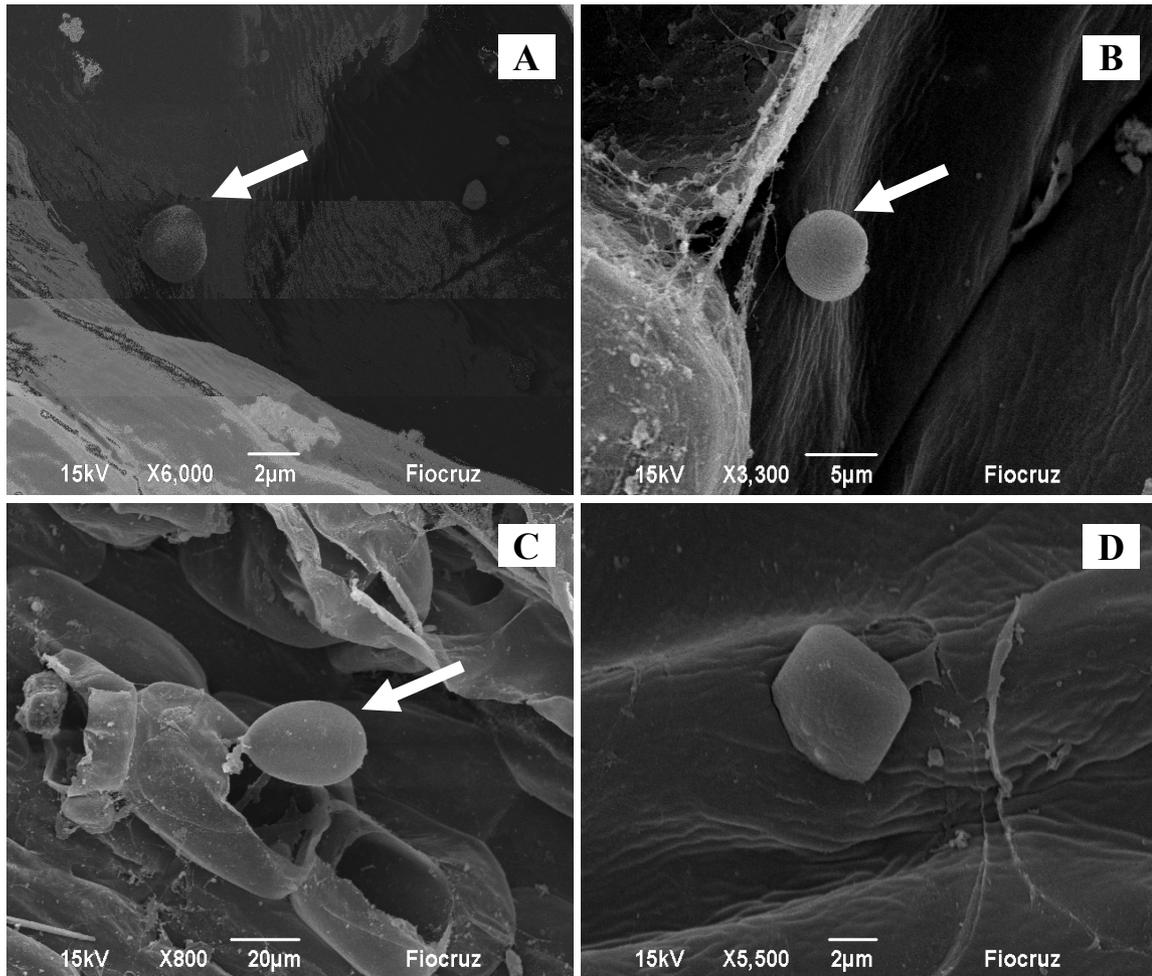


Figura 21. MEV de estruturas de *Phytophthora palmivora*: (A e B) zoósporos encistados; (C) esporângio; (D) Zoósporo aderido à superfície do hospedeiro.

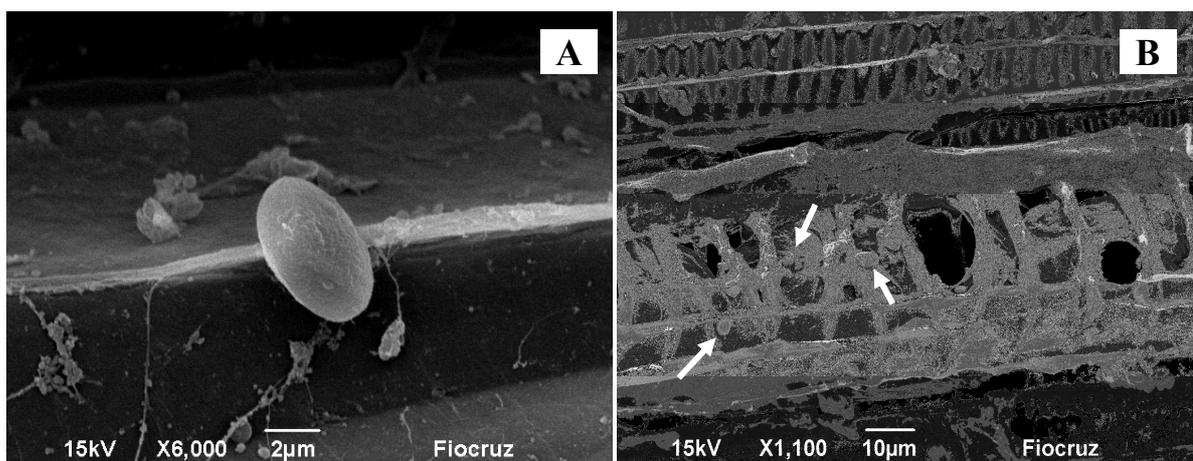


Figura 22. Penetração e colonização de *P. palmivora* nos tecidos do estipe da pupunheira: (A) zoósporos iniciando formação de apressório; (B) haustórios no interior do xilema.

5.4. DISCUSSÃO

A colonização dos tecidos do hospedeiro foi observada tanto em cortes realizados as seis quanto às 12 horas após a inoculação. Foram vistos zoósporos que já haviam penetrado nos estômatos ou diretamente através da epiderme (Figura 23). Santos et al. (1999) também observaram todas estas etapas da infecção no patossistema *P. infestans* x batata. Matsuoka (1988) observou a formação de apressórios durante o processo de infecção no patossistema *P. capsici* x pimentão, notando o desenvolvimento do micélio entre as células e a formação de estrutura semelhante a haustórios. Segundo alguns autores (MATSUOKA, 1988; BRITES1991; HWANG *et al.*, 1989) com o avanço da infecção, o patógeno passa a colonizar intracelularmente atingindo todos os tecidos inclusive os do sistema vascular.

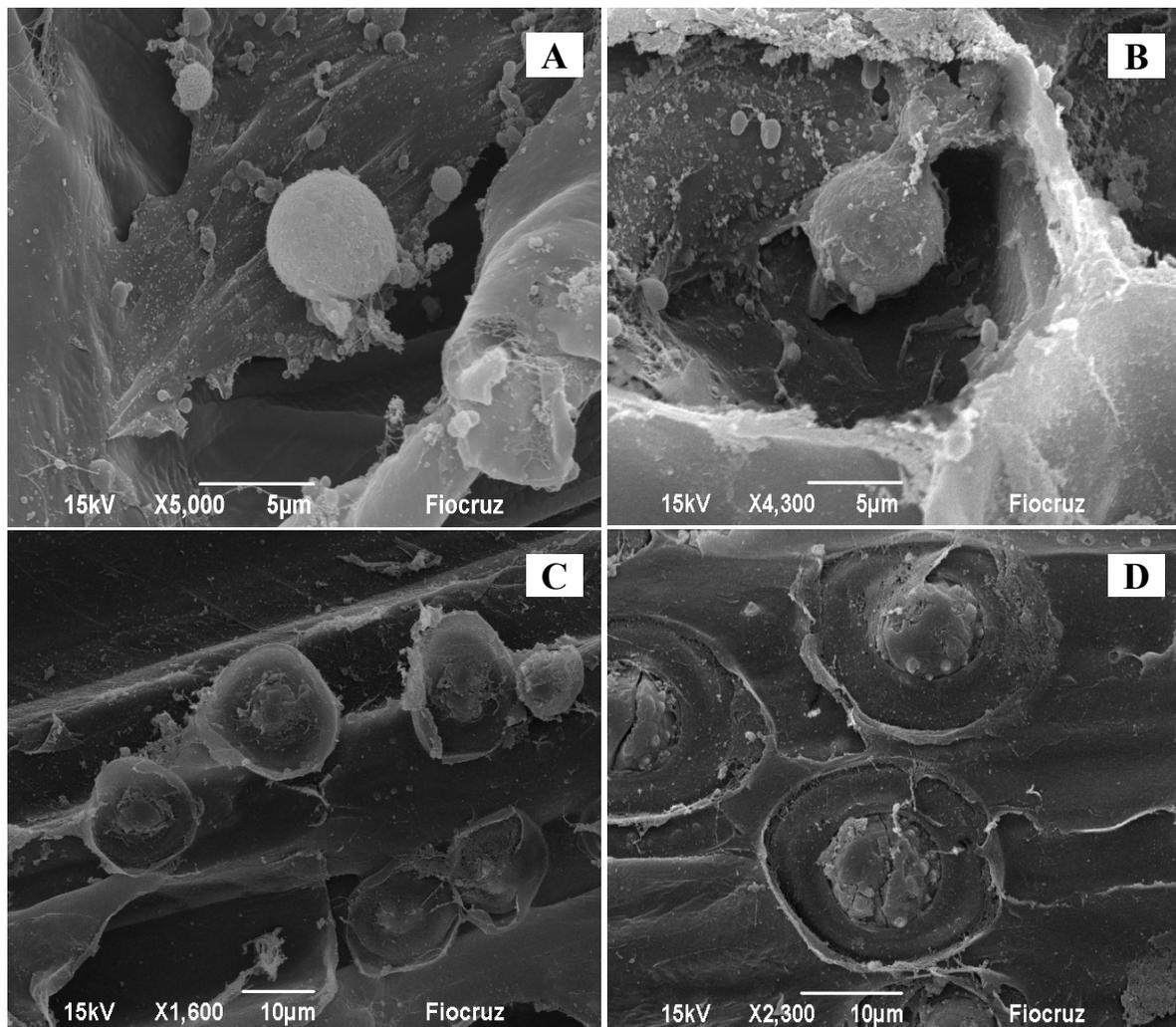


Figura 23. Clamidósporos no interior das células do hospedeiro: (A-D) setas indicando clamidósporos; (D) clamidósporo e hifa.

