



Aspectos histopatológicos da interação *Phytophthora palmivora* com a pupunheira

Aline Brito Vaz¹, Edna Dora Martins Newman Luz², Stela Dalva Vieira Midlej Silva² & Marival Lopes Oliveira²

¹Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais – DCAA, Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, 45650-000, Ilhéus, BA, Brasil; ²Seção de Fitopatologia, Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, 45650-000, Ilhéus, BA, Brasil

Autor para correspondência: Aline Brito Vaz, e-mail: alinefito@gmail.com

RESUMO

Visando estudar a interação *Phytophthora palmivora* x pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunt.), foram efetuados cortes histológicos nos locais onde plântulas, com seis meses de idade, foram inoculadas na base do estipe, para serem examinados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os métodos de inoculação utilizados foram: i. Inoculação com gotas (5 µL) de uma suspensão de 1×10^6 zoósporos/mL; 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 6 e 12 horas após a inoculação seguindo-se as etapas de fixação, desidratação e metalização para a preparação do material para MEV. Zoósporos encistados e esporângios aderidos à epiderme das plantas foram observados 6 e 12 horas após a inoculação, com a fase de pré-infecção ocorrendo anteriormente a este período. Independentemente do método de inoculação utilizado foi observada a colonização dos tecidos do hospedeiro em todas as plantas inoculadas.

Palavras-chave: *Bactris gasipaes*, metodologia de inoculação, microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

Histopathology of the interaction *Phytophthora palmivora* and pejibaye palm

Aiming to study the interaction *Phytophthora palmivora* and pejibaye palm (*Bactris gasipaes* Kunt.) with the aid of scanning electron microscope (SEM), sections were made of the stem base of pejibaye plants in the sites where six-month-old pejibaye seedlings were inoculated. The inoculation methods used were: i. inoculation with 5 µL drops of zoospore suspension (1×10^6 zoospores/mL); ii. irrigation around the stem base of seedlings, with 5 mL of a suspension of 1×10^6 zoospores/mL; and iii. inoculation with a 7-mm-diameter disk of mycelium. Tissue sections were made 6 and 12 hours after inoculation, following the conventional process of fixation, dehydration and metallization steps for SEM. Encysted zoospores and sporangia attached to host epidermis were seen 6 and 12 hours after inoculation, with the pre-infection phase occurring before that stage. Independently of the inoculation method employed, host tissue colonization could be observed in all inoculated plants.

Key words: *Bactris gasipaes*, inoculation methods, scanning electron microscopy.

O cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunt.) encontra-se em expansão no Sul da Bahia onde as condições edafoclimáticas são muito favoráveis à cultura (Bovi, 2001). A agroindústria do palmito constitui-se excelente alternativa para a região, desde que seja adotado um manejo adequado ao seu cultivo (Rocha, 2003). O monocultivo e a expansão da área cultivada trouxeram, entretanto, conseqüências para a sua exploração na região à medida que começaram a surgir problemas fitossanitários, entre os quais, a doença conhecida como podridão do estipe, causada por *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler (Santos & Luz, 2007).

Os sintomas da doença são muito drásticos tanto em mudas enviveiradas como em plantas adultas. São caracterizados pela clorose inicial com posterior secamento das folhas e apodrecimento dos tecidos internos da base do estipe, que adquirem a coloração pardo-escura, culminando posteriormente com a morte da planta (Pizzinato et al., 2002).

O patógeno pertencente ao Reino Straminipila, Filo Oomycota, sendo favorecido por temperaturas entre 25 e 30 °C e alta umidade, condições estas favoráveis à ocorrência de epidemias em qualquer dos seus hospedeiros (Erwin & Ribeiro, 1996; Oliveira & Luz, 2005). Os fatores ambientais são, portanto, de importância primordial para que ocorram surtos epidêmicos da doença (Hanada, 2006).

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 heterotálica. 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).

Embora o patógeno afete diversas culturas de relevância econômica como o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), entre outras (Dianese, 2006), não foram encontrados relatos na literatura quanto ao seu processo de patogênese sobre a pupunheira. A elucidação de alguns aspectos deste processo e das alterações tissulares decorrentes da infecção é muito importante. O presente trabalho teve como objetivo estudar alguns aspectos relacionados à patogênese, envolvendo penetração e colonização dos tecidos de plântulas de pupunheira artificialmente inoculadas com *P. palmivora*.

