

**METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E
DETECÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f.sp.
vasinfectum EM SEMENTES DE
ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)**

MARCELLA VIANA DE SOUSA

2006

MARCELLA VIANA DE SOUSA

**METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E DETECÇÃO DE *Fusarium*
oxysporum f.sp. *vasinfectum* EM SEMENTES DE ALGODOEIRO
(*Gossypium hirsutum* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Sousa, Marcella Viana de

Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp.
vasinfectum em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). -- Lavras :
UFLA, 2006.

68 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. 2. Algodão. 3. Inoculação.
4. Sanidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.5194

MARCELLA VIANA DE SOUSA

**METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E DETECÇÃO DE
Fusarium oxysporum f.sp. *vasinfectum* EM SEMENTES DE
ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 10 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Edivaldo Cia

IAC/Campinas

Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado
Departamento de Fitopatologia/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

À memória
Do meu saudoso pai
Pela lição de amor a vida

DEDICO

À minha querida mãe, pelo amor, carinho, apoio e dedicação
Aos meus irmãos, Luiz Otávio, Lourenço e Ana Luiza, pela amizade e incentivo
À minha sobrinha Giovana, pelos momentos de alegria e descontração
Ao Alexandre, pelo companheirismo, força e paciência

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e vitória conquistada.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Dr. José da Cruz Machado, pelo incentivo, orientação, amizade e confiança.

Ao professor Ludwig H. Pfenning, pela co-orientação, sugestões e isolados cedidos.

Ao Dr. Edivaldo Cia, pelas sugestões e participação na banca examinadora.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

À Fazenda Girassol, de Rondonópolis – MT, pelas sementes cedidas.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia, em especial a minha turma de mestrado (Amanda, Edson, Juliana, Nina, Helena, Jean, Dagma, Luciana, Fernanda, Flávio e Elida), pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes, Vivian, Adriano, Dejânia, Enia, Neto, Michelle, Ângela, Gabriela, Joel, Ellen, Cláudio, Carla, Rodrigo e Adelávio, pela ajuda e apoio nos momentos difíceis.

Aos meus familiares, pela compreensão, amor, dedicação e carinho, em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, que me ensinaram a amar o próximo, valorizar a vida e as grandes amizades conquistadas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Aspectos gerais da murcha de fusarium em algodoeiro.....	3
2.2 Métodos de inoculação de sementes por intermédio do condicionamento osmótico/ restrição hídrica.....	7
2.3 Técnicas empregadas na detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> (Atk.) Snyder e Hansen em sementes de algodoeiro.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Origem e perfil do lote de sementes.....	13
3.2 Obtenção dos isolados fúngicos e conferência da patogenicidade pelo método de imersão de raízes.....	13
3.3 Avaliação de metodologias de inoculação de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro pela técnica de restrição hídrica.....	15
3.3.1 Procedimentos de inoculação.....	15
3.3.2 Ensaio 1 – Comparação de métodos de inoculação com diferentes isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	17
3.3.2.1 Teste de germinação em laboratório.....	18
3.3.2.2 Emergência de plântulas em solo / areia	19
3.3.2.3 Teste de sanidade	20
3.3.2.4 Delineamento experimental	20
3.3.3 Ensaio 2 – Comparação de métodos de inoculação em função do período de exposição das sementes ao patógeno, sob restrição hídrica	21
3.3.3.1 Delineamento experimental	21

3.4 Avaliação da influência da composição do substrato na detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro, pelo método de incubação em substrato de papel com restrição hídrica.....	22
3.4.1 Preparo das sementes.....	22
3.4.2 Avaliação da ocorrência de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> nas sementes inoculadas.....	23
3.4.3 Avaliação do método de detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> em sementes provenientes de flores inoculadas.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Verificação da patogenicidade dos isolados pelo teste de imersão de raízes.....	26
4.2 Eficácia dos métodos de inoculação de sementes de algodoeiro baseado em técnica de restrição hídrica.....	27
4.2.1 Ensaio 1 – Comportamento dos isolados a diferentes métodos de inoculação.....	27
4.2.2 Ensaio 2 – Efeito do período de exposição das sementes ao patógeno sob condições de restrição hídrica.....	35
4.3 Influência da composição do substrato na detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> em sementes de algodoeiro, pelo método de incubação em substrato de papel com restrição hídrica.....	40
4.3.1 Verificação da eficácia do método de detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>, contendo quintozene, em sementes provenientes de flores inoculadas.....	48
5 CONCLUSÕES.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS A.....	61
ANEXOS B.....	67

