

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

Aline Brito Vaz¹, Marival Lopes Oliveira², Maria das Graças Parada², Edna Dora Martins N. Luz²

¹Rua Nathalina Daher Carneiro, 874, apt. 202, Jardim da Penha, Vitória-ES, alinefito@gmail.com; ²CEPLAC/CEPEC/SEFIT, km 22 Rodovia Ilhéus-Itabuna, Cx. Postal 07, 45600-970, Itabuna, BA, Brasil. marival@ceplac.gov.br; gracaparada@ceplac.gov.br; ednadora@yahoo.com.br.

Visando avaliar métodos de inoculação, concentrações de inóculo e testar a necessidade ou não de ferimentos, para utilização em estudos de resistência à podridão do estipe da pupunheira, foram instalados experimentos em blocos casualizados com 10 plântulas por tratamento e cinco repetições para cada método e concentração de inóculo, utilizando um isolado de *Phytophthora palmivora* de pupunheira oriundo de Una, BA. No primeiro experimento foram testados quatro métodos sem ferimento. No segundo os métodos foram testados com e sem ferimentos. Mediu-se a altura da planta, o comprimento do sistema radicular e as massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular aos 75 dias após a inoculação. Nas análises foram utilizadas a regressão polinomial, com as médias comparadas pelos testes de Tukey e Scott-Knott a 5%. No primeiro experimento pelos métodos avaliados foram observadas alterações fisiológicas nas plântulas, independente das concentrações de inóculo utilizadas; no entanto, o método de imersão foi o mais drástico. No segundo experimento aproximadamente 50% das plântulas inoculadas, principalmente com ferimentos, evidenciaram sintomas da doença e/ou morreram. Ferimentos não foram essenciais, mas foram importantes na aceleração do processo de infecção em plântulas de pupunheira inoculadas com *P. palmivora*. 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⁻¹.

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

Evaluation of methods for inoculation of *Phytophthora palmivora* in pejibaye palm seedlings. The aim of this paper was to evaluate inoculation methods, inoculum concentrations and the wounding necessity in inoculations to evaluate resistance to pejibaye foot rot. The experiments were set in randomized block designs with 10 plants per treatment and five replications for each method and inoculum concentration using the isolate 870 of *Phytophthora palmivora* obtained from pejibaye from Una, Bahia, Brazil. In the first experiment four methods were evaluated without wounding. In the second experiment inoculations were done with and without wounding. The inoculum concentrations used were: zero; 5×10^5 e 1×10^6 zoospores/mL. The experiments were repeated once. Seventy five days after inoculations the height of the canopy, the length of the root system and the weight of aerial part and root system of the plants, were assessed. A polynomial regression analysis was used to determine the best concentration for each method per each pathometric variable evaluated. The means average were compared by the Tukey test and Scott-Knott test both at $P \leq 0.05$. In the first experiment, physiological alterations have been observed in the inoculated plants for all the evaluated methods and inoculum concentrations. The root deeping method was the most drastic one. In the second experiment about 50% of inoculated plants, mainly the wounded ones, showed disease symptoms or died. Wounding seemed to accelerate infection process in pejibaye seedlings inoculated with *P. palmivora*, independently of the inoculum concentration. To evaluate resistance in the *P. palmivora* x pejibaye pathosystem, the method of irrigation of the substrate around the collar, with 1 mL of the inoculum at 5×10^5 zoospore/mL is the recommended one.

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

Introdução

O cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) para produção de palmito vem despertando o interesse de agricultores de todo o país desde 1970 (Benchimol et al., 2001). 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).

De acordo com os dados a partir da década de 1990 o extrativismo vegetal das palmeiras juçara (*Euterpe edulis* Mart.) e açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) no Brasil tem diminuído, progressivamente, enquanto, o cultivo da pupunheira tem aumentado de forma consistente. Apesar disso, alguns fatores têm limitando o crescimento da produção e exportação de palmito pelo país, destacando-se entre eles a doença conhecida como podridão do estipe, causada por *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. O patógeno possui ampla gama de hospedeiros com ocorrência em diversas regiões brasileiras (Bovi, 2001).