Embora não tenha sido observado, na análise ao MEV, a emissão do tubo germinativo, foi possível verificar a penetração do patógeno nas células da epiderme do estipe das plântulas de pupunheira.

Embora os cortes para as análises ao MEV tenham sido efetuados próximos aos locais de ferimentos, mesmo assim, foram observados zoósporos encistados ou aderidos à epiderme das plantas (Figura 21D), o que pode sugerir que os zoósporos tenham sido atraídos para esta área. A penetração das espécies de *Phytophthora* nos tecidos do hospedeiro pode ocorrer através dos estômatos, de ferimentos provocados pela queda de tricomonas, ou ainda diretamente pela epiderme, sem que tenha sido observada uma via preferencial de penetração (BRITES, 1991). No patossistema pupunheira x *P. palmivora*, algumas observações sugerem a ocorrência da penetração do patógeno de forma direta pelas células da epiderme da planta (Figura 21D). Fato semelhante foi constatado por Santos et al. (1999), que observaram que na face adaxial de folíolos maduros de seringueira, onde não existem estômatos, a penetração de *P. capsici* ocorreu diretamente pelas células da epiderme, ao contrário da face abaxial, onde a preferência foi pelos estômatos. Os autores atribuem este fato à espessura acentuada da cutícula sobre as células epidérmicas, inviabilizando assim esta via de penetração.

Tanto para seis quanto 12 horas após a inoculação foi observada a colonização do patógeno no interior das células do hospedeiro com a presença principalmente de clamidósporos (Figuras 21, 22 e 23). Haustórios foram visualizados no interior dos tecidos do xilema. Segundo Matsuoka (1988), os haustórios de *Phytophthora* não apresentam a forma típica dos de Uredinales ou Erisiphales, e os produzidos por *P. palmivora* em cacaueteiro apresentam formas variadas. Da mesma forma, aqueles observados em pupunha apresentavam tanto forma quanto tamanho variáveis (Figura 22B).

Embora neste trabalho só tenham sido coletadas amostras 6 e 12 horas após a inoculação, ficou evidenciado que a penetração pode ocorrer tanto de forma direta quanto através dos estômatos, não sendo essencial a presença de ferimentos para que haja a penetração. Tais resultados abrem campo para que trabalhos complementares sejam realizados no sentido de se esclarecer o processo de patogênese neste patossistema.

6. CAPÍTULO 4

SELEÇÃO *in vitro* DE FUNGOS ANTAGÔNICOS A *Phytophthora palmivora* DA PUPUNHEIRA

RESUMO

A podridão do estipe é a mais grave doença da pupunheira na Bahia. Seu agente causal, *Phytophthora palmivora*, apresenta ampla gama de hospedeiros dentre eles cultivos de relevância econômica para o estado. Visando selecionar agentes antagônicos que pudessem ser empregados no controle da doença, foram realizados ensaios *in vitro* confrontando cinco isolados de *P. palmivora* com 40 de agentes de biocontrole (BCAs), 39 isolados de *Trichoderma* spp. e um de *Gliocladium virens*. O percentual de inibição foi calculado e os BCAs comparados em relação a cada isolado de *P. palmivora* através do teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Embora tenha sido observada variação na atuação dos BCAs em relação aos cinco isolados de *P. palmivora*, todos eles mostraram capacidade de inibir o desenvolvimento do fungo, com os percentuais de redução variando de 7 a 48%. Durante o pareamento entre os isolados foram observadas interações de três tipos: entrelaçamento, impasse (antibiose) e substituição, com a predominância do último. Dois BCAs, TC26 (*T. longibrachiatum*) e TC61 (*T. harzianum*), além de provocarem os três tipos de interações, também esporularam sobre as colônias de *P. palmivora*. O isolado 913 (*P. pseudokoningii*), por sua vez, causou antibiose, sendo observado o parasitismo entre as hifas durante as análises ao microscópio eletrônico de varredura. Treze isolados apresentaram potencial de biocontrole para pesquisas futuras: ES4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B e T61 de *T. harzianum*; TC25 de *T. longibrachiatum*; 64 de *T. piluliferum*; ALF 247 de *T. martiale*; 905 de *T. viride*; 7CC de *T. atroviride* e TC26 de *T. koningiopsis*.

Palavras-chave: Controle biológico, *Bactris gasipaes*, podridão-do-estipe.

***IN VITRO* SELECTION OF ANTAGONIC FUNGI TO *Phytophthora palmivora* FROM PEACH PALM**

ABSTRACT

Heart rot of peach palm is the most serious disease of this crop in Bahia. Its causal agent, *Phytophthora palmivora*, presents a wide host range including economically important crops. Aiming to select antagonistic agents to control the disease, *in vitro* assays were carried out, where five isolates of *P. palmivora* were confronted with 40 BCAs, 39 isolates of *Trichoderma* spp. and one of *Gliocladium virens*. The percentage of inhibition against *P. palmivora* was calculated and the BCAs were compared using the Scott-Knott test ($p \leq 0,05$). Although there was variation in the BCAs performances all of them have inhibited *P. palmivora* mycelial growth. Inhibition percentages varied from 7% to 48%. Mycelial interactions between colonies were of the types: intermingling, deadlock and substitution. The BCAs TC26 (*T. longibrachiatum*) e TC61 (*T. harzianum*), in addition of showing the three types of interections, sporulated also on *P. palmivora* colonies. Isolate 913 (*P. pseudokoningii*) caused antibiosis. Hyphal parasitism was observed by SEM. Thirteen isolates deserve more studies: 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*).

Key-words: Biological control, *Bactris gasipaes*, heart rot.

6.1. INTRODUÇÃO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.) é uma palmeira cultivada pertencente à família das arecáceas. No Brasil, seu cultivo teve início na região Amazônica, sendo distribuída em pequenas populações, em áreas abertas por perturbações naturais, ou nas bordas da floresta. A primeira utilização da pupunheira foi para exportação de madeira, depois dos frutos, que são ricos em óleo, e, atualmente, do palmito (FILHO E STURION, 2003).

A pupunheira adaptou-se bem tanto ao cultivo familiar tradicional, como à moderna agricultura com alta utilização de insumos (CLEMENT & BOVI, 1999).

A Região Sul da Bahia possui condições ambientais favoráveis ao seu cultivo, apresentando vantagens, como precocidade, rusticidade, perfilhamento e ausência de oxidação do palmito após o corte. A busca por qualidade, sem comprometer o meio ambiente e a sustentabilidade, tem provocado mudanças no modelo de exploração do palmito no Brasil, cuja atividade foi alimentada até a década de 80, com base apenas no extrativismo das palmeiras juçara (*Euterpe edulis* Mart.) e açai (*Euterpe oleracea* Mart.) (PARADA, acesso 2009). Atualmente, com o plantio da pupunheira tal extração predatória vem sendo reduzida.

Apesar disso, o monocultivo da pupunheira, para produção de palmito, trouxe algumas conseqüências indesejáveis. Segundo Hanada (2006), a agricultura moderna, fundamentada em extensas áreas de plantio, resulta em sistemas ecologicamente não balanceados, que facilitam a ocorrência de epidemias. A prevenção das epidemias tem sido tradicionalmente alcançada utilizando-se fungicidas, no entanto, nas últimas décadas, tem aumentado a conscientização não só em relação à preservação do meio ambiente, como também com os resíduos de pesticidas nos alimentos.

A doença mais importante da pupunheira é a podridão-do-estipe, causada pelo oomicota *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler que, segundo Zentmyer *et al.* (1977), é um patógeno fisiologicamente variável e capaz de infectar dezenas de outras plantas. No

Brasil, a doença foi constatada, pela primeira vez, no Pará por Benchimol et al (2001), que observaram podridão na base do estipe e clorose de folhas mais novas tanto em mudas quanto em plantas adultas. Pizzinatto et al (2002), por sua vez, relataram a ocorrência doença na região do São Francisco, em Pernambuco, em plantas com um ano de idade, as quais apresentavam podridão do colo, escurecimento dos tecidos internos e amarelecimento da folha bandeira.

O controle biológico surge como uma alternativa para atender não só as demandas públicas em relação aos perigos do uso de produtos químicos sobre o meio ambiente, como também, na sustentabilidade agrícola (SAMUELS, 2004). De acordo com Lima et al (2000), a premissa básica do controle biológico é manter a densidade populacional das espécies de pragas e patógenos associadas à agricultura, em níveis econômica e ecologicamente aceitáveis.

Diversos fungos têm sido explorados como agentes de controle de doenças de plantas, por serem amplamente distribuídos e comuns na natureza, por apresentarem alta plasticidade e produção de biomassa, além de possuírem grande capacidade metabólica que os torna competidores agressivos na natureza (CORABI-ADELL, 2004). Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Trichoderma* são, reconhecidamente, os hiperparasitas mais importantes e mais estudados, exibindo variabilidade entre linhagens em relação às atividades de biocontrole, além de um amplo espectro de ação (SILVA, 2000).

Trichoderma é um fungo anamórfico e hemibiotrófico, freqüentemente isolado de solos em diferentes temperaturas, principalmente, de solos tropicais (HARMAN et al. 2004). É eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos (MELO, 1991; 1998), podendo também ser utilizado como protetor de sementes, já que se desenvolve na espermosfera e acompanha o crescimento das raízes da plântula (HARMAN, 2000). As espécies *T. Harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* são as mais utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos (HERMOSA et al, 2000).