RESUMO

SOUSA, Marcella Viana de. **Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A murcha do algodoeiro, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen, é uma das principais doenças desta cultura. Para estudos das implicações deste fungo em sementes, é importante avaliações com sementes infectadas em vários níveis. Tendo isto em vista, os objetivos neste trabalho foram i) avaliar a eficácia de procedimentos de inoculação e períodos de exposição das sementes de algodoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, por meio da técnica de restrição hídrica e ii) estabelecer uma metodologia viável e simples de detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro, para análise de rotina. Foram comparados os seguintes métodos: 1. imersão das sementes por 10 min em suspensão de conídios com posterior incubação em substrato de papel, com potencial osmótico de -1,0 MPa, 2. atomização de suspensão de conídios sobre o substrato e sobre as sementes dispostas em camadas simples e 3. contato direto das sementes com o micélio do fungo, previamente desenvolvido no substrato desenvolvido em substrato de papel. Todos os métodos permitiram a obtenção de sementes com diferentes potenciais de inóculo, equivalentes aos tempos de exposição de 24, 48, 72, 96 e 120 h ao fungo. As avaliações neste ensaio foram feitas por meio de testes de germinação em rolo de papel, emergência em solo/areia e sanidade. O método mais eficaz foi o de imersão das sementes na suspensão de conídios com incubação em substrato com restrição hídrica. O período máximo de tempo que as sementes permaneceram em contato com o patógeno, sem afetar a sua qualidade fisiológica, foi de 50 h. Altos níveis de infecção foram obtidos com longos períodos de exposição das sementes ao fungo. Com relação à metodologia de detecção, foram comparados seis substratos: 1. 2,4-D, 2. BDA, 3. BDA + iprodione, 4. DG-18, 5. quintozene e 6. extrato de sementes de algodoeiro, todos diluídos quanto ao ágar. Considerando a incidência e coloração roxa, típica do micélio de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e a inibição de fungos contaminantes, verificou-se que o método mais adequado foi a incubação em substrato umedecido com quintozene, sob as condições padrão de incubação para o teste de sanidade de sementes de algodoeiro.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Ludwig H. Pfenning – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

SOUSA, Marcella Viana de. **Methodologies of inoculation and detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.).** 2006. 68 p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Cotton wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen, is one of the most important diseases of this crop. To study the seed-borne implications of that fungus, it is important to make available infected seeds at various levels. Having that in sight, the objectives of this study were: i) to evaluate the effectiveness of inoculation procedures and periods of exposition of cotton seeds to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, through water restriction technique and ii) to establish a reliable and a simple methodology of detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton seeds for routine seed health analysis. The following methods were compared: 1. seed immersion in a conidial suspension for 10 min followed by incubation in a paper substrate with an osmotic potential of -1.0 Mpa, 2. atomization of a conidial suspension upon the substrate and on the seeds, arranged in single layers, and 3. direct contact of the seeds with the fungal mycelium developed on a paper substrate. All methods were able to provide seeds with different inoculum potential, equivalent to different exposition times, 24, 48, 72, 96 and 120 h, of seeds to the fungus. To evaluate the infection efficacy, germination tests on roll paper and in soil/sand substrate and health tests were applied. The most effective method was the immersion of seeds in inoculum suspension plus incubation in substrate with water restriction. The maximum period of time that seeds remain in contact with the pathogen, without affecting their physiological quality was 50 h. Higher infection levels were obtained with longer period of seed exposition to the fungus. With regard to the detection methodology, six substrates were compared: 1. 2,4-D (sodium salt), 2. PDA, 3. PDA + iprodione, 4. DG-18, 5. quintozene and 6. cotton seed extract, all dissolved in diluted agar. Considering the incidence and typical purple colour of *F. oxysporum* mycelium and the inhibition of contaminant fungi, it was found that the most adequate substrate was filter paper moistened with quintozene dissolved in a diluted agar medium under incubation conditions recommended for testing cotton seeds.

*Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Adviser) and Ludwig H. Pfenning – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

A cultura do algodoeiro está sujeita a um elevado número de doenças, cujos patógenos são, em sua maioria, transportados e/ou transmitidos por sementes. Por meio das sementes, as doenças podem ser disseminadas a longas distâncias e causar elevados prejuízos dependendo das condições de ambiente e outros fatores que favorecem o seu desenvolvimento (Carvalho, 1999; Machado, 2000; Machado et al., 2004).

Embora esforços sejam despendidos por pesquisadores no sentido de buscar o controle dessas doenças por meio do melhoramento genético, a resistência de cultivares nem sempre é satisfatória e duradoura em razão da alta variabilidade dos agentes etiológicos envolvidos nestes patossistemas e pela própria instabilidade dos hospedeiros. Desta forma, o manejo das doenças, começando pelo uso de sementes sadias, é uma medida preventiva de baixo custo, que constitui-se, cada vez mais, em uma solução mais viável nestes casos.

Para se evitar a introdução precoce de inóculo em áreas de cultivo, o perfil sanitário das sementes deve ser conhecido antes do plantio, e isto pode ser determinado por meio da análise sanitária em laboratório. Nestes casos, padrões de tolerância são necessários para os patógenos considerados de risco em cada cultura (Machado & Pozza, 2005).