Os sintomas da podridão do estipe são caracterizados, inicialmente, pela clorose e seca das folhas, evoluindo para a seca e morte da planta. Apesar do processo de patogênese ser pouco estudado, sabe-se que a produção de enzimas, que maceram e degradam a parede celular do hospedeiro, desempenha importante papel na colonização dos tecidos pelo patógeno (Benchimol et al., 2001).

No estado do Pará, a incidência da doença, que é um problema endêmico em toda a região amazônica, se agravou devido à pressão de seleção em decorrência do plantio de cultivares do tipo sem espinho, os quais apresentam menor resistência (Santos et al., 2004). Com a expansão da cultura, foi observada maior disseminação da doença para outras regiões do país, com destaque, principalmente, para os estados do Paraná e Bahia (Santos et al., 2004). Na Bahia, as maiores ocorrências e perdas são registradas, principalmente, em viveiros, apesar da doença não deixar de ser também observada em campo (Santos e Luz, 2007).

A despeito da sua importância econômica crescente, a doença ainda é pouco estudada. Neste sentido, mesmo em relação à metodologia de inoculação de *P. palmivora* em pupunheira, que é um conhecimento básico importante para a realização de outros estudos, a literatura é carente, tendo sido

encontrado apenas um trabalho (Varjão et al., 2008), onde foi utilizado o método de encharcamento do substrato com água, por 1 hora, seguido da irrigação das plântulas, em torno do coleto, com uma suspensão de 5×10^5 zoósporos mL⁻¹. Além disso, informações sobre concentrações de inóculo adequadas para a inoculação do patógeno, também não estão disponíveis. Apesar disso, *P. palmivora* vem sendo estudada com alguma frequência em outros hospedeiros, como é o caso do mamoeiro, onde diversos métodos de inoculação (Trujillo & Hine, 1965; Silva, 2001; Dianese et al., 2007; Santos e Luz, 2011), e concentrações de inóculo já foram avaliados, resultando inclusive na recomendação das concentrações 5×10^4 e 10^5 zoósporos mL⁻¹ na avaliação de materiais genéticos quanto à resistência ao patógeno (Santos e Luz, 2011).

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

O presente trabalho teve como objetivos avaliar métodos, e concentrações de inóculo, bem como a necessidade ou não de ferimentos para inocular *P. palmivora* em pupunheira, visando definir uma metodologia apropriada para a avaliação e seleção de materiais genéticos com resistência ao patógeno.

Material e Métodos

Preparo do inóculo: O isolado 870 de *P. palmivora*, obtido de pupunheira no sul da Bahia e pertencente à coleção Arnaldo Medeiros do CEPEC/CEPLAC, foi selecionado para ser utilizado nos ensaios. Para a produção de inóculo, o patógeno foi cultivado em meio de cenoura ágar (CA) em temperatura de 25°C, sob luz contínua, durante oito dias. Após este período, 8 mL de água destilada, esterilizada e gelada foram adicionados a cada placa, transferindo-as para um refrigerador à 4°C, por 20 minutos, com o objetivo de induzir a liberação de zoósporos. As placas, a seguir, retornaram à temperatura ambiente, permanecendo aí por 25 minutos. As suspensões obtidas em cada placa foram misturadas, a concentração de zoósporos aferida em hemacitômetro e ajustada para 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos mL⁻¹.

Preparo do Material Vegetal: Plântulas de pupunheira, com quatro meses de idade, cultivadas em tubetes contendo 500g da mistura solo/substrato (1:1) foram utilizadas nos experimentos, sendo mantidas em casa de vegetação, sem controle ambiental, com as temperaturas médias diurnas em torno de 27°C e noturnas de 25°C.

No Experimento 1: Inoculações sem ferimentos: Os métodos de inoculação utilizados nas avaliações das concentrações de inóculo: zero (testemunha), 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 zoósporos mL⁻¹, foram os seguintes:

Método 1 (M1) - Imersão do sistema radicular em uma suspensão de zoósporos: Nas inoculações por este método, cada plântula foi removida dos tubetes, lavada em água corrente passando a mão nas raízes gentilmente para retirar o excesso de solo, e o sistema radicular imerso, por 20 minutos, em 500 mL das diferentes concentrações de zoósporos, a depender do tratamento. As plântulas foram em seguida replantadas cuidadosamente nos tubetes contendo solo/substrato (1:1).