Dentre os mecanismos de ação utilizados pelos antagonistas do gênero *Trichoderma*, existem dois principais: i) antibiose – que consiste na produção de uma série de enzimas extracelulares que degradam as paredes de células fúngicas (MENEZES e SOUZA, 1995); e ii) hiperparasitismo – que é a habilidade de colonizar hifas e esporos do patógeno (BASTOS, 1991). De acordo com Melo (1991), para que uma espécie de *Trichoderma* seja um ótimo agente de biocontrole, é essencial que apresente mais de um mecanismo de ação, que não

cause impacto negativo ao meio ambiente, que tenha estruturas de reprodução de fácil propagação, principalmente, em substratos naturais, e que o tempo de vida em prateleira, quando formulado, seja razoavelmente longo e com boa viabilidade.

Alguns agentes de biocontrole além controlarem os patógenos, apresentam também a capacidade de promover o crescimento das plantas através da produção de hormônios vegetais e de vitaminas, da conversão de elementos a uma forma utilizável pelas plantas, facilitando assim a absorção e translocação de minerais (MELO, 1998; HOWELL, 2003).

Na seleção *in vitro* de agentes de biocontrole, existem vários métodos, entretanto, o mais utilizado é o do pareamento das culturas ou de confronto direto (MARIANO, 1993), cujos resultados têm mostrado boa correlação com os obtidos em estudos *in vivo* (ETHUR et al, 2001). A capacidade de parasitismo do antagonista e a inibição do crescimento do patógeno são avaliadas medindo-se o seu crescimento sobre o patógeno e o deste em relação ao antagonista, em comparação ao crescimento do patógeno sem a presença do antagonista.

Este trabalho teve como objetivos: i) avaliar os efeitos de espécies de *Trichoderma* sp. no controle *in vitro* de isolados de *P. palmivora* obtidos da pupunheira, e ii) estudar a interação e possíveis mecanismos de ação de agentes de biocontrole utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos na Clínica Fitopatológica Waldemar Tobias Lellis e na Unidade de Biocontrole do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), situado em Ilhéus, Bahia, além dos laboratórios de microscopia eletrônica da UESC, em Ilhéus, e da UEFS, em Feira de Santana.

Obtenção e manutenção de isolados de *Phytophthora palmivora*

Os isolados 401, 524, 859, 870, 1086 de *Phytophthora palmivora* pertencentes à coleção Arnaldo Medeiros do CEPEC obtidos de pupunheiras procedentes da INACERES, Uruçuca, BA, foram rotineiramente preservados em água pelo método Castellani (DHINGRA e SINCLAIR, 1994). Para a realização dos ensaios, discos de micélio dos isolados eram retirados da água, e transferidos para placas de petri contendo o meio seletivo PARPH

(pimaricina, 10mg; ampicilina, 250 mg; rifampicina, 10mg; PCNB, 100mg; cornmeal-ágar, 17 g; água p.s.p. 1000 mL) descrito por Kannwischer e Mitchell (1978). Periodicamente, os isolados eram revitalizados através da inoculação na parte abaxial de folhas de pupunheira com discos de micélio (0,7 cm), após terem sido lavadas e esterilizadas superficialmente. As folhas eram então mantidas em câmaras úmidas até o aparecimento de lesões (3-4 dias) (Figura 24). Das bordas das lesões foram obtidas pequenas secções que eram então transferidas para placas contendo meio seletivo e, posteriormente, repicadas para o meio de cenoura ágar (CA) (cenoura 200g, ágar 17g, 1000 mL água destilada).

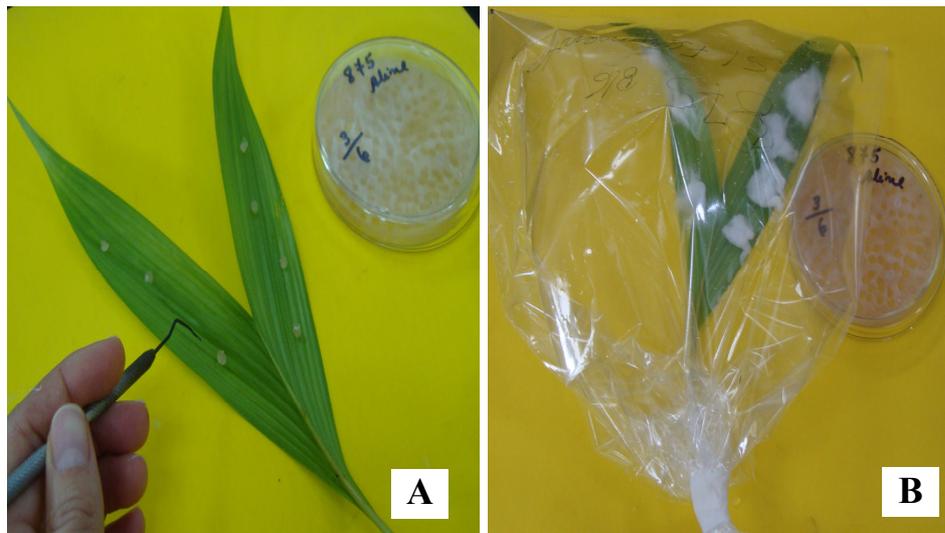


Figura 24. Procedimentos para revitalização de isolados de *Phytophthora palmivora* em folhas de pupunheira: (A) detalhe da inoculação com discos de micélio; e (B) folhas inoculadas e mantidas em câmara-úmida.

6.2.1 Obtenção e manutenção de isolados de agentes antagônicos

Trinta e nove isolados de *Trichoderma* spp., sendo 37 pertencentes à Coleção da Unidade de Controle Biológico do CEPEC e dois provenientes de isolamentos de pupunheiras coletadas nos viveiros da INACERES, foram utilizados nos trabalhos. O isolado T68 de *Gliocladium virens* completou o total de quarenta isolados de agentes antagônicos avaliados (Tabela 6). Para serem utilizados nos ensaios, os isolados foram multiplicados em placas contendo meio de BDA (200g de batata, 20 de ágar, 10g de dextrose, 800 mL de água destilada) incubadas em laboratório à temperatura ambiente ($23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), por cinco dias.

6.2.2 Confronto entre isolados de *Phytophthora palmivora* e *Trichoderma* spp.

Discos de micélio com 0,7cm de diâmetro, obtidos de culturas de *P. palmivora*,

Tabela 6. Relação de isolados de diferentes espécies de *Trichoderma* e *Gliocladium* utilizados no trabalho.

Isolados	Espécie	Cultura	Local	Origem
ALF247	<i>Trichoderma martiale</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
ES4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tronco/cacau	Ilhéus	CEPLAC
SF04	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tronco de cacau	Ilhéus	CEPLAC
TRIC CUD 3	<i>Trichoderma</i> sp.	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
7CC	<i>Trichoderma atroviride</i>	Solo	Mucugê	CEPLAC
TC25	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Tronco de cacau	Ilhéus	CEPLAC
TC26	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Tronco de cacau	Ilhéus	CEPLAC
TC61	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
62	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
64	<i>Trichoderma piluliferum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
T68	<i>Gliocladium virens</i>	Pupunha	Eunápolis	CEPLAC
T70	<i>Trichoderma harzianum</i>	Maracujá	Eunápolis	CEPLAC
213	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Mamão	Teixera	ALGE
281	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
291	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tronco/cacau	Ilhéus	CEPLAC
312	<i>Trichoderma martiale.</i>	Tronco/cacau	Ilhéus	CEPLAC
316	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tronco/cacau	Ilhéus	CEPLAC
421	<i>Trichoderma harzianum</i>	Mamão	Teixera	F.P*
611	<i>Trichoderma harzianum</i>	Mamão	Eunápolis	F.E*
854	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Casqueiro	Ilhéus	CEPLAC
889	<i>Trichoderma harzianum</i>	Casqueiro	Ilhéus	CEPLAC
905	<i>Trichoderma viride</i>	Solo	Uruçuca	Inaceres
906	<i>Trichoderma piluliferum</i>	Madeira	Uruçuca	CEPLAC
909	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Solo	Ilhéus	CEPLAC
910	<i>Trichoderma harzianum</i>	Solo	Ilhéus	CEPLAC
911	<i>Trichoderma harzianum</i>	Solo	Ilhéus	CEPLAC
913	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Madeira	Ilhéus	CEPLAC
2076	<i>Trichoderma atroviride</i>	Cacau	Uruçuca	CEPLAC
2927	<i>Trichoderma harzianum</i>	Pupunha	Arataca	CEPLAC

Continua...

Continuação...

Isolados	Espécie	Cultura	Local	Origem
2952	<i>Trichoderma harzianum</i>	Casqueiro	Porto Seguro	CEPLAC
3188	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Cacau	Jacareci	CEPLAC
3196	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cacau	Ilhéus	CEPLAC
3225	<i>Trichoderma harzianum</i>	Pupunha	Eunápolis	CEPLAC
4090	<i>Trichoderma harzianum</i>	-	Ilhéus	CEPLAC
4005	<i>Trichoderma piluliferum</i>	Substrato	Inaceres	Inaceres
4006 ^a	<i>Trichoderma harzianum</i>	Substrato	Inaceres	Inaceres
06B	<i>Trichoderma harzianum</i>	Substrato	Inaceres	Inaceres
4083	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tronco cacau	Ilhéus	CEPLAC
4506	<i>Trichoderma harzianum</i>	Raiz/pupunha	Una	CEPLAC
4508	<i>Trichoderma harzianum</i>	Colmo/pupunha	Una	CEPLAC

- F.P = Fazenda Primavera; F.E = Fazenda Eduardo

crescidas em CA, foram colocados a 2 cm das bordas de placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Quarenta e oito horas após, em lados opostos, foram repicados discos de micélio, de igual diâmetro, de cada isolado dos antagonistas (Figura 25), de tal forma que todas as possíveis combinações entre os isolados de *P. palmivora* e dos agentes de biocontrole, fossem confrontadas. Para as testemunhas foram mantidas placas inoculadas, no centro, com cada um dos isolados de *Phytophthora palmivora* e de *Trichoderma* spp. As placas foram incubadas à temperatura ambiente (23±1°C) e o experimento conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, e repetido duas vezes.