A ocorrência de determinados patógenos nas sementes, mesmo em taxas relativamente baixas, pode gerar grandes perdas na produção, como é o caso de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro. Este patógeno tem sido, em princípio, considerado uma praga não quarentenária regulamentada (PNQR) e seu nível de tolerância proposto, em porcentagem, é de zero por lote de sementes, conforme Portaria do Ministério da Agricultura nº 71 de 22 de fevereiro de 1999.

No entanto, a precisão de métodos de detecção desse organismo tem

sido questionável, gerando uma grande dificuldade e preocupação, tendo em vista os riscos que o uso de sementes portadoras deste patógeno causa ao atual sistema de produção do algodão no Brasil. Atualmente há uma carência de métodos de detecção seguros e viáveis que possam ser aplicados pelo sistema de certificação em análise de rotina.

Métodos de detecção de fungos em sementes são essencialmente baseados em um conhecimento sólido da biologia e comportamento geral desses organismos. A observação das características morfológicas exibidas nas sementes incubadas em substrato de papel (*blotter test*) e em meio agarizado, é o procedimento atual mais usado para identificar fungos em análise de rotina em laboratórios de sementes. Este tipo de teste, além de demorado e laborioso, tem sido insuficiente para identificação de alguns patógenos de risco. (Ball & Reeves, 1992; Machado, 2002).

Para auxiliar os estudos de detecção de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes, há necessidade de disponibilização das mesmas com a presença do inóculo em diferentes níveis de associação. Devido às dificuldades de se dispor de sementes de algodoeiro infectadas por este patógeno, métodos de inoculação artificial de sementes eficazes tornam-se necessários.

Diante do exposto, foram objetivos neste trabalho: i) avaliar a eficácia de procedimentos de inoculação e períodos de exposição das sementes de algodoeiro ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, por meio da técnica de restrição hídrica, capazes de proporcionar elevados índices de infecção, ii) estabelecer uma metodologia segura, precisa, simples e viável de detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da murcha de fusarium em algodoeiro

No Brasil, o algodão é atualmente um dos principais produtos de exploração agrícola da economia nacional. Todavia, a rápida expansão das áreas cultivadas com algodão não é acompanhada de um adequado manejo de doenças. Encontram-se registrados na literatura mais de 250 espécies de agentes causais de doenças do algodoeiro. É certo que muitas dessas doenças não apresentam qualquer importância econômica, porém outras são altamente destrutivas, culminando em elevadas perdas na produtividade, além de beneficiar a expansão de vários patógenos no território brasileiro, como é o caso de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, agente etiológico da murcha de fusarium ou fusariose do algodoeiro (Silva et al., 2005). Quando associado a nematóides, principalmente do gênero *Meloidogyne*, a severidade de *Fusarium oxysporum* f sp *vasinfectum* tende a ser maior em função da abertura de ferimentos na raiz e da debilitação da planta (Watckins, 1981; Cia & Fuzatto, 1999).

Tal doença foi descrita pela primeira vez em 1892 por Atkinson, no Alabama, EUA (Atkinson, 1892; Tóffano, 1963; Juliatti & Ruano, 1997; Silva et al., 2005). A primeira constatação no Brasil foi feita por Krug em 1935, em material da variedade “Texas” proveniente da Estação Experimental de Alagoinha, Paraíba. Em 1938, a murcha foi registrada na Paraíba e em Pernambuco (Krug, 1936; Deslandes, 1938; Tóffano, 1963; Silva et al., 2005).

No Estado de São Paulo, a doença foi descrita pela primeira vez em dezembro de 1958, por Arruda, baseado em material colhido no município de Santo Expedito. Esta doença foi responsável por uma fase de decadência da

cotonicultura paulista, sobretudo na segunda metade da década de 50 (Arruda, 1958; citado por Tóffano, 1963, p. 92).

Segundo Chiavegato (2001), os cotonicultores começam a enfrentar custosos danos provocados por doenças na região do cerrado, que eram então, inexpressivas nas áreas tradicionalmente produtoras e inexistentes nas novas áreas, principalmente na região Centro-Oeste. Na Tabela 1 foram estabelecidas notas de 1 a 5 para a importância potencial da doença, desconsiderando-se o emprego de medidas de controle, principalmente o uso de cultivares resistentes, nas principais regiões produtoras brasileiras.

TABELA 1 – Importância potencial de doenças do algodoeiro em Estados produtores da região meridional do Brasil em 1999¹.