Método 2 (M2) - Irrigação do solo com 1 mL da suspensão de inóculo: Cada plântula foi irrigada com 1 mL da suspensão de zoósporos, depositado em torno do coleto, nas quatro diferentes concentrações de inóculo.

Método 3 (M3) - Inundação do solo com água e irrigação com 1 mL da suspensão de inóculo: As plântulas de pupunheira foram imersos em água até o nível do solo, durante uma hora, e em seguida irrigadas, em torno do coleto, com 1 mL da suspensão de zoósporos nas quatro diferentes concentrações. Após a aplicação do inóculo, as plantas permaneceram imersas em água por mais uma hora.

Método 4 (M4) - Irrigação do solo com 30 mL de água e em seguida com 2 mL da suspensão de inóculo: As plantas foram inicialmente irrigadas com 30 mL de água e em seguida aplicados em torno do coleto 2 mL de cada uma das suspensões nas quatro diferentes concentrações de zoósporos.

As plântulas inoculadas por todos os métodos e concentrações de inóculo foram mantidas em casa de vegetação, sem controle ambiental, com temperaturas médias diurnas em torno de 27°C e

noturnas de 25°C, submetidas a 1 hora de irrigação por aspersão duas vezes ao dia (manhã/ tarde).

No Experimento 2: Inoculações com e sem ferimentos: Nas inoculações com ferimentos foram efetuadas pequenas incisões de 1 mm de espessura 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 filme de PVC, sobre os locais de inoculação. Os seguintes métodos de inoculação foram utilizados (Quadro 1):

Quadro 1- Experimento 2: Métodos de inoculação utilizados

Tratamentos	Método de inoculação	Com ferimento	Sem ferimento
1 e 2	Inoculação com gotas de uma suspensão de 5×10^5 zoósporos mL ⁻¹	X	X
3 e 4	Inoculação com gotas de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos mL ⁻¹	X	X
5 e 6	Testemunha – sem a aplicação da suspensão de zoósporos,	X	X
7 e 8	Irrigação do solo, em torno do coleto, com 1 mL de uma suspensão de 5×10^5 zoósporos mL ⁻¹	X	X
9 e 10	Irrigação do solo, em torno do coleto, com 1 mL de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos mL ⁻¹ ,	X	X
11 e 12	Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo	X	X
13 e 14	Irrigação do solo, em torno do coleto, com 2 mL de uma suspensão de 5×10^5 zoósporos mL ⁻¹	X	X
15 e 16	Irrigação do solo, em torno do coleto, com 2 mL de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos mL ⁻¹	X	X
17 e 18	Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo,	X	X
19 e 20	Irrigação do solo, em torno do coleto, com 5 mL de uma suspensão de 5×10^5 zoósporos mL ⁻¹	X	X
21 e 22	Irrigação do solo, em torno do coleto, com 5 mL de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos mL ⁻¹	X	X
23 e 24	Irrigação do solo, em torno do coleto, com 2 mL de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos mL ⁻¹	X	X
25 e 26	Testemunha – sem aplicação da suspensão de inóculo	X	X
27 e 28	Inoculação com um disco de micélio de 0,7 cm	X	X

O delineamento experimental dos experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso com cinco repetições de 10 plântulas/tratamentos sendo repetidos uma vez cada um. No experimento 1 foram avaliados 16 tratamentos (quatro métodos de inoculação e quatro concentrações de zoósporos) e no experimento 2, 28 tratamentos.

As avaliações foram efetuadas aos 75 dias após as inoculações, considerando-se as seguintes variáveis: i) altura da planta; ii) massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular; e iii) Comprimento do sistema radicular. Após as avaliações, foi procedido o isolamento do patógeno das plântulas inoculadas, em meio seletivo PARPH (Santos e Luz, 2007), sendo as placas incubadas, no escuro, por 72 horas para a confirmação dos resultados. As raízes foram lavadas em água, desinfetadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, cortadas em pequenas secções que foram inseridas em placas de Petri contendo o meio seletivo PARPH (Kannwischer & Mitchell, 1978) e estas então incubadas em uma BOD a 25 °C, no escuro, por 72 horas.