O experimento foi avaliado com base no diâmetro das colônias a 24, 48 e 72h após o confronto. Os dados obtidos foram utilizados nos cálculos dos percentuais de inibição no crescimento de *Phytophthora palmivora* por isolados de *Trichoderma* spp., ao se considerar o seu crescimento em placas sem a confrontação (testemunha). Os dados foram analisados pelo método de agrupamentos e pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Ao se observar as culturas confrontadas, ao microscópio estereoscópico, procurou-se fazer distinção entre os tipos de interações que ocorreram, considerando-se a classificação de Moore-Landecker (1996).

6.2.3 Estudos histopatológicos das interações entre *P. palmivora* e *Trichoderma* spp. utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura

Objetivando estudar, histopatologicamente ao Microscópio de Eletrônico de Varredura (MEV), as interações entre isolados de *P. palmivora* e *Trichoderma* spp., foram efetuados pareamentos entre os isolados 870, 859 e 401 de *P. palmivora* e os isolados 2076; 4508; T70; T68; ALF247 e 281 de *Trichoderma* spp.

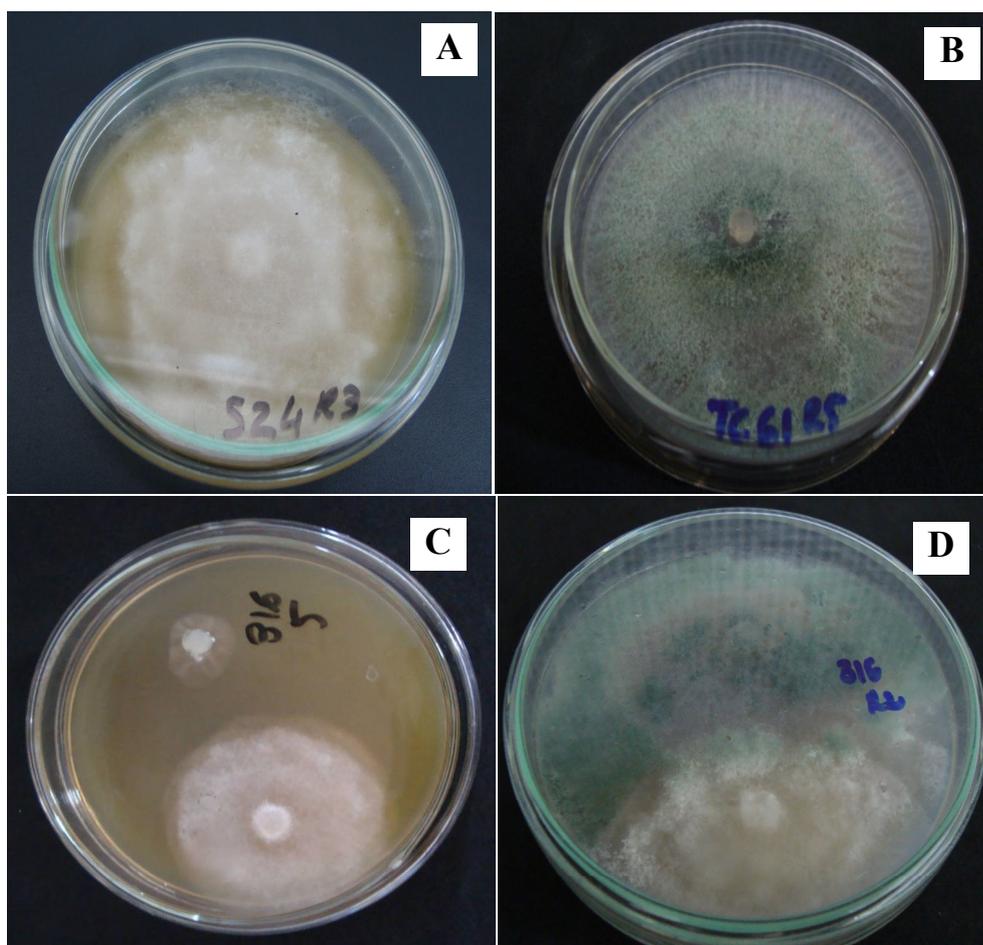


Figura 25. Detalhes do método de pareamento entre isolados de *P. palmivora* e *Trichoderma* spp.: (A) cultura de *P. palmivora*; (B) cultura de *Trichoderma* sp. (C-D) confronto entre *P. palmivora* e um BCA. Detalhes das culturas confrontadas 24h (C), e 72 (D) após a inoculação do BCA.

Setenta e duas horas após o pareamento entre isolados dos BCAs com os de *P. palmivora*, fragmentos foram retirados da área de contato entre hifas, utilizando um estilete, e colocados em uma placa de vidro onde gotas de gluteraldeído foram adicionadas. A seguir,

foram efetuados cinco cortes de 1 mm³ de espessura por amostra, os quais foram então mantidos em frascos contendo solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por 4 horas. Após este período, as amostras foram lavadas, seis vezes consecutivas, durante 10 minutos em tampão cacodilato. Efetuou-se a seguir, a pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, por 4 horas, sendo as amostras novamente lavadas, seis vezes consecutivas, durante 10 minutos, com o mesmo tampão. Procedeu-se então a desidratação seqüencial em uma série alcoólica 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, em intervalos de 10 minutos, e por três vezes seguidas, em álcool 100%, a cada 20 minutos. As amostras foram a seguir submetidas à desidratação em soluções contendo álcool e acetona, nas proporções 3:1, 1:1, e 1:3, em intervalos de 10 minutos, e por duas vezes consecutivas, em acetona (P.A.) por 15 minutos cada. As amostras foram então submetidas ao processo de ponto crítico, por cerca de 40 minutos, e montadas em “Stubs” com fita dupla face de carbono. Ao final, foi feita a metalização através da deposição de uma fina camada de ouro de 20 nm de espessura, durante 80 segundos (Figura 26).

6.3. RESULTADOS

Os cinco isolados de *Phytophthora palmivora* avaliados cresceram de forma similar e tomaram quase completamente as placas com CA aos cinco dias de cultivo, enquanto que os dos BCAs apresentaram um crescimento ligeiramente superior, tomando as placas entre 48 e 72 horas, e muitos já apresentando esporulação.

Todos os BCAs testados provocaram alguma inibição no crescimento dos cinco isolados de *P. palmivora*, embora não tão perceptíveis, como no caso dos isolados 906 e 4508 em relação ao isolado 870. A máxima inibição no crescimento micelial de *P. palmivora* provocada pelos BCAs foi de 48%, registrada no confronto do isolado 401 com os BCAs 64, ALF247 e ES4; e a mínima, de 7%, no confronto do isolado 870 com o BCA 906.

Foi observada variação na atuação dos BCAs em relação aos cinco isolados de *P. palmivora* testados. Pela ANOVA, o valor de F para a variável isolados de *P. palmivora* foi altamente significativo. Os isolados 401, 859 e 524 de *P. palmivora*, foram os que sofreram maiores inibições em relação a todos os BCAs avaliados. Ao se analisar cada isolado de *P. palmivora* em relação aos BCAs, foi observada significância somente para os isolados 401, 870 e 1086, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), havendo a formação de grupos apenas para tais isolados. Para o isolado 524, a variação na inibição do seu crescimento quando

confrontado com os BCAs, foi de 20% (BCA 4090) a 33% (BCA 3188), e para o isolado 859 de 18% (BCA TRICCU3) a 37% (BCA4508) (dados não mostrados).