Doença	Estados Produtores						Total
	PR	SP	MG	GO	MT	MS	
Murcha de fusarium	4	5	3	3	1	2	18
Murcha de verticillium	3	3	1	1	1	1	10
Mancha angular	4	3	3	3	3	3	19
Outras manchas foliares	3	2	2	3	4	3	17
Ramulose	3	3	4	5	5	4	24
Nematóides	4	5	4	3	2	2	20
Doença azul	4	5	5	5	5	5	29
Murchamento avermelhado	4	5	3	3	3	3	21

Fonte: Chiavegato (2001) modificado de Cia & Fuzatto (1999)

¹ Escala de Notas: 1 = sem importância; 2 = pequena importância; 3 = medianamente importante, necessitando de preocupações e estudos; 4 = importante, demandando medidas de controle; 5 = muito importante, inviabilizando a cultura se não houver controle.

No entanto, até a safra 2001/2002, áreas de cultivo de algodão no Estado do Mato Grosso eram consideradas isentas de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. Com resultados de trabalhos realizados por Machado et al. (2003) foi confirmado o primeiro relato de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro no Mato Grosso na safra 2002/2003. Após o levantamento realizado na safra 2003/2004 nas áreas de produção de sementes do Mato Grosso, foi possível confirmar focos de infecção de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em 13 municípios, distribuídos entre as regiões Sul e Centro-sul do Estado, envolvendo 8732 ha avaliados (Machado, 2005).

Fusarium oxysporum Schlecht. f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder e Hansen pertence aos anamorfos de ascomicetos e é considerado praga não quarentenária regulamentada (Tadano, 2004; Machado & Pozza, 2005). Seus esporos da fase assexuada são representados por microconídios, macroconídios e clamidósporos. Os microconídios originam-se na extremidade de conidióforos curtos, são hialinos, elípticos e produzidos em grande quantidade. Os macroconídios, formados no ápice de conidióforos ramificados ou na superfície de esporodóquios, são hialinos, fusiformes, com extremidades curvadas. Os clamidósporos, geralmente abundantes e localizados nas extremidades das hifas, são globosos e possuem paredes espessas que atuam como estrutura de resistência (Burgess et al., 1994).

A disseminação de inóculo dentro da área de cultivo pode ocorrer através da água de chuva ou irrigação, que leva os propágulos juntamente com partículas de solo. A longas distâncias, o fungo pode ser disseminado por sementes que podem abrigar inóculo, tanto externo como internamente. Embora seja predominantemente um fungo de solo, mesmo em baixa taxa de transmissão pela semente pode ser de grande importância, se essa semente for lançada em solo não contaminado com o patógeno (Goulart, 1995; Cassetari Neto & Machado, 2000).

A penetração de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em tecidos do algodoeiro ocorre através da raiz principal, radículas ou pêlos absorventes e processa-se de modo direto através da superfície vegetal ou de ferimentos presentes nos mesmos. A colonização desenvolve-se com o crescimento intercelular das hifas em direção aos vasos do xilema. O patógeno permanece praticamente confinado ao xilema e, a partir daí, distribui-se por toda a planta por meio do crescimento de hifas ou pela produção de conídios, que são arrastados pelo fluxo de seiva bruta. Com a evolução da doença, tem início a obstrução e o escurecimento dos vasos (Bedendo, 1995).

Os sintomas da murcha de fusarium podem aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, apresentando um quadro sintomatológico variável, dependendo do grau de resistência da variedade e das condições ambientais. Em plântulas de cultivares susceptíveis, os cotilédones e as folhas murcham, amarelecem e caem, e o sistema vascular torna-se descolorido. Plantas infectadas são menores, com folhas e capulhos reduzidos. Em secção transversal ou longitudinal do caule ou da raiz, pode-se observar escurecimento dos vasos, resultante da oxidação e polimerização de compostos fenólicos (Goulart, 1998; Cia & Salgado, 1997).

Uma vez o inóculo instalado na área de cultivo e diante de condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (temperatura entre 24 e 30° C e alta umidade), os sintomas iniciais manifestam-se em reboleira. A doença torna-se mais severa em solos arenosos, com pH ácido, fertilização desequilibrada (principalmente alto teor de nitrogênio e baixo teor de potássio) e na presença de nematóides do gênero *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus* (Tanaka, 1982; Santos, 1995; Cia & Salgado, 1997; Cia & Fuzatto, 2005).

Os métodos de controle mais utilizados para o caso da murcha de fusarium são o uso de variedades resistentes e o uso de sementes sadias. O primeiro, no entanto, não se mostra tão satisfatório e duradouro devido à

variabilidade do patógeno e da planta (Vieira & Machado, 2002; Mann, 2002). Já o uso de sementes sadias é uma medida preventiva e de baixo custo, evitando-se a introdução do inóculo na área, correspondendo a um princípio de exclusão. A rotação de culturas e a manutenção de níveis satisfatórios de disponibilidade de potássio e nitrogênio podem reduzir o inóculo do patógeno no solo (Nelson, 1981).