Na análise de variância (experimento 1) para a determinação das melhores concentrações em cada método e por variável patométrica, foi utilizada a análise de regressão polinomial. Quando os valores de R^2 para os modelos linear e quadrático foram significativos, optou-se pela utilização daquele que apresentasse maior valor absoluto. A análise ANOVA foi utilizada na comparação dos métodos de inoculação e concentrações de zoósporos, para os casos em que a expressão das variáveis patométricas era mais forte. A significância das diferenças entre os tratamentos foi determinada pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa SAS (SAS Institute, 1987, user's guide: statistic. 5. ed. Cary, NC, 956).

Para o experimento 2 foi realizada a ANOVA e o teste de agrupamentos de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), através do software R, versão 9.0.

Resultados e Discussão

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 mostraram amarelecimento da folha bandeira.

Em cacaueteiro, a inoculação de *P. palmivora* é avaliada após 60 dias, entretanto, em pupunheira, em função do reduzido número de plantas com sintomas da doença na folha bandeira, decidiu-se então pelo aumento no período de avaliação (Luz e Mitchaell, 1994). Em mamoeiro, observou que avaliações realizadas aos 30 dias após a inoculação, já permitiam conhecer todas as reações dos acessos de germoplasma quanto à ação da podridão das raízes causada por *P. palmivora*, uma vez que a maior parte das plantas havia morrido após este período (Santos e Luz, 2011). Em citros, por sua vez, o período de 15-30 dias foi adotado como tempo máximo de avaliação nos métodos de inoculação de plântulas com *Phytophthora nicotianae* (Siviero et al., 2001).

Aproximadamente 50% das plântulas inoculadas pelos diferentes métodos evidenciaram sintomas típicos da doença. Em função das informações disponíveis sobre metodologia de inoculação no patossistema *Phytophthora palmivora* x *B. gasipaes* serem escassas, houve a necessidade de se testar métodos, concentrações de inóculo e suas interações, para serem utilizadas em futuras avaliações e seleções de materiais genéticos para resistência à podridão do estipe da pupunheira. Também 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.

Durante os trabalhos foram testados quatro métodos e quatro concentrações de zoósporos de *P. palmivora* na inoculação das plântulas, com o objetivo de selecionar as melhores combinações método x concentração de inóculo para serem utilizadas em ensaios de seleção de genótipos resistentes à podridão do estipe da pupunheira.

Na definição dos métodos e concentrações de inóculo mais eficientes na inoculação das plântulas, foi utilizada a análise de regressão linear (Tabela 1). Os valores de R^2 que melhor definiam as equações de regressão foram, predominantemente, do modelo quadrático, sendo observadas diferenças em relação

Tabela 1. Valores de R² utilizados na definição do modelo linear ou quadrático da relação método de inoculação/concentrações de inóculo, e as variáveis patométricas utilizadas

VP	M1	M2	M3	M4
H	0,9897	0,6177*	0,9995*	0,8912
MFP	0,7139*	0,7095*	0,8608*	0,8921*
MSP	0,6917	0,9165	0,7537	0,8821*
CSR	0,6683	0,8562	0,7703	0,8501
MFSR	0,1744*	0,8034*	0,8111*	0,62113*
MSSR	0,8217*	0,6055*	0,4728*	0,9230*

* R² para modelo quadrático. VP: variáveis patométricas H: Altura da planta; MFP: Massa fresca da Parte aérea; MSP: Massa seca da parte aérea CSR: Comprimento do sistema radicular; MFSR: Massa fresca do sistema radicular MSSR: Massa seca do sistema radicular M1: Imersão do sistema radicular; M2: Irrigação com 1 mL de inóculo; M3: Inundação do solo e M4: Irrigação com 30 mL água + 2 mL inóculo.

às concentrações para cada método avaliado. Nas análises das interações entre métodos de inoculação x concentração de inóculo, realizados neste trabalho, os modelos de regressão quadrática predominaram e explicaram melhor 13 interações, enquanto os lineares, 11 (Tabela 1). Variações no comportamento de plântulas inoculadas por um mesmo método foram observadas quando utilizadas diferentes concentrações de inóculo. Em algumas situações, uma concentração menor foi capaz de induzir maior redução em uma variável do que na concentração mais elevada.