Plântulas, com seis meses de idade, cultivadas em casa-de-vegetação em sacos de polietileno contendo uma mistura solo + PLANTIMAX (1:1), 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, e em seguida as plantas foram inoculadas através dos seguintes métodos: i) Inoculação com gotas (5 μ L) 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 de zoósporos e um disco de meio de cultura, no lugar do disco de micélio.

Seis e 12h após as inoculações foram retirados fragmentos, com bisturi, dos pontos de inoculação, os quais foram colocados em uma placa de vidro onde gotas de gluteraldeído foram adicionadas para que fossem efetuados os cortes histológicos. Amostras constituídas de cinco cortes com, aproximadamente, um milímetro de espessura, foram mantidas por 4 horas em frascos 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 tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, e em seguida mantidas em tampão cacodilato 0,1 M, por 4 horas. As amostras foram lavadas, novamente, por seis vezes, durante 10 minutos, com o mesmo tampão, procedendo-se então a desidratação sequencial em uma série alcoólica a 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 em seguida 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. Posteriormente foram submetidas ao processo de ponto crítico, por 40 minutos, utilizando-se o equipamento Critical Point Dryer, modelo CPD 030, Bal-tec, e montadas em "Stubs", com fita dupla face de carbono. Ao final, procedeu-se a metalização utilizando-se o equipamento Sputter, modelo SCD 050, Bal-tec, que consistiu na deposição, durante 80 segundos, de uma fina camada de ouro, de aproximadamente 20 nm de espessura.

As preparações foram então examinadas ao microscópio eletrônico de varredura no Centro de Microscopia Eletrônica da Fundação Osvaldo Cruz, Salvador, BA.

Exames feitos em amostras coletadas 6 horas após a inoculação mostraram que o processo de infecção já havia ocorrido e que a colonização do hospedeiro encontrava-se em andamento. Independentemente do método de inoculação utilizado, foram encontrados zoósporos encistados e germinados, tanto nos cortes realizados as 6 como as 12 horas após a inoculação (Figura 1 A-G), além de esporângios, que só foram visualizados nos cortes obtidos após 12 horas da inoculação (Figura 2 A-C).

Infecção foi observada 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, muito embora não tenham sido feitas medições do seu comprimento (Figura 1). Observou-se também, a penetração direta nas células da epiderme após a formação de apressórios (Figura 1C e D), embora não tenham sido notadas alterações nos tecidos das plantas, 6 e 12 horas após a inoculação, apesar de estruturas semelhantes a haustórios estarem presentes no interior das células do xilema, demonstrando assim a rápida colonização do mesofilo pelo patógeno (Figuras 1F e 2D).

Os eventos da fase de pré-penetração (germinação e emissão de apressório) não foram observados em plântulas de pupunheira inoculadas pelos três métodos durante os períodos de avaliação utilizados (6 e 12 horas após a inoculação) neste trabalho, sendo provável que esta fase tenha ocorrido logo após a inoculação. Em folhas do cacaueteiro foi observado que a penetração de *P. palmivora*, tanto de forma direta quanto pelos estômatos com a formação de apressório, ocorre três horas após a germinação (Luz & Silva, 2001). Se, este fosse também o comportamento do patógeno em pupunheira, as primeiras observações teriam que ter sido feitas duas e quatro horas após a inoculação para que se pudesse evidenciar a fase de pré-penetração.

Colonização dos tecidos do hospedeiro foi observada tanto às 6 quanto às 12 horas após a inoculação, sendo constatada a presença de zoósporos que já haviam penetrado tanto pelos estômatos ou ferimentos quanto, diretamente, através da epiderme. Santos et al. (1999), trabalhando no patossistema *P. infestans* x batata, também observaram todas estas etapas do processo de infecção. Matsuoka (1988), por sua vez, 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. De acordo com alguns autores (Matsuoka, 1988; Hwang et al., 1989; Brites 1991), com o avanço da infecção, o patógeno passa a colonizar, intracelularmente, atingindo todos os tecidos do hospedeiro, inclusive os do sistema vascular. A despeito de não ter sido observada, a emissão do tubo germinativo, pela análise ao MEV, foi possível verificar a penetração do patógeno nas células da epiderme do estipe das plântulas de pupunheira.