Brown (1968), citado por Hillocks (1982, p. 142), testou um grande número de sementes proveniente de diversas variedades de algodão com diferentes graus de resistência. Em geral, as variedades mais susceptíveis apresentaram tendência a produzir maior número de sementes infectadas, mas todas as variedades testadas produziram ao menos algumas sementes infectadas quando cultivadas em solo altamente infestado pelo patógeno. Contudo, algumas variedades resistentes produziram quase a mesma quantidade de sementes infectadas, quanto às variedades susceptíveis. Brown (1968), citado por Hillocks (1982, p. 142), obteve níveis de infecção de 0,08 a 0,38% e conclui que o risco de disseminação da murcha através de sementes infectadas era tão grande com variedades resistentes quanto com variedades susceptíveis.

2.2 Métodos de inoculação de sementes por intermédio do condicionamento osmótico/restricção hídrica

As sementes são importantes veículos de agentes fitopatogênicos, que podem ser levados ao campo e provocarem redução na germinação e vigor, originando focos primários de doenças (Machado et al., 2001). A maioria das doenças de importância econômica que ocorre na cultura do algodoeiro é causada por patógenos que são transmitidos pelas sementes. Dentre eles merecem destaque *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (murcha de fusarium), *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (ramulose), *Ramularia areola*

(mancha de ramularia) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (mancha-angular) (Cia & Fuzatto, 2005). No entanto, pelas dificuldades de obter sementes com diferentes níveis de infecção por estes patógenos, a inoculação de sementes torna-se necessária para o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa. Este tipo de inoculação precisa garantir a reprodução da sintomatologia típica da doença e ainda possibilitar a sua aplicação em estudos de detecção, patogenicidade, transmissibilidade, melhoramento genético do hospedeiro, controle, dentre outros (Tanaka et al., 1989; Tanaka & Menten, 1991).

Os métodos mais simples de inoculação de sementes consistem na imersão dessas numa suspensão de esporos e/ou hifas ou em apenas revesti-las com esporos de patógenos (Agarwal & Sinclair, 1987; Tanaka & Menten, 1991), e, ainda, por meio de contato das sementes com a colônia fúngica desenvolvida em meios de cultura convencionais (Santos, 1995; Albuquerque, 2000). Por estes métodos, os fungos ficam, em sua maioria, aderidos ao tegumento das sementes, não se garantindo o processo de infecção e sim contaminação (Tanaka & Menten, 1991; Machado et al., 2001).

Em estudo específico, Tanaka & Menten (1991) compararam três métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* com vistas à obtenção de sementes infectadas. Os métodos utilizados constaram do contato das sementes com a colônia dos fungos durante 24 horas; imersão das sementes em suspensão de conídios durante 30 minutos; e imersão das sementes em suspensão de conídios durante 2 horas. Dentre estes, o primeiro método foi considerado o mais eficiente na obtenção de sementes infectadas, mostrando a importância do tempo de exposição da semente ao patógeno, permitindo a colonização dos tecidos internos.

No entanto, a inoculação de sementes por contato direto com os fungos em meio agarizado (BDA), pode não produzir níveis de infecção satisfatórios para determinadas finalidades, pelo fato de haver limite do tempo de exposição

das sementes ao fungo, visto que as sementes podem iniciar o processo de germinação em curto período de tempo (Machado et al., 2001).

O emprego do princípio de condicionamento osmótico, já conhecido em tecnologia de sementes visando a potencialização do processo de germinação de algumas espécies, foi inicialmente testado no Laboratório da Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, como parte de uma metodologia de inoculação de sementes com alguns fungos e bactérias de interesse no Brasil (Machado & Langerak, 2002).

Por meio desta técnica, a inoculação de sementes mostra-se eficiente e bastante promissora para todos os patossistemas estudados (Carvalho, 1999; Machado, 2002; Machado et al., 2001, 2002, 2004; Costa et al., 2003; Celano, 2004). A metodologia consiste na exposição das sementes ao fungo desenvolvido em meio de cultura contendo um restritor hídrico, por diferentes períodos de tempo. Essa técnica permite a obtenção de sementes com diferentes potenciais de inóculo (Prado et al., 2002; Sousa et al., 2002; Costa et al., 2002).

A vantagem da técnica da restrição hídrica sobre outros métodos de inoculação artificial, como imersão das sementes em suspensão de esporos ou simplesmente o contato limitado destas com a colônia do fungo, em meio convencional (Tanaka et al., 1989; Tanaka & Menten, 1991), é que as sementes inoculadas podem ser obtidas com diferentes potenciais de inóculo (Machado & Machado, 2002) e utilizadas, após secagem, por períodos de armazenamento mais prolongados de tempo.