Os resultados dos ensaios mostraram o destaque do método de imersão do sistema radicular nas diferentes concentrações de inóculo, em relação aos demais, sendo observada redução nos valores das seis variáveis avaliadas, não obstante terem ocorrido variações nas diferentes concentrações testadas. Tais resultados já eram de se esperar, considerando-se que este é dos métodos mais drásticos, já que envolve a remoção das plantas do solo e a exposição do sistema radicular aos efeitos do meio ambiente e do patógeno. De forma geral, os métodos mostraram um comportamento similar para todas variáveis patométricas avaliadas, ficando claro, não ser essencial o encharcamento prévio do solo para facilitar a penetração do patógeno. Resultados semelhantes foram obtidos por (Kannwischer & Mitchell, 1978) ao compararem os efeitos do encharcamento do solo durante o processo de inoculação de plântulas de cacau com suspensões de zoósporos de *Phytophthora* spp.

Com base na análise fenotípica, foram feitas seleções das concentrações que mais se destacaram tanto para o método de inoculação quanto para a variável patométrica. Quando as plântulas foram inoculadas pelos métodos de imersão e inundação, a concentração 1 x 10⁵ zoósporos mL⁻¹ foi ideal para a expressão da maioria das variáveis patométricas, a exceção da massa fresca da parte aérea, pelo método de imersão, e da massa fresca do sistema radicular, pelo método de inundação. Para ambas variáveis, a concentração 5 x 10⁵ zoósporos mL⁻¹ foi a que apresentou maior destaque. Em relação aos métodos de irrigação do inóculo, com ou sem a irrigação prévia de água, a concentração de 5 x 10⁵ zoósporos mL⁻¹ foi a que apresentou melhores resultados (Tabela 2).

Os menores valores para todas as variáveis analisadas foram obtidos com o método de imersão das raízes nas suspensões de 10⁵ zoósporos mL⁻¹ (Tabelas 3 e 4). Entretanto, para as variáveis relacionadas à parte aérea, as médias obtidas por este método, não diferiram estatisticamente, daquelas do método de irrigação com 1 mL de 10⁵ zoósporos mL⁻¹, assim como para as variáveis altura e massa fresca, em relação ao método de irrigação com 30 mL de água e 2 mL do inóculo (Tabela 3). Os resultados do segundo ensaio confirmaram mais uma vez os obtidos em relação aos métodos de inoculação e concentrações de inóculo já descritos.

Conforme constatado nas comparações dos métodos de inoculação, apenas para as concentrações de inóculo onde ficaram evidentes os efeitos das

Tabela 2. Concentrações de inóculo em função do método de inoculação e da variável patométrica

VP	M1	M2	M3	M4
H	5 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵
M FP	5 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵
MSP	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵
CSR	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵
MFSR	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵
MSSR	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵

VP: variáveis patométricas H: Altura da planta; MFP: Massa fresca da Parte aérea; MSP: Massa seca da parte aérea CSR: Comprimento do sistema radicular; MFSR: Massa fresca do sistema radicular MSSR: Massa seca do sistema radicular M1: Imersão do sistema radicular; M2: Irrigação com 1 mL de inóculo; M3: Inundação do solo e M4: Irrigação com 30 mL água + 2 mL inóculo.

Tabela 3. Médias de altura, massa fresca e massa seca da parte aérea de plântulas de pupunheira aos 75 dias após a inoculação com *Phytophthora palmivora*, através de 4 métodos de inoculação nas concentrações que apresentaram efeitos mais drásticos

Métodos	Variáveis relacionadas à parte aérea		
	Altura(cm)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
M1	29.6 b	4.5 c	1.4 b
M2	31.4 ab	5.3 bc	1.7 ab
M3	35.8 a	7.9 a	2.1 a
M4	32.5 ab	6.3 b	1.8 ab
	CV = 25.99	CV= 52.35	CV= 49.78

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (pd^{0,05}). M1: Imersão das raízes no inóculo (1×10^5 zoósporo mL⁻¹); M2: Irrigação 1 mL do inóculo (1×10^5 zoósporo mL⁻¹); M3: Inundação + irrigação 1 mL do inóculo (1×10^5 zoósporo mL⁻¹) e M4: Irrigação 30 mL água + 1 mL do inóculo (1×10^5 zoósporo mL⁻¹).