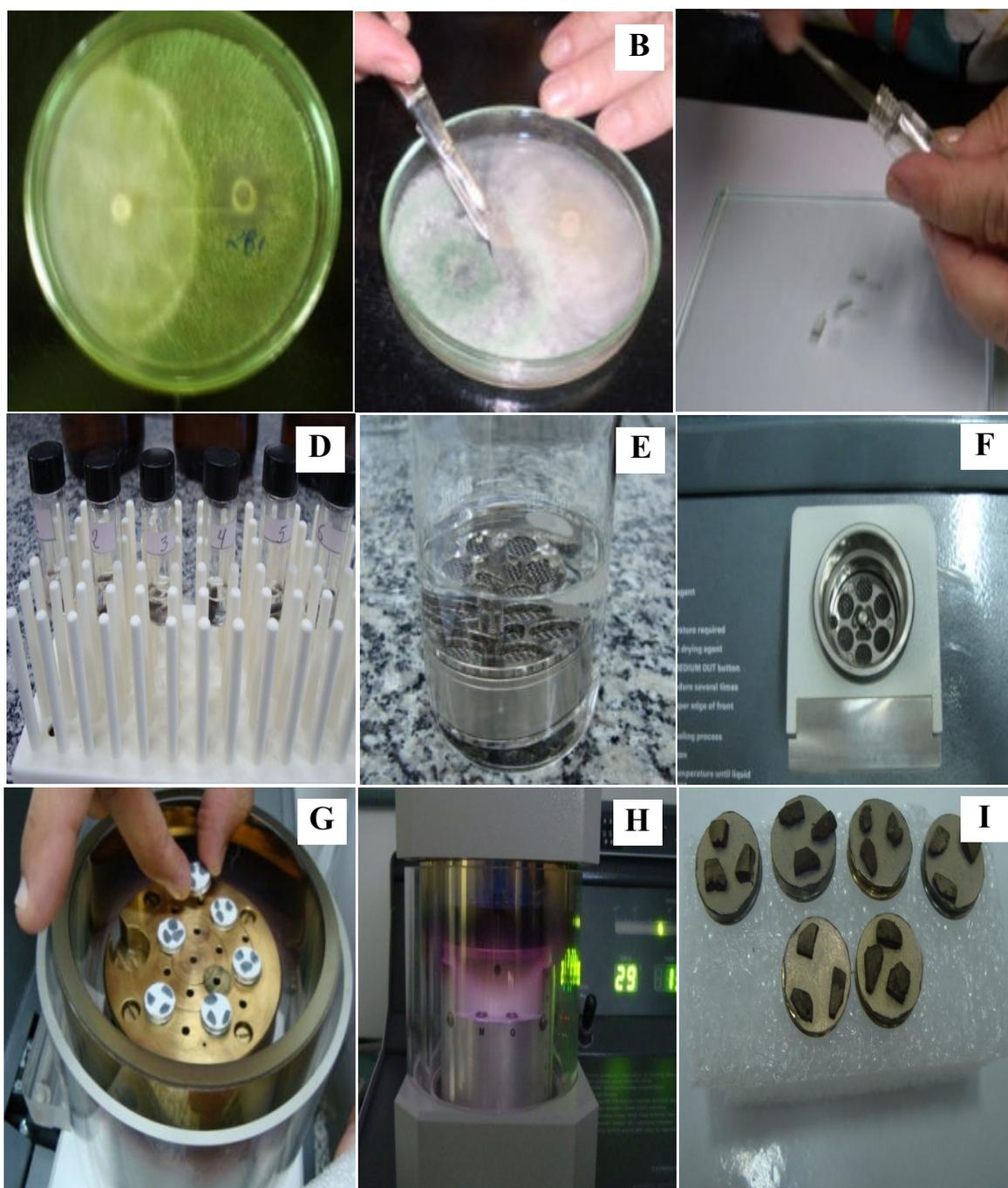


Figura 26. (A-F) Obtenção e processamento de amostras para serem examinadas ao MEV, processo de metalização: (A) antagonismo, (B) corte na interseção; (C) amostras em Glutaraldeído; (D) estante com as amostras; (E) fixação; (F) Ponto Crítico (Battec- CPD 030 Critical Point Dryer). (G) Stubs com as amostras 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.

Para o isolado 401, onde a variação na redução do crescimento foi maior, de 28% (BCAs 905, 213 e 62) a 48% (BCAs 64, ALF247 e ES4), três grupos foram formados (Tabela 7), com destaque para os BCAs do grupo A (64, ALF247, ES4 e 889), os quais causaram redução entre 45 e 48% no crescimento do patógeno. Alguns isolados do grupo B além de serem distinguidos com base na redução do crescimento, o foram também através de observações visuais.

Tabela 7. Porcentagem de redução do crescimento das colônias de três isolados de *Phytophthora palmivora* (401, 870, 1086) por ação de 40 agentes de biocontrole potenciais.

BCAs X Iso 401		BCAs X Iso870		BCAs X Iso 1083	
64	48 a	4090	28 a	ES4	35 a
ALF247	48 a	316	26 a	3196	29 b
ES4	48 a	4006 ^a	25 a	213	27 c
889	45 a	64	25 a	4006A	27 c
909	44 b	2952	24 a	64	26 c
4083	43 b	TC61	24 a	TRICCU3	26 c
4006 A	43 b	4005	23 a	913	26 c
281	43 b	3225	23 a	T68	25 c
312	40 b	421	23 a	4005	25 c
7CC	39 b	4006B	22 a	611	24 c
TC61	39 b	4083	22 a	2952	24 c
911	39 c	7CC	22 a	421	24 c
2952	37 c	ALF247	22 a	TC61	24 c
854	37 c	611	21a	4508	24 c
2076	37 c	909	21 a	4506	23 c
3225	37 c	312	21 a	889	23 c
4506	36 c	SF04	21 a	2927	23 c
TRICCU3	35 c	911	21 a	854	23 c
421	35 c	3196	20 a	4006B	23c
2927	35 c	281	20 a	3225	22 c
T70	34 c	854	19 a	ALF247	22 c
TC25	34 c	3188	19 a	281	22 c
611	33 c	TRICCU3	19 a	2076	22 c
4006B	33 c	ES4	18 b	62	22 d
4005	33 c	913	18 b	911	21 d
T68	33 c	2076	18 b	T70	21 d
TC26	32 c	TC26	18 b	906	21 d

Continua...

Continuação...

BCAs X Iso 401		BCAs X Iso870		BCAs X Iso 1083	
316	32 c	889	17 b	905	21 d
4090	32 c	291	16 b	SF04	21 d
291	31 c	62	16 b	3188	21 d
SF04	31 c	213	16 b	909	20 d
910	30 c	T70	15 b	7CC	20 d
913	30 c	2927	14 b	910	20 d
3188	30 c	910	14 b	TC25	18 d
3196	30 c	T68	12 b	316	18 d
4508	30 c	TC25	12 b	312	18 d
906	29 c	905	11 b	TC26	17 d
905	28 c	4506	11 b	4090	16 d
213	28 c	4508	9 b	4083	16 d
62	28 c	906	7 b	291	15 d

Valores percentuais seguidos da mesma letra indicam indivíduos pertencentes ao mesmo cluster de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Para o isolado 870, a variação na inibição do crescimento foi entre 7% (BCA 906) e 28% (BCA 4090), com apenas dois grupos sendo formados. No primeiro grupo, com 16 BCAs, a variação na inibição foi de 20 e 28%, e no segundo, ficaram os BCAs que provocaram inibições inferiores a 20% no crescimento do patógeno. Para o isolado 1086, a inibição variou entre 15 (291) e 35% (ES4) sendo formados quatro grupos. Os dois primeiros, compostos de apenas um BCA cada, com inibição de 29 (3196) e 35% (ES4), respectivamente.

Observando os tipos de interação entre os isolados de *P. palmivora* quando confrontados com os 40 candidatos a BCAs, tanto a olho nu quanto ao microscópio, constatou-se que os três tipos de interação, descritos por Moore-Landecker (1996), ocorreram no experimento. Sem distinguir os isolados de *P. palmivora*, os BCAs 312, 4083, 4006 A, 64, 3188, 4508 e 4090 apresentaram entrelaçamento (Figura 27 B); T68, T70, 213, 291, 611, 909, 910 e 3188, substituição (Figura 27 C); e 913, TC26 e TC61 foram os únicos a causar impasse, com a formação de um nítido halo amarelo ao redor das colônias de *P. palmivora*, caracterizando assim antibiose (Figura 27 A). Os BCAs: Es4, TC25, 64, ALF 247, 421, 829, 905, 2927, 2952 e 4006B, além de apresentarem interação do tipo substituição, esporularam sobre as colônias do patógeno, o mesmo ocorrendo com SF04, 281, e 316.

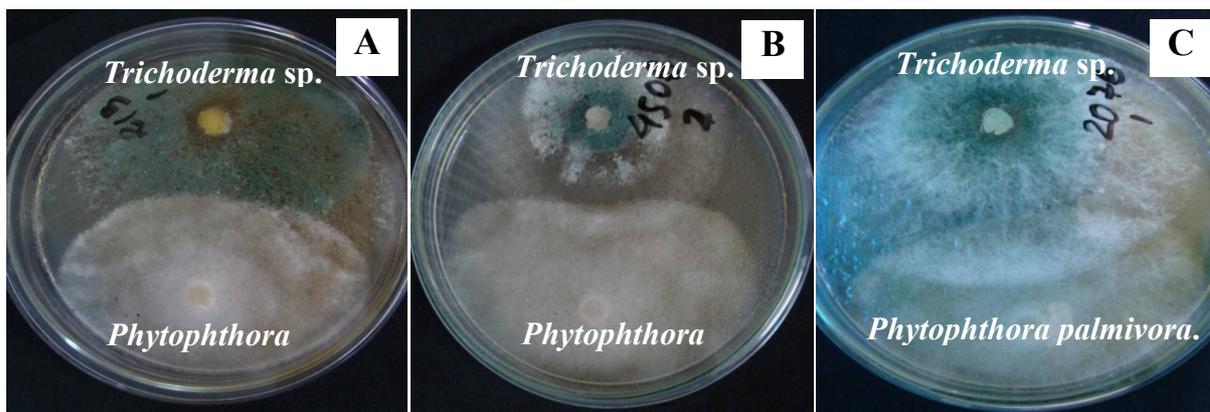


Figura 27. Classificação das interações entre *P. palmivora* e *Trichoderma* sp: (A) impasse; (B) entrelaçamento e (C) substituição.

Dois BCAs, TC26 (*T. longibrachiatum*) e TC61 (*T. harzianum*), apresentaram todos os três tipos de interação, além de esporularem sobre as colônias do patógeno.

Em função da impossibilidade de se examinar, ao MEV, um grande número de colônias confrontadas, foram selecionados cinco BCAs (2076, 4508, T70, T68, e ALF247) e três isolados de *P. palmivora* (870, 859 e 401). A escolha dos BCAs foi feita com base nos tipos de interação apresentados, priorizando aqueles que apresentaram esporulação sobre as culturas do patógeno. Ao MEV foi visualizado, na região de confronto, o enrolamento das hifas de *Trichoderma* spp. no micélio de *P. palmivora* (Figura 28), comprovando, assim, o parasitismo dos BCAs sobre os isolados do patógeno.