2.3 Técnicas empregadas na detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder e Hansen em sementes de algodoeiro

Sobre testes de sanidade de sementes de algodoeiro, há relatos na literatura sobre a eficácia de diversos métodos para detecção de patógenos, os

quais também envolvem diferentes processos de pré-tratamento como deslincamento e desinfestação superficial, e de incubação das sementes. De modo geral, busca-se padronizar métodos sensíveis, rápidos, simples e reproduzíveis (Pizzinatto, 1987; Menten, 1988). Na escolha de um método é importante também levar em consideração o patógeno alvo, a infra-estrutura do laboratório disponível, o grau de treinamento do pessoal e o objetivo do teste (International Seed Testing Association - ISTA, 1976; Neergaard, 1979, Machado, 2002).

De acordo com a literatura, o teste de sanidade para sementes de algodoeiro tem sido conduzido de forma ainda não padronizada. Por exemplo, Mendonça & Alves (1973) usaram o método do plaqueamento em BDA para sementes de algodoeiro deslincadas com ácido sulfúrico. Por sua vez, Davis (1977), empregando sementes deslincadas com ácido sulfúrico, submeteu-as à assepsia superficial com hipoclorito de sódio por cinco minutos, e procedeu à incubação disponível em papel de filtro umedecido em água e em BDA. Variações destes métodos têm sido relatadas por Menezes et al. (1979), Pizzinatto et al. (1984) e Tanaka & Paolinelli (1984).

Como resultado de testes comparativos de sanidade de sementes de algodoeiro realizados no Brasil, no período de 1984/85, o método do papel de filtro mostrou-se o mais eficaz para a detecção de *Fusarium* sp., usando-se sementes sem linter, pré-tratadas com hipoclorito de sódio e incubadas à 22°C, por 12 dias, 12 h luz/12 h escuro (Soave et al., 1992).

Para a maioria dos fungos associados a sementes, o teste de incubação em substrato de papel, conhecido também como “blotter test”, é o mais freqüente e universal. Os critérios utilizados para a detecção de fungos do gênero *Fusarium* em sementes de algodoeiro são baseados em aspectos morfológicos (Machado & Langerak, 2002). Neste caso, procuram-se condições que possam estimular o fungo a produzir estruturas que permitam a sua

identificação com auxílio de microscópio estereoscópico. Para evitar ou reduzir a germinação das sementes nos testes de incubação, é comum adicionar ao substrato de papel o sal de 2,4-diclorofenoxiacético (Machado & Langerak, 1993). Ainda assim, estes métodos, apesar de utilizados em testes de rotina, apresentam limitações, pois nem sempre permitem a diagnose precisa em termos de distinguir subespécies, variedades e raças (Tanaka, 1995; Tanaka & Menten, 1988; Vieira, 1996). Apesar de padronizado para a maioria dos fungos, o método apresenta limitações por ter, geralmente, sua sensibilidade comprometida em lotes de sementes altamente contaminados por saprófitas e seu uso ser restrito a fungos necrotróficos que produzem estruturas de fácil identificação (McGee, 2002; Machado, 2002).

Diversos autores relataram problemas de contaminação das sementes de algodoeiro com *Rhizopus* sp. durante o período de incubação e posterior avaliação nos testes de sanidade (Lima et al., 1982; Machado & Langerak, 1994). Algumas alternativas para superar esses problemas estão sendo estudadas, como a incorporação de dichloran, iprodione, estreptomina e sal de 2,4-diclorofenoxiacético ao substrato de papel, o que torna o teste mais viável de ser utilizado em análise de rotina (Machado & Langerak, 1994).

A adição de 2,4-D ao substrato de papel pode reduzir a incidência de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes, em níveis de até 40%. Na tentativa de substituir o uso deste produto, vários estudos têm sido realizados utilizando-se a técnica de restrição hídrica (Coutinho et al., 2001; Machado, 2002; Machado et al., 2001, 2004; Magalhães, 2005). Especificamente com a espécie *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, foi observado que a restrição hídrica induzida pelo soluto manitol no potencial osmótico $-1,0$ MPa não interfere no seu desenvolvimento e detecção (Machado, 2002).

Devido à plasticidade e variações de características fenotípicas no gênero *Fusarium*, a taxonomia baseada somente em aspectos morfológicos é pouco

confiável (Snyder & Hansen, 1953). A distinção entre *Fusarium oxysporum* e outras espécies de *Fusarium* que ocorrem em sementes de algodão, detectados pelo método de incubação em substrato de papel, requer, quase sempre, o isolamento e observações destes fungos em meio OA (oatmeal agar) para avaliar o aspecto das colônias e em SNA (synthetic nutrient-poor agar) para a avaliação das características micro-morfológicas (Nelson et al., 1983). No entanto, o período final para a sua identificação é superior ao tempo requerido em análises de rotina para sementes.