Tabela 4. Médias de altura, massa fresca e massa seca da parte aérea de plântulas de pupunheira aos 75 dias após a inoculação com *Phytophthora palmivora*, através de 4 métodos de inoculação

Métodos	Variáveis sistema radicular		
	Comprimento	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
M1	13.5 b	3.1 b	1.2 b
M2	17.0 a	5.5 a	1.9 a
M3	16.9 a	7.1 a	2.2 a
M4	16.9 a	5.9 a	2.1 a
	CV = 21.56	CV= 61.83	CV= 53.14

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (pd^{0,05}). M1: Imersão das raízes no inóculo (1×10^5 zoósporo mL⁻¹); M2: Irrigação 1 mL do inóculo (1×10^5 zoósporo mL⁻¹); M3: Inundação + irrigação 1 mL do inó. (1×10^5 zoósporo mL⁻¹) e M4: Irrigação 30 mL água + 1 mL do inóculo (1×10^5 zoósporo mL⁻¹)

condições externas (estresse), foi confirmado o que as análises gráficas haviam evidenciado. O método de imersão na concentração de 10^5 zoósporos mL⁻¹ foi aquele que apresentou as maiores reduções nos valores médios obtidos para todas as variáveis relacionadas aos efeitos da doença sobre o sistema radicular, com os demais métodos não apresentando quaisquer diferenças entre si (Tabela 4).

Aparentemente, a presença de injúrias mecânicas ou causadas por insetos, contribuiu 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 (Parada, 2005).

Baseado nessa visão, os 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 de sintomas, não se distinguiram uns dos outros pelo Teste de Scott-Knott, ficando no grupo C. A concentração de inóculo utilizada, também não influenciou na expressão da doença nas plântulas de pupunheira de acordo com os resultados aqui apresentados, pois os tratamentos com irrigação 1, 2 ou 5 mL das suspensões de zoósporos ficaram no grupo C.

Como era de se esperar, as testemunhas ficaram nos grupos com maiores massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular, 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⁻¹, também ficaram no mesmo grupo, exceto o tratamento T8 que ficou no Grupo A para 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 provocar sintomas externos (Tabela 5).

Caso haja inóculo de *P. palmivora* no solo e condições ambientais adequadas, a infecção poderá ocorrer tanto na presença quanto na ausência de injúrias, não obstante tal presença venha contribuir sobremaneira na aceleração do processo de patogênese (Bovi, 2001).

Durante as tentativas de reisolamento, foram observados sintomas de escurecimento e necrose dos tecidos, especialmente na região do coleto, com o patógeno sendo reisolado de todas as plantas com sintomas. Resultados semelhantes foram obtidos por Santos e Luz (2011), utilizando-se o mesmo método de inoculação durante avaliações de acessos de

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 fermento

Tratamentos	PPA (g)		PSR (g)	
	MF	MS	MF	MS
T 12	16,4 A	3,6 A	7,8 A	1,7 B
T 8	15,9 A	4,1 A	8,7 B	2,4 A
T6	14,8 A	3,6 A	11,4 A	2,7 A
T18	12,7 B	3,1 B	7,8 A	1,6 C
T28	12,3 C	2,9 C	9,9 A	2,6 A
T16	12,0 C	3,0 C	6,2 C	1,6 C
T 20	11,7 C	2,7 C	7,0 B	2,4 A
T2	11,4 C	2,6 C	6,6 C	1,5 C
T 24	11,2 C	2,9 C	6,8 C	1,2 C
T14	11,1 C	2,4 C	6,0 C	1,4 C
T10	10,2 C	2,4 C	4,9 C	1,5 C
T26	9,9 C	2,4 C	5,4 C	1,2 C
T 4	7,5 C	2,0 C	4,1 C	0,9 C
T22	7,0 C	2,3 C	4,3 C	0,8 C

PPA: Peso da parte aérea (g); PSR: Peso do sistema radicular (g) Médias seguidas das mesmas letras, na mesma coluna, ficaram no mesmo grupo segundo o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). T 12 - Testemunha 1 mL; T 8 - Irrig. 1 mL (5×10^5); T6- Testemunha Gota; T18 - Testemunha 2 mL; T28- Testemunha disco; T16- Irrig. 2 mL (1×10^6); T 20- Irrig. 5 mL (5×10^5); T2- Método gota (5×10^5); T 24- Testemunha 5 mL; T14- Irrig. 2 mL (5×10^5); T10- Irrig. 1 mL (1×10^6); T26- Disco de micélio; T 4- Método gota (1×10^6) e T22- Irrig. 5 mL (1×10^6).

germoplasma de mamoeiro em relação à podridão de raízes causada por *P. palmivora*.