6.4 DISCUSSÃO

Visando selecionar agentes de biocontrole (BCAs) *in vitro* que pudessem ser utilizados futuramente no controle da podridão-do-estipe da pupunheira, foram realizados ensaios de pareamento procurando confrontar cinco isolados de *P. palmivora*, com 40 candidatos a BCAs. Os cinco isolados de *P. palmivora* avaliados apresentaram diferenças entre si quando confrontados com os BCAs. Alguns BCAs que provocaram redução de 30 ou 40% no crescimento de isolados de *P. palmivora* mostraram menor ação sobre uns do que sobre outros, indicando que existem variações entre os isolados obtidos de pupunheira. Paim (2005), também observou variações morfológicas e moleculares (RAPD) entre os isolados

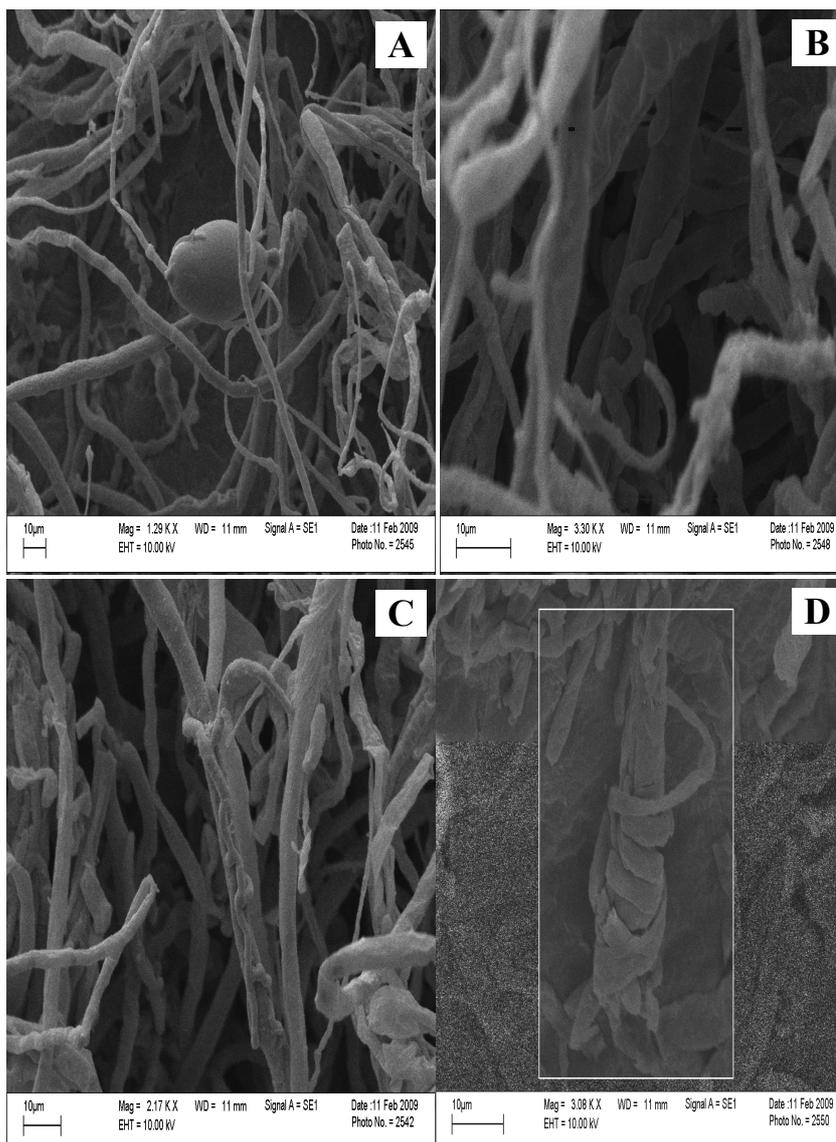


Figura 28. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando o parasitismo e interações de *Trichoderma* sp. com *Phytophthora palmivora*. (A) esporângio de *P. palmivora* sendo parasitado pela hifa de *Trichoderma* sp. (B, C e D) hifas de *Trichoderma* sp. enroladas nas hifas de *P. palmivora*.

de *P. palmivora* de pupunheira, notadamente quando comparados com àqueles obtidos de mamoeiro e cacaueteiro. Desta forma, haveria a necessidade da realização de mais investigações em relação à variabilidade entre isolados desta espécie originários da pupunheira.

Observou-se que a maior ação inibitória exercida pelos BCAs sobre o crescimento dos isolados do patógeno, foi de 48% (isolado 401 com os BCAs 64, ALF247 e ES4), resultados

estes inferiores aos apresentados por diversos agentes de biocontrole já confrontados com isolados de *P. palmivora* provenientes de outros hospedeiros.

Tavares (2009) testando 70 BCAs de diferentes espécies de *Trichoderma* contra isolados do agente causal da podridão das raízes do mamoeiro *in vitro*, observou reduções de 46,3 a 74,5%, com pelo menos 21 isolados apresentando mais de 50% de inibição. Os resultados de Tocafundo (2008), por outro lado, são mais semelhantes aos obtidos neste trabalho. De um total de 18 isolados de *Trichoderma* avaliados, a autora observou que 16 apresentaram inibição no crescimento de *P. palmivora* de 29 e 54%. Dois isolados foram capazes de inibir 50% ou mais do crescimento do patógeno.

Com relação à atuação de *Trichoderma* em outras espécies de *Phytophthora*, Corrêa (2002) observou bom desempenho dos BCAs, *in vitro*, também sobre *P. nicotianae*. Contra patógenos de outros gêneros, como *Rhizoctonia solani*, mais de 20 isolados de *Trichoderma* entre 68 testados, foram capazes de inibir o crescimento do fungo de 70 e 100% (PINTO, 2002).

Espécies de *Trichoderma* são parasitas de uma ampla gama de fitopatógenos, a despeito da maioria dos empregados como agentes no biocontrole de doenças de plantas, apresentarem certo grau de especialização. Desta forma, o nível de controle pode variar dentro e entre espécies de *Trichoderma* a depender de sua adaptação às condições bióticas e abióticas (LOUZADA et al, 2009).

No presente estudo, a grande maioria dos isolados de *Trichoderma* era proveniente da região sul da Bahia, e vários deles se revelaram efetivos *in vitro* contra diversos fitopatógenos importantes, tais como *P. palmivora* do mamoeiro e da pupunheira e *Moniliophthora perniciosa* do cacauzeiro (dados não publicados). O potencial dos isolados testados, necessita ainda ser melhor avaliado em ensaios conduzidos sob condições controladas e de campo.

Os três tipos de interação descritos por Moore-Landecker (1996), foram aqui observados entre *P. palmivora* x *Trichoderma spp* (Figura 27). No caso do isolado de *Gliocladium virens* (T68) avaliado, foi observada interação do tipo substituição, havendo superposição do micélio em todos os isolados de *P. palmivora* testados, além da esporulação sobre as colônias do patógeno. Três isolados de *Trichoderma* T26 (*T. koningiopsis*), T61 (*T. harzianum*) e 913 (*T. pseudokoningii*) causaram antibiose, embora, tivessem crescido, posteriormente, sobre a colônia de *P. palmivora*, paralisando o seu desenvolvimento. A antibiose é um dos principais mecanismos de ação dos antagonistas do gênero *Trichoderma* (BASTOS, 1991), sendo este mecanismo ainda mais importante, quando está aliado ao

parasitismo. A associação de mais de um mecanismo de ação em um BCA é essencial, segundo Melo (1998).

A despeito de não ter sido usada neste trabalho, a metodologia mais adequada para avaliar a existência de antibiose (Bharat et al., 1980), foi possível observar algumas mudanças de coloração do meio de cultura (Figura 27 A), além da formação de halo, indicando a produção de substâncias antibióticas por parte dos antagonistas. Para Claydon et al. (1987), antibióticos são produtos do metabolismo secundário que podem ser até mais importantes do que a competição, por espaço ou nutrientes, na inibição de outros organismos.

Bonfim (2007) comprovou a produção de metabólitos voláteis por várias espécies de *Trichoderma*, principalmente, pela espécie *T. viride*.

Todos os tipos de interação observados mostraram, em maior ou menor grau, a capacidade antagônica dos BCAs na inibição do crescimento de *P. palmivora*. Entretanto, a interação por substituição, demonstrou ser visualmente mais drástica que o entrelaçamento, principalmente, quando acompanhada da esporulação sobre a colônia do patógeno (Figura 27). Neste trabalho, os seguintes BCAs apresentaram tal característica: ALF 247, ES 4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B, T 61, TC 25, 64, 905, 7CC e TC26. Tais isolados pertencem a diferentes espécies de *Trichoderma*, o que mostra que esta característica é comum ao gênero.

Ao serem observadas interações do tipo substituição ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), se constatou a presença de hifas de *Trichoderma* enovelando as de *P. palmivora* (Figura 28), caracterizando assim o mecanismo de hiperparasitismo.

Inbar et al. (1996) e Ávila et al. (2005), também verificaram por meio do MEV e da microscopia de luz, interações semelhantes entre hifas de *T. harzianum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*.

Deve ser levado em consideração que os resultados com antagonistas obtidos *in vitro*, nem sempre podem ser confirmados em condições de campo, uma vez que esses organismos estão sujeitos a reações diferenciais do hospedeiro e do ambiente (Harman 1990), embora Mariano (1993) e Ethur et al. (2001), tenham obtido boas correlações entre resultados de estudos *in vitro* com aqueles obtidos em campo para diversos patógenos e culturas.

Deste modo, os isolados ES 4, 421, 889, 2927, 2952, 4006 B, T 61 (*T. harzianum*), TC 25 (*T. longibrachiatum*), 64 (*T. piluliferum*), ALF 247 (*T. martiale*), 905 (*T. viride*), 7CC (*T. atroviride*), TC26 (*T. koningiopsis*) e 913 (*T. pseudokoningii*) poderiam ser recomendados para serem testados *in vivo* no controle da podridão-do-estipe da pupunheira, uma vez que apresentaram os mecanismos de antibiose e parasitismo, além da capacidade de esporularem sobre as colônias do patógeno.