Na tentativa de avaliar a viabilidade do uso de substratos seletivos incorporados ao método de incubação em substrato de papel na detecção de *Fusarium oxysporum* em sementes de feijão e algodão, trabalhos recentes foram desenvolvidos. Para isto, foram utilizadas sementes inoculadas pelo método de contato das sementes com o micélio fúngico. Estas sementes foram, em seguida, semeadas em substrato de papel impregnados, em separado, com os meios SNA, DG-18 e meio basal com 0,2% de ágar, com e sem manitol e 2,4-D. O substrato contendo o meio Basal + 2,4 – D proporcionou as melhores condições para distinção de *F. oxysporum* associado às sementes (Vilela et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA) no período de janeiro a dezembro de 2005.

3.1 Origem e perfil do lote de sementes

As sementes, pertencentes a cultivar Delta Opal, safra 2004/2005, foram fornecidas pela Fazenda Girassol, produzidas no município de Rondonópolis, MT. A qualidade sanitária e fisiológica inicial do lote foi determinada de acordo com testes indicados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e pela International Seed Testing Association (ISTA, 2002) e os resultados encontram-se na Tabela 1B. Para alguns dos fungos detectados, embora a incidência tenha sido relativamente elevada, a intensidade de inóculo por sementes encontrava-se em baixo nível.

3.2 Obtenção dos isolados fúngicos e conferência da patogenicidade pelo método de imersão de raízes

Foram obtidos cinco isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e três isolados de outras espécies do gênero *Fusarium*, de diferentes regiões (Tabela 1).

TABELA 1 - Origem dos isolados de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e *Fusarium* spp. empregados neste estudo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	Origem
Fov 07	Maranhão
Fov 27	Maranhão
Fov 101	Pernambuco
CNPA 0007	Paraíba (CNPA)
MT - 01	Mato Grosso
Outras espécies de <i>Fusarium</i>	
CML 0567 – <i>F. verticillioides</i>	Minas Gerais
<i>F. semitectum</i>	Minas Gerais
CML 0576 – <i>F. solani</i>	Minas Gerais

Para a verificação da patogenicidade dos isolados, sementes de algodoeiro foram semeadas em bandejas plásticas, com dimensão de 40x27x7 cm contendo vermiculita como substrato e, em seguida, transferidas para câmara de crescimento vegetal, a $25 \pm 3^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h, por 10 dias. Foram semeadas 100 sementes por bandeja.

No décimo dia, as plântulas foram retiradas do substrato e, após lavagem em água corrente, tiveram $\frac{1}{3}$ de suas raízes cortadas e mergulhadas, durante cinco minutos, em suspensão de conídios, cuja concentração estava calibrada para 10^6 conídios/mL. O mesmo procedimento foi realizado para o tratamento testemunha consistindo de mergulho em água destilada e esterilizada (Costa, 2000).

A seguir as plântulas foram transferidas para sacos plásticos com volume para 3 litros de substrato, contendo uma mistura de solo argiloso / areia na proporção de 1:1, previamente tratados com brometo de metila. Após 21 dias, avaliações de incidência e severidade da doença foram realizadas. A severidade

foi avaliada atribuindo-se notas, segundo a escala elaborada por Nascimento et al. (1995), com algumas modificações (Tabela 2).

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento, cada um deles constituído por um saquinho de 3 litros contendo cinco plântulas.

TABELA 2 – Escala de notas utilizada na análise de murcha de fusarium em plântulas de algodão, adaptado de Nascimento et al. (1995).

Nota	Categoria dos sintomas
0	Ausência de sintomas
1	Presença de escurecimento vascular confinado à raiz principal; epinastia
2	Sintomas externos iniciais da doença (clorose e murcha) e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule
3	Sintomas bem definidos da doença (clorose, murcha e seca de folhas) e escurecimento vascular atingindo o terço médio da planta
4	Sintomas bem definidos da doença e escurecimento atingindo o terço superior da planta ou plantas mortas

3.3 Avaliação de metodologias de inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro pela técnica de restrição hídrica.

3.3.1 Procedimentos de inoculação

As sementes foram primeiramente desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% durante um minuto e, em seguida, secas ao ar, em papel

germitest, durante 24 horas.

Os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e incubados em BOD com temperatura ajustada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, durante sete dias. Após esse período, adicionou-se 10 mL de água destilada e esterilizada a cada placa, suspendendo os conídios com alça de Drigalski para a obtenção da suspensão de inóculo.

As suspensões de todos os isolados de *F. oxysporum* f.p. *vasinfectum* foram calibradas para a concentração de 10^6 conídios/mL e utilizadas em três métodos de inoculação, conforme descrição a seguir:

Método 1 – Imersão das sementes na suspensão de conídios por 10 min e contato com substrato contendo restritor hídrico.

As sementes, inicialmente, foram imersas na suspensão de conídios por 10 min e, posteriormente, colocadas em bandeja plástica contendo como substrato três folhas de papel germitest esterilizadas, previamente umedecidas em meio BDA líquido com potencial osmótico de $-1,0$ MPa. Este potencial foi alcançado pela adição de manitol ao meio líquido na quantidade indicada pelo software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995).