No caso específico da pupunheira, que é um hospedeiro com sistema radicular fasciculado e volumoso, o método de imersão, aparentemente, não seria tão prático, uma vez que apresenta uma demanda maior por: 1) Quantidades superiores de inóculo; 2) espaço físico mais amplo e equipe de trabalho mais numerosa para realizar as tarefas, considerando-se o período limitado de viabilidade do inóculo; 3) Tempo e cuidados maiores durante as inoculações que para os demais métodos; e 4) Limitações quanto à inoculação de grandes números de plantas durante ensaios de avaliação de resistência à doença.

Ressalta-se que apesar disso, e por ser um método mais drástico, o seu uso em ensaios de seleção de materiais com resistência à podridão do estipe da pupunheira, não deveria ser descartado, uma vez que através dele, diferenças tênues entre materiais genéticos, poderiam ser detectadas.

Conclusão

Todos os métodos avaliados induziram alterações fisiológicas nas plântulas, independente das concentrações de inóculo utilizadas; no entanto, o método de imersão foi o mais drástico. Também foi observado neste estudo que fermentos não são necessários para ocorrer a penetração de *P. palmivora*, porém aceleram o processo de infecção do patógeno.

Literatura Citada

- BENCHIMOL, R. L., et al. 2001. Podridão-do-estipe da pupunheira. In: Luz, E. D. M. N., et al. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas, SP, Editora Rural. pp. 609-628.
- BOVI, M. L. A. 2003. O agronegócio palmito de pupunha. *Horticultura Brasileira* 21(1):186-193.
- DIANESE, A. C., et al. 2007. Reação de genótipos de mamoeiro à varíola e à podridão-do-pé. *Fitopatologia Brasileira* 32: 418-423.
- KANNWISCHER, M. E.; MITCHELL, D. J. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. *Phytopathology* 68: 1760-1765.
- LUZ, E. D. M. N.; MITCHELL, D. J. 1994. Influence of soil flooding on cacao root infection by *Phytophthora* spp. *Agrotrópica (Brasil)* 6 (2):53-60.
- PARADA, M. G. C. S. 2005. Agronegócio palmito de pupunha no Estado da Bahia. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/pdf>. Acesso em 20 de jun. 2009.
- SANTOS, A. F., et al. 2004. Primeiro relato da podridão-do-estipe da pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 29(6): 680-682.
- SANTOS A. F.; LUZ, E. D. M. N. 2007. Doenças causadas por *Phytophthora palmivora* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 32(Suppl.):S 541-S 543.
- SANTOS, T. R.; LUZ, E. D. M. N. 2011. Avaliação de métodos, concentrações de inóculo e idade das plântulas para inoculação de *Phytophthora palmivora* em mamoeiro. *Tropical Plant Pathology* 36(1): 383-389.

- SILVA, da G. S. 2001. Podridão das raízes e dos frutos do mamoeiro. In: Luz, E. D. M. N., et al. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas, SP, Editora Rural. pp. 413-432.
- SIVIERO, A., et al. 2001. Avaliação in vitro de porta-enxerto de citros a gomose causada por *Phytophthora parasitica*. Fitopatologia Brasileira (Suplemento) 26: 395.
- TRUJILLO, E. E.; HINE, R. B. 1965. The role of papaya residues in papaya root rot caused by *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora parasitica*. Phytopathology 55:1293-1298.
- VARJÃO, L. B., et al. 2008. Patogenicidade de isolados de *Phytophthora palmivora* a pupunheira. Tropical Plant Pathology (Suplemento) 33:S 220.
- VERRUMA-BERNARDI, M. R., et al. 2007. Análise descritiva quantitativa do palmito de pupunheira. Acta Amazônica 37(4):507-512. ●