7.0 CONCLUSÕES

1. Todos os métodos de inoculação testados causaram alterações fisiológicas nas plântulas, independente das concentrações de inóculo utilizadas;
2. As variáveis, altura da parte aérea, comprimento do sistema radicular e massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular das plântulas podem ser utilizadas na avaliação da patogênese neste patossistema;
3. O método de imersão do sistema radicular nas suspensões de inóculo 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos/mL foi o mais drástico;
4. Para avaliar resistência no patossistema *P. palmivora* x pupunheira pode-se utilizar o método de irrigação com 1 mL da suspensão de zoósporos nas concentrações de 1×10^5 ou 5×10^5 zoósporos/mL, em torno do coleto das plântulas.
5. Ferimentos não foram necessários à penetração de *P. palmivora*, mas são importantes na aceleração do processo de infecção em plântulas de pupunheira inoculadas com o patógeno;
6. A fase de pré-infecção da interação *Phytophthora palmivora* x pupunheira ocorre antes de 6 horas após a inoculação;
7. Independentemente da metodologia de inoculação utilizada, foi observada a colonização dos tecidos em todas as plântulas inoculadas, nos cortes efetuados as 6 e 12 horas após a inoculação;
8. Haustórios do patógeno foram observados no interior de vasos do xilema das plântulas de pupunheira inoculadas;
9. Os 40 BCAs confrontados *in vitro* com *P. palmivora* provocaram alguma inibição no patógeno, com os percentuais de redução variando de 7 (BCA 906 X 870) a 48% (BCAs 64, ALF247 e ES4 X 401);
10. No confronto entre colônias houve interações dos tipos entrelaçamento, impasse (antibiose) e substituição com predominância do último;
11. Dois BCAs testados, TC26 (*T. longibrachiatum*) e TC61 (*T. harzianum*) provocaram os três tipos de interações e também esporularam sobre as colônias de *P. palmivora*;

12. Treze BCAS 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*);
13. Os BCAs selecionados apresentaram os mecanismos de hiperparasitismo e/ou antibiose;
14. Esta pesquisa trouxe importantes subsídios à elucidação da patogênese na interação *P. palmivora* x pupunheira.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2009.495 p.

AGRIOS, G. N. Manual de Fitopatologia. 2 ed. México, 1998.v.1, 332-336p.

ALMEIDA, M. Emprego da cultura *in vitro* para a multiplicação vegetativa de Pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) PALMAE. 1994. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

ANEFALOS, L. C.; TUCCI, M. L. S.; MODOLO, V. A.; SPIERING, S. H.; OLIVEIRA, A. F. de. Impactos econômicos da pesquisa com a cultura da pupunheira no Estado de São Paulo. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Porto Alegre, 2009.2p.

ASHBY, S. F. Strains and taxonomy of *Phytophthora palmivora* Butler (*P. faberi* Maublanc). Transactions of the British Mycological Society, 1929. v. 14, p. 18-38.

ÁVILA, Z. R., CARVALHO, S.S., BRAÚNA, L. M., GOMES, D. M. P. A., SILVA, M. C. F. & MELLO, S. C. M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa 177. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2005. 30p.

BASTOS, C.N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauzeiro. In: BETTIOL, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.

BENCHIMOL, R. L.; ALBUQUERQUE, F. C. de; TRINDADE, D. R.; MULLER, C. H. Doenças Causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Editora Rural, 2001. 612-613p.

BENCHIMOL, R. L.; ALBUQUERQUE, F. C.; POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R. & MÜLLER, C. H. Podridão-do-estipe da Pupunheira. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Editora Rural, 2001. p. 609- 628.

BERGO, C. L. LUNZ, A. M. P. Cultivo da Pupunha para Palmito no Acre <http://www.cpaFac.embrapa.br/pdf/cirtec31.pdf>, 2000. Acesso em: 20 jun.2009.

BERGO, C. L.; MENDONÇA, H. A.; LEDO, F. J. S. Estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos em progênies de meio-irmãos de Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae) na Amazônia ocidental. Revista de Ciências Agrárias, Acre, n.31, jan/jun 1999.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1. cap.36. p.717-728, 1995.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Brasília: EMBRAPA. p. 1-5, 1991.

BHARAT, R.; SINGH, V. N.; SINGH, D. B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. Plant and Soil, v. 57, 1980. p. 131-135.

BOMFIM, M. P. Antagonismo in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. A *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. 2007. 74p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2007.

BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y. Podridão do colo da macieira (*Phytophthora* spp.). In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, dos A.F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, L.J. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Editora Rural, 2001.p.381-412.

BOVI, M. L. A. O agronegócio palmito de pupunha. O Agrônomo, Campinas, 52 (1), 2001.

BOVI, M. L. A. Palmito Pupunha: Informações Básicas para Cultivo. Boletim Técnico 173, Campinas, Instituto Agrônomo, 50p. 1998.

BRASIER, C. M. e GRIFFIN, M. J. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. Transaction of the British Mycological Society, v. 72, p. 11-43, 1979.

BRITES, M. C. R. S., Histopatologia de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Phytophthora capsici* e *P. palmivora*. 1991. 54p. Tese (Mestrado fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 1991.

BUTLER, E. J. An account of the genus *Pythium* and some *Chytridiaceae*. Botanica Series. Índia, v. 1, p. 82-84, 1907.

CARABI-ADELL et al. Uma técnica simples para observação microscópica de *Trichoderma* spp. (Hypocreales) em cultura de lâminas. In: REUNIÃO ATUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 15. Arquivos do Instituto Biológico, v. 70, p. 35-37, 2003. Suplemento.

CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. S.; FURTADO, D. C. M.; SILVA, I. O.; SILVA, K. M. M.; AMORIM, E. P. R. *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão de raiz e frutos de mamoeiro no estado de Alagoas. Revista Brasileira de Fruticultura., Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 134-135, Abril 2006.

CARVALHO, J. E. U. de.; MULLER, C. H. Níveis de tolerância e letal de umidade em sementes de pupunheira, *Bactris gasipaes*. Revista Brasileira de Fruticultura, Belém, v.20, n.3, p. 283-389, 1998.

CHEE, K. H. Phenotypic differences among single-oospore cultures of *Phytophthora palmivora* and *P. botryosa* from *Hevea brasiliensis*. Mycopathologia et mycologia applicata, London, v. 50, p. 275-292, 1973.

CLAYDON N, ALLAN M, HANSON JR, AVENT AG, Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Transactionsof the British Mycological Society v. 88, 503–13. 1987.

CLEMENT, C. R. e BOVI, M. L. A. Melhoramento genético da pupunheira: conhecimentos atuais e necessidades In: I Seminário do Agronegócio de Palmito de Pupunha na Amazônia. Porto Velho: Embrapa Rondônia, SEBRAE-Rondônia & Cooperama, 1999.

CLEMENT, C. R. Pupunha: Recursos genéticos para a produção de palmito. Horticultura Brasileira, v.15; p. 186-191, 1997. Suplemento.

CLEMENT, C. R. Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae) Série Frutas Nativas, Jaboticabal: Funep, 48p, 2000.

CHAIMSOHN, P. F. Cultivo da Pupunha e Produção de Palmito. Aprenda Fácil, Viçosa, 121p., 2000.

CORABI-ADELL, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica.2004. 220p. Tese. Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2004.

CORRÊA, E. B.; MORETTO, K. C. K.; GOES, A. de . Estudo da potencialidade de isolados de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico de *Phytophthora nicotianae* VAR. *parasitica*. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 25., 2002, São Paulo. Resumo 070. São Paulo: 2002. p. 112.

DIANESE, A. C. de Variabilidade e Controle de *Phytophthora palmivora* (podridão-do-pé) e Controle da Variola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*). 2006. 109p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) UNB, Brasília, 2006.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods. 2 edição. London: Lewis Publishers,1994. 434p.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. *Phytophthora* Diseases Worldwide, The American Phytipathological Society, St. Paul, p. 408-422, 1996.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. Critical Reviews in Microbiology, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998.

ETHUR L. Z. Dinâmica Populacional e Ação de *Trichoderma* no Controle de Fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro. 2006. 154p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2006.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; DA SILVA, A. C. F. Selection of *Trichoderma* spp. seeking the control of *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro* Ciência Rural, Santa Maria, v. 31, n.5, 2001.

FERREIRA, S. A. N.; SANTOS L. A Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.). Acta Amazonica, v.22, n.3, p.303-307, 1992.

FERREIRA, A. L.; DÓREA, J. R. R.; OLIVEIRA, L. S.; BARREIROS, D. C.; CARVALHO, D. B.; SILVA, M. M.; AZEVÊDO, J. A. G.; PEREIRA, L. G. R. Composição Bromatológica e Cinética de Fermentação Ruminal da Entrecasca do Palmito e Fruto da Pupunha Ciências Agrárias, Ilhéus, v. 39., 2005 Anais do 11º Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Santa Cruz.

FILHO, A. N. K; STURION, J. A. Componentes da variância e herdabilidade do peso das sementes de Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunt). Boletim de pesquisa, v.l. Colombo, n. 46, pg 85-90. 2003.

GOMES, F. P. Exigências nutricionais da Pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) em solos representativos do sudoeste da Bahia. 1996. Dissertação (Mestrado em Biologia Botânica). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1996.

GUERREIRO, L. F. Palmito de Pupunha. Desenbahia: Agência de Fomento do Estado da Bahia, Bahia, 2002.

HANADA, R. E. Controle de *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão-parda dos frutos de cacaueteiro com fungos endofíticos. 2006. 114p. Tese (Doutorado em Ciências agrárias). Universidade Federal Amazonas, Manaus, 2006.

HARMAN, G. E. Development tactics for biocontrol fungi in plant pathology. In: BAKER, R. R.; DUNN, P. E. New directions in biological control. New York: Willey - Liss, 1990 p. 779-792.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol – Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, v. 84, p. 377-392, 2000.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews, v. 2, p. 43-56, 2004.

HERMOSA, M. R., GRONDONA, I., ITURRIAGA, E. A., DIAZ-MINGUEZ, J. M., CASTRO, C., MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Applied Environmental Microbiology, v. 66 p.1890-1898, 2000.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, v. 87, p. 4-10, 2003.

HWANG, B. K.; KIM, W. P.; KIM, W. K. Ultrastructure at the root-parasite interface of *Phytophthora capsici* in roots and stems of *Capsicum annuum*. Journal of Phytopathology, v. 127, p.305-315. 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro: IBGE, v. 34, p.69. 2007.

INBAR, J., MENENDEZ, A. e CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 28, n.6, p. 757-763. 1996.

JOHR, JAHNS. Estadísticas del mercado interno de Brasil, In Palmito de Pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth): Su cultivo e industrialización. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1999.p.220-222.