Em cada bandeja foram colocadas cinco camadas de substrato + sementes, correspondendo cada uma a diferentes períodos de incubação: 24, 48, 72, 96 e 120 h. As bandejas, cobertas com plástico transparente, foram colocadas em câmara com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. A testemunha constou da imersão das sementes em água destilada e esterilizada, por 10 min, e incubação no substrato já mencionado.

Método 2 – Atomização do inóculo sobre o substrato de papel e sobre as sementes

O substrato constituído de forma semelhante ao método 1, foi atomizado inicialmente com suspensão de conídios e em seguida, após a disposição das sementes sobre o mesmo, procedeu-se a uma nova atomização, de todo o conjunto, com a mesma suspensão de conídios. Cada bandeja também continha cinco camadas, conforme descrito no primeiro método. Como testemunha, atomizou-se água destilada e esterilizada sobre o substrato e sementes.

Método 3 – Contato direto das sementes com o micélio dos fungos

O substrato foi atomizado com a suspensão de conídios, conforme descrito no método 2, e incubado em câmara de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h durante três dias. Após o desenvolvimento micelial dos fungos, as sementes foram colocadas sobre as colônias, em camada simples e mantidas por diferentes períodos de exposição, conforme indicado no método 1. Como testemunha, as sementes foram colocadas em contato com o substrato livre de inóculo.

Após a incubação por 24, 48, 72, 96 e 120 h, as sementes, de todos os métodos comparados neste ensaio, foram retiradas e distribuídas sobre papel germitest em temperatura ambiente, para secagem. Após três dias, as sementes foram colocadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria e seca, onde permaneceram até o momento das avaliações.

3.3.2 Ensaio 1 – Comparação de métodos de inoculação com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*

Neste ensaio, cada isolado foi utilizado de acordo com a descrição dos métodos de inoculação.

Os potenciais de inóculo, em número de cinco, corresponderam aos tempos de exposição das sementes (24, 48, 72, 92 e 120 h) ao fungo, sendo

utilizada neste ensaio, uma amostra de sementes, composta de proporções iguais (20%) de cada período de exposição das sementes ao inóculo.

A avaliação dos efeitos foi realizada por meio de três testes, conforme descrição:

3.3.2.1 Teste de germinação em laboratório

Este teste foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes sobre substrato de papel-toalha (tipo germitest) umedecido com água destilada, 2,5 vezes o peso do papel seco conforme Brasil (1992). Os rolos de papel foram colocados em germinador regulado à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por sete dias. Realizou-se a contagem de sementes germinadas e o número de plântulas com infecção. Para isto, foram feitos cortes em bisel nas raízes das plântulas, atribuindo-se notas conforme a intensidade das lesões, sendo:

Nota 0 = sem sintoma

Nota 1 = escurecimento vascular

Nota 2 = morte das plântulas

Os dados de severidade foram ponderados pelo índice de McKinney (1923):

$$\text{ID (\%)} = \sum [(f n) / (NX)] 100, \text{ onde:}$$

ID = índice de doença

f = número de plantas com determinada nota

n = nota observada

N = número total de plantas avaliadas

X = nota máxima da escala

3.3.2.2 Emergência de plântulas em solo/areia

Este teste foi realizado em caixas plásticas com dimensões de 48 x 29 x 09 cm, com substrato composto por areia e solo argiloso, na proporção de 1:1, previamente tratado com brometo de metila. O cálculo da quantidade de água necessária para que fosse atingido 70% da capacidade de campo foi realizado segundo recomendações de Brasil (1992).

Foram semeadas 50 sementes por caixa com quatro repetições por tratamento. Após a semeadura, as caixas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal na disposição de blocos casualizados, com temperatura ajustada à $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 21 dias. As variáveis analisadas foram: a) índice de velocidade de emergência (IVE); b) estande ao final de 21 dias; c) comprimento da parte aérea de 15 plântulas; d) índice de doença.

O índice de velocidade de emergência foi determinado pela contagem diária de plântulas que apresentaram o cotilédone exposto acima do solo até a estabilização do estande e calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962):

$$\text{IVE} = \sum_{i=1}^n N_i/D_i, \text{ onde:}$$

IVE = índice de velocidade de emergência;

N_i = número de plântulas germinadas na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente;

D_i = número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente;

A severidade foi avaliada por meio do índice de doença ponderado por McKinney (1923). A escala de notas utilizada para o cálculo do índice de doença

foi proposta por Nascimento et al. (1995), com algumas modificações como descrito anteriormente (Tabela 2).

3.3.2.3 Teste de sanidade

Neste caso, as sementes inoculadas foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1% por 30 s e secas ao ar por 12 h. Em seguida, foram distribuídas 25 sementes em placas de Petri, de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em calda agarizada (