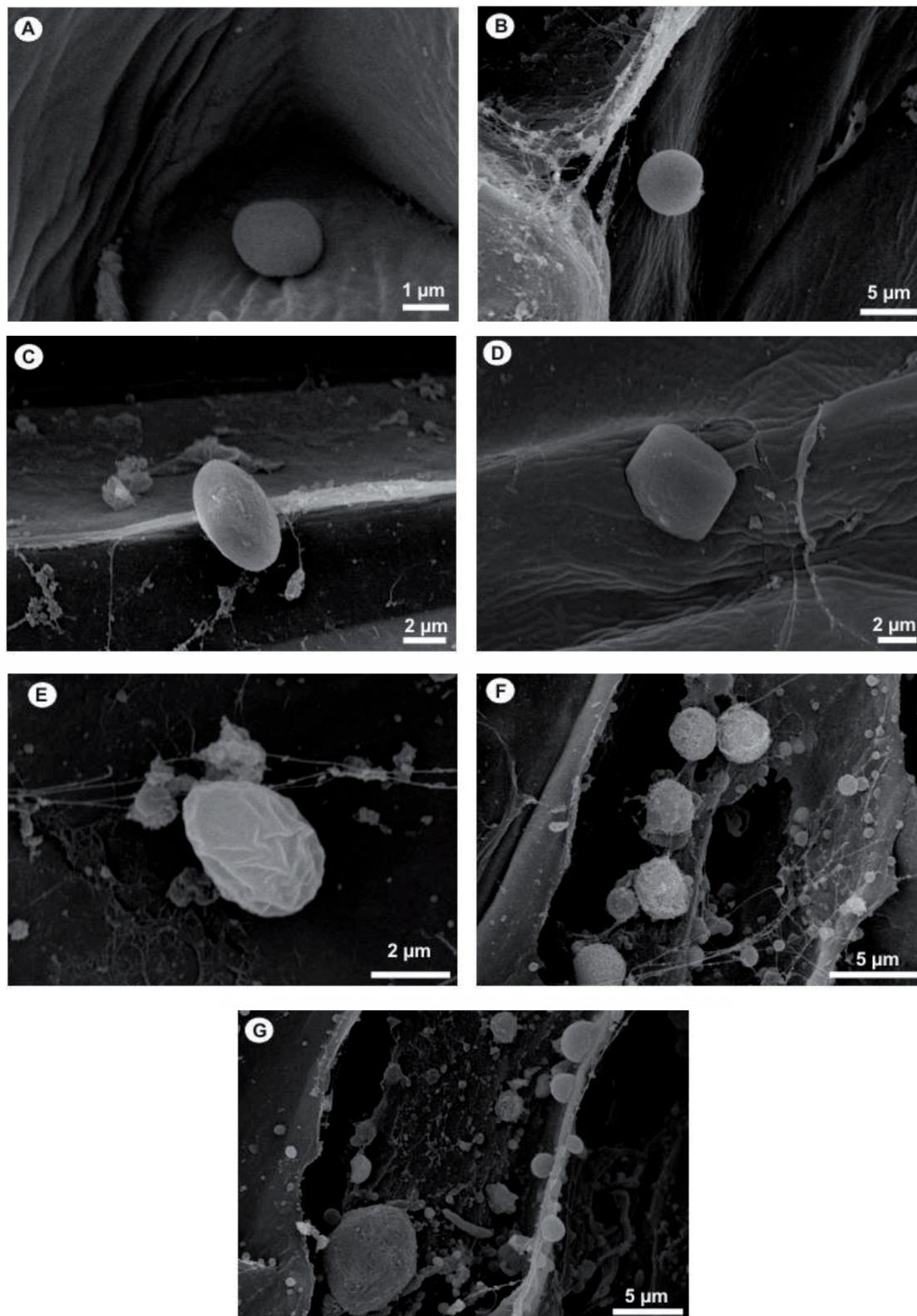


FIGURA 1 - A-B. Micrografias de estruturas de *Phytophthora palmivora* ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) 6 horas após a inoculação em plântulas de pupunheira: zoósporos encistados no interior de células; **C-D.** zoósporos aderidos à superfície do hospedeiro e **D.** penetrando diretamente; **E-F-G.** zoósporos encistados e germinados, micélio do patógeno e haustórios no interior de células.

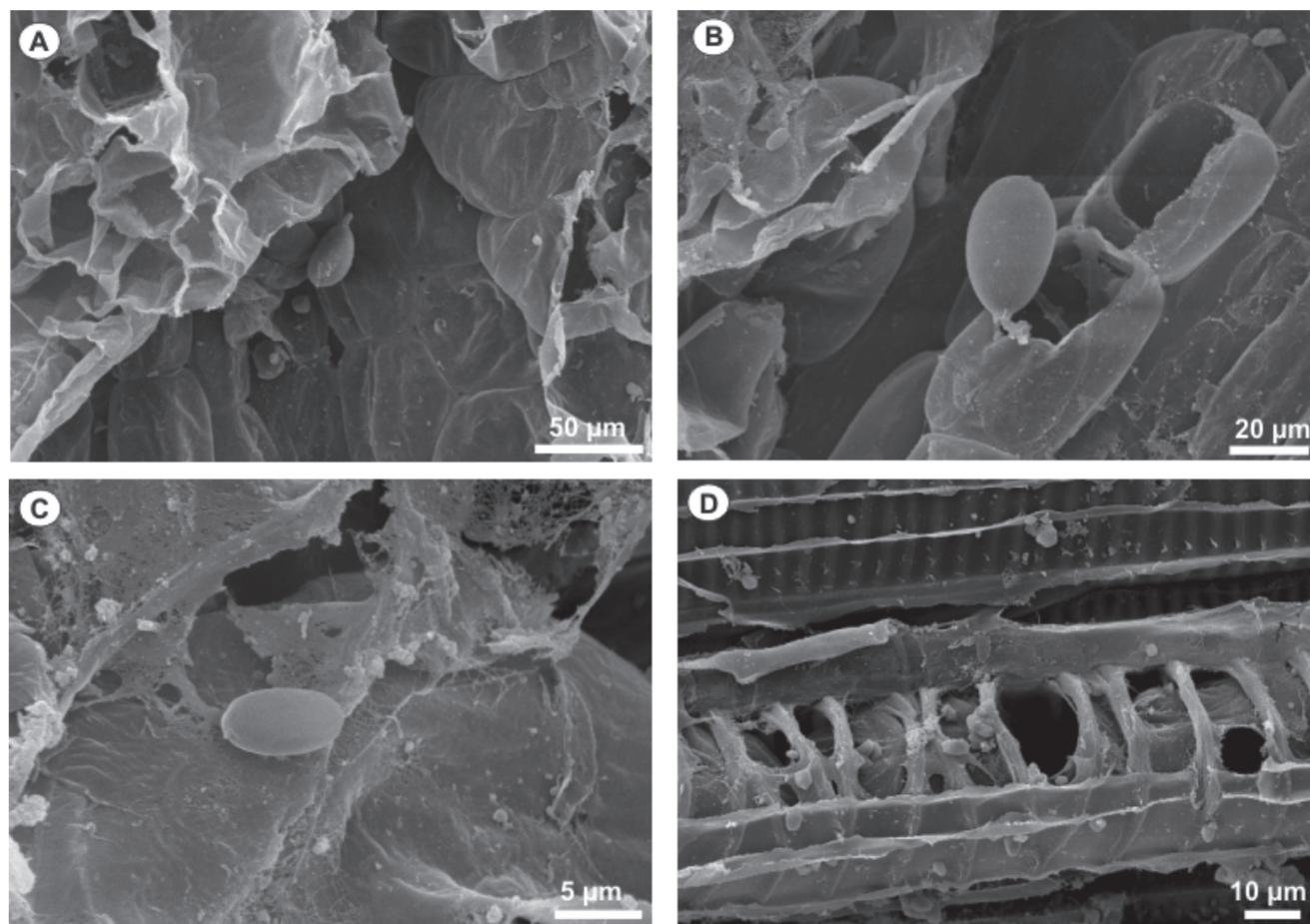


FIGURA 2 - A-B. Micrografias de estruturas de *Phytophthora palmivora* ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) 12 horas após a inoculação em plântulas de pupunheira: esporângios germinando; **C.** esporângio e **D.** haustórios no interior do xilema.

Embora os cortes para as análises ao MEV tivessem sido efetuados próximos aos locais de ferimentos, ainda assim, foram observados zoósporos encistados ou aderidos à epiderme das plantas (Figura 1C-D). 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 constatada uma via preferencial de penetração (Brites, 1991). No patossistema pupunheira x *P. palmivora*, algumas observações sugerem a ocorrência da penetração direta do patógeno pelas células da epiderme da planta (Figura 1D). Fato semelhante foi constatado também 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 nas células epidérmicas, inviabilizando assim tal via de penetração.

Tanto para 6 quanto 12 horas após a inoculação foi observada a colonização do patógeno no interior das células do hospedeiro com a presença principalmente de zoósporos (Figura 1), e de haustórios no interior do xilema (Figuras 1G e 2D). Segundo Matsuoka (1988), haustórios de *Phytophthora* não apresentam a forma típica dos de Uredinales ou Erysiphales, e aqueles produzidos por *P. palmivora* em cacaueteiro apresentam formas variadas. Os haustórios observados em pupunha apresentavam tanto a forma quanto o tamanho variáveis (Figura 2D). A formação de haustórios por espécies de *Phytophthora* tem início poucas horas após a infecção nos seus hospedeiros (Coffey & Wilson, 1983; Matsuoka, 1988). Avrova et al (2008) observaram estas estruturas 3 horas após a infecção de folhas de batateira (*Solanum tuberosum*) por *P. infestans*. Na interação *Phytophthora sojae* e raízes de *Glycine máxima*, haustórios em diferentes estágios de maturação foram observados 10 horas após a inoculação (Enkerli et al., 1997).

Embora neste trabalho só tenham sido feitas análises histopatológicas 6 e 12 horas após a inoculação, ficou

evidenciado que a penetração do patógeno pode ocorrer tanto de forma direta quanto indireta pelos estômatos, não sendo essencial a existência de ferimentos para que haja a penetração. Tais resultados enfatizam a necessidade de que trabalhos complementares sejam realizados com intuito de melhor esclarecer o processo de patogênese neste patossistema.

AGRADECIMENTOS

A primeira e a segunda autoras agradecem ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão das bolsas de mestrado e de Produtividade, respectivamente; à Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) onde o trabalho foi realizado; a Ana Rosa Niella, Dilze Maria Argolo e Ademilde Cerqueira, pela colaboração e apoio; à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC); à Sra. Valéria Fernandes; e à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela estrutura física disponibilizada para observações ao MEV, e em especial a Dra. Adriana Rangel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avrova AO, Boevink PC, Young V, Grenville-Briggs LJ, van West P, Birch PRJ, Whisson SC (2008) A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cellular Microbiology* 10:2271-2284.
- Bovi MLA (2000) O agronegócio palmito de pupunha. *O Agrônomo* 52:10-12.
- Brite MCRS (1991) Histopatologia de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Phytophthora capsici* e *P. palmivora*. Dissertação de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.
- Coffey M, Wilson UE (1983) An ultrastructural study of the late blight fungus *Phytophthora infestans* on potato cultivars possessing different levels of general (field) resistance. *Canadian Journal of Botany* 61:2669-2685.
- Dianese AC (2006) Variabilidade e controle de *Phytophthora palmivora* (podridão-do-pé) e controle da variola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*). Tese de Doutorado. Brasília DF. Universidade de Brasília.
- Enkerli K, Hahn MG, Mims CW (1997) Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. *Canadian Journal of Botany* 75:1493-1508.
- Erwin DC, Ribeiro OK (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. Saint Paul MN. APS Press.
- Hanada RE (2006) Controle de *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão-parda dos frutos de cacaueiro, com fungos endofíticos. Tese de Doutorado. Manaus AM. Universidade Federal do Amazonas.
- Hwang BK, Kim WP, Kim WK (1989) Ultrastructure at the host-parasite interface of *Phytophthora capsici* in roots and stems of *Capsicum annuum*. *Journal of Phytopathology* 127:305-315.
- Ko WH (1994) *Phytophthora* fruit rot and root rot In: Ploetz RC, Zentmyer GA, Nishijima WT, Rohrbach KG, Ohr HD (Eds.) Compendium of tropical fruit diseases. Saint Paul MN. APS Press.
- Luz EDMN, Silva ASDVM (2001) Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacaueiro. In: Luz EDMN, Santos AF, Matsuoka K, Bezerra JL (Eds.) Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas SP. Livraria e Editora Rural Ltda.
- Matsuoka K (1988) Resistência de *Capsicum annuum* L. a *Phytophthora capsici* Leonian: um estudo ultraestrutural da interação. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.
- Oliveira ML, Luz EDMN (2005) Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Itabuna BA. CEPLAC/CEPEC. v. 01.
- Pizzinatto MA, Bovi MLA, Feichtenberger E, Spiering SH (2002) Ocorrência da podridão do estipe em pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 22:371-373.
- Rocha AOJ, Costa AM (2003) Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica palmito de pupunheira. Manaus AM. Sumário executivo SUFRAMA. Volume 7.
- Santos FA, Luz EDMN (2007) Doenças emergentes causadas por *Phytophthora* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 32 (Supl.):41-43.
- Santos AF, Matsuoka K, Maffia LA, Alfenas AC (1999) Importância da estrutura da superfície foliar na interação *Phytophthora capsici* - *Hevea brasiliensis*. *Boletim de Pesquisa Florestal* 39:67-80.

TPP 185 - Recebido 30 Setembro 2010 - Aceito 1 Julho 2011
Editor de Seção: Francisco F. Laranjeira