KANNWISCHER , M. E.; MITCHELL, D. J. The influence of a fungicide on the; epidemiology of black shank of tobacco. *Phytopathology*, v. 68, p. 1760–1765, 1978.

KENNEDY, A. C. The rhizosphere and spermosphere. In: SYLVIA, D. M. et al. Principles and Applications of Soil Microbiology, v. 38, p. 389-407, 1998.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* - interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil*, v. 144, p. 267-272, 1992.

KO, W. H. Phytophthora fruit rot and root rot In: Ploetz, R.C. et al. Compendium of tropical fruit diseases. American Phytopathological Society, 1994. p. 61-62.

KULCHETSCKI, L.; CHAIMSOHN, F. P.; GARDINGO, J. R. Palmito pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth): a espécie, cultura, manejo agronômico, usos e processamento. Ponta Grossa: Ed. da UEPG, 2001.148 p.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ed. Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. cap. 8. p.263-284

LOUZADA, G. A. S. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp.originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotrop*, v 9, n.3 p. 145-149. 2009.

LUMSDEN, R. D.; LOCKE, J. C. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. *Phytopathology*, v. 79, p. 361-366, 1989.

LUZ, E. D. M. N. e CAMPELO, A. M. F. L. Dinâmica populacional de três espécies de *Phytophthora* na região cacauceira da Bahia. *Fitopatologia Brasileira*, v.10, p. 1-8, 1985.

LUZ, E. D. M. N. The roles of five species of *Phytophthora* in infection and disease of roots, stems, and pods of *Theobroma cacao* L.1989 (Ph.D. Thesis). Gainesville, University of Florida, 1989.

LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: Fungo protista ou Chromista? In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Ed.), *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas: [s.n], 2001. p.1-22.

LUZ, E. D. M. N.; MITCHELL, D. J. Influence of soil flooding on cacao root infection by *Phytophthora* spp. *Agrotropica*, Ilhéus, n.6, v.2, p.53-60, 1994.

LUZ, E. D. M. N. & SILVA, S. D. V. M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauceiro. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Ed.), *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas: [s.n], 2001. p.175-265.

LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; BEZERRA, J. L.; SOUZA, T. S.; SANTOS, A. F. (Eds), *Glossário ilustrado de Phytophthora: Técnica especiais para o estudo de oomicetos*. Itabuna: FAPESB, Centro de Pesquisa do Cacau. 2008. p. 126.

LUZ, W. C. Ecologia da esferosfera. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. (Eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente: 1998. p. 167-185.

MAGALHÃES, D. M. A. Diversidade de Fungos na Serrapilheira e de *Phytophthora* na Rizosfera de Plantas na Mata Atlântica no Sul da Bahia. 2009. 153p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2009.

MATSUOKA, K. Resistência de *Capsicum annum* L. à *Phytophthora capsici* Leonian: um estudo ultraestrutural da interação.1988. 112p. Tese (Doutorado em fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

MARIANO, R. de L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.1, 369-409, 1993.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 135-156.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. Eds. Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MENEZES, M.; SOUZA, E. E. B. Avaliação de isolados de *Trichoderma* através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. Fitopatologia Brasileira, n. 20,, agosto 1995. Suplemento.

MICHEREFF, S. J., Fundamentos de Fitopatologia. Unidade 17. Controle Biológico de Doenças de Plantas. Recife [s.n] 2001. 123p.

MORSBACH, N., RODRIGUES A. S., CHAIMSOHN, F. P., TREITNY, M. R. Pupunha para Palmito: Cultivo no Paraná. Londrina: IAPAR.1998. 56p.

MORA-URPI, J e SOLIS, E. Polinización en *Bactris gasipaes* H.B.K. Revista Biología. Tropical. v.28(1) , Rome.p. 153-174, 1980.

MORA-URPI, J.; WEBER, J. C.; CLEMENT, C. R. Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute , 1997. v.20, 83p.

MORA-URPI, J., Origen y Domesticación. In Palmito de Pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth): Su cultivo e industrialización. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1999. p.17-24.

MOORE-LANDECKER, E. Fundamentals of the fungi, Prentice-Hall, New Jersey: [s.n] 1996. p 1 -574.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. 01. ed. Itabuna: CEPLAC\CEPEC, 2005. v. 01. 132 p.

- PAIM, M. C. A. Diversidade Genética, Taxonomia e Patogenicidade de *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora*. 2005. 98p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual Santa Cruz, Ilhéus, 2005.
- PARADA, M. G. C. S, Agronegócio Palmito de Pupunha no Estado da Bahia. 2005. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/pdf>. Acesso em 20 de jun. 2009.
- PINTO, Z. V.; PATRÍCIO, F. R. A.; SANTOS, A. S.; MENTEN, J. O. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle biológico da queima da saia em alface. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 25., 2002, São Paulo. Resumo 071. Jaboticabal: [s.n]. 2002. p. 112.
- PIZZINATTO, M. A., BOVI, M. L. A., FEICHTENBERG, E. e SPIERING, S.H. Ocorrência da podridão do estipe em pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no estado de São Paulo. Summa Phytopathologica, São Paulo, v.28, 363-365, 2002
- PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology, v. 21, p.400-407, 2003.
- RAMIREZ, B. N.; MITCHELL, D. J. Relationship of density of clamydospores and zoospores of *Phytophthora palmivora* in soil to infection of papaya. Phytopathology. v.65, p. 780-785, 1975.
- REZENDE, J. A. M.; MARTINS, M. C. Doenças do Mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p. 435-443.
- ROCHA, A. O. J. da; COSTA, A. M. da. Potencialidade regionais estudo de viabilidade econômica palmito de pupunheira Sumário executivo SUFRAMA, 2003.
- ROIGER, D. J.; JEFFERS, S. N. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of *Phytophthora* crown rot and root rot of apple seedlings. Phytopathology, St Paul, v. 81, n. 8, p. 910-917, 1991.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma ovalisporum*: a new endophytic species with potential to control frosty pod rot of cocoa. Mycological Progress. 2004.

SANTOS, F. A.; LUZ, E. D. M. N.; FINATO, P. D.; TESSMANN, D. J.; & VIDA, J. B. Primeiro relato da podridão-do-estipe da Pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*. Paraná, v. 29, n. (6), nov/ - dez. 2004.

SANTOS, F. A.; LUZ, E. D. M. N. Doenças causadas por *Phytophthora palmivora* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, ago, 2007. Suplemento.

SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; MAFFIA, L. A. Importância da estrutura da superfície foliar na interação *Phytophthora capsici* - *Hevea brasiliensis* Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 39, p.67-80, 1999.

SANTOS, A. F dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B.; NUNES, W. M. C. As doenças da Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): Antracnose e Podridão da Medula. Comunicado Técnico 63, 2001.

SANTOS, R. T. Parâmetros de Inoculação em Plântulas e Reação de Genótipos de Mamoeiro a *Phytophthora palmivora*. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2009.

SILVA, P. R. Q. da Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida Benomil. 2000. 130 p.Tese. (Doutorado), UnB, Brasília, 2000.

SILVA, da G. S. Podridão das raízes e dos frutos do mamoeiro. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, dos A. F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, L. J. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Editora Rural, 2001. p.413-432.

SIVIERO, A.; SANTOS, F. A. FURTADO, E. L. & MACHADO, M. A. Avaliação in vitro de porta-enxerto de citros a gomose causada por *Phytophthora parasitica*. *Fitopatologia brasileira*, Fortaleza, v.26, p.395, 2001.

TAVARES, M. G. Podridão do pé do mamoeiro: Infestação em solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e *Trichoderma* e Avaliação dos mecanismos de Defesa envolvidos. 2009. 121 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

TABET, J. C.; LICHTENSTEIN, E. P. Degradation of [14C] photodieldrin by *Trichoderma viride* as affected by other insecticides. **Can J. Microbiol.** Sep;22, v.9 p. 1345–1356, 1976.

TOCAFUNDO, F. Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Phytophthora palmivora* em mamoeiro. 2008. 54p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2008.

TONET, R. M.; FERREIRA, L. G. S.; OTOBONI, J. L. M. Levantamento e situação da Pupunha no estado de São Paulo. Campinas, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, Documento Técnico 111. 11p. 1999.

TRUJILLO, E. E.; HINE, R. B. The role of papaya residues in papaya root rot caused by *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology*, Massachusetts, v.55, 1965.p.1293-1298.

VARJÃO L. B.; LUZ E. D. M. N.; SANTOS, T. R.; SILVA C. L., PIMENTA NETO A. A Patogenicidade de isolados de *Phytophthora palmivora* a pupunheira. In: Congresso de Brasileiro de Fitopatologia, 2008, Belo Horizonte. Resumo.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; MORAES, C. W. S. de; MACHADO, C. A.; KAJISHIMA S.; COSTA, E. Q. Análise descritiva quantitativa do palmito de pupunheira. *Acta Amazonica*, v. 37, n. 4, 2007.

VILACHICA, H. Pijuayo (*Bactris gasipaes* HBK). In: Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperacion Amazonica, 1996. p.216-226.

VIRGENS FILHO, A. Cadeia Produtiva do Palmito –. Projeto Expropalm Brasil S. A. Apostila. Ituberá: [s.n] 2002.

WATERHOUSE, G. M. NEWHOOK, F. J. & STAMPS, D. J. Present criteria for classification of *Phytophthora* In: ERWIN, D. C., BARTNIC-GARCIA, S. e TSAO P. H. (EDs.) *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology. St Paul Minnesota: American Phytopathological Society, 1983. p. 139-147.

YUIYAMA, K., CHAVES-FLORES, W. B. Comportamento de progênies de meio-irmãos de pupunheira (*Bactris gasipaes*, Kunth). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.18, n.1, p.93-98, 1996.

ZENTMYER, G. A., KAOSIRI, T. e IDOSU, G. Taxonomic variants in the *Phytophthora palmivora* complex. Trans. Br. Mycol. Soc. v.69: 329-332, 1977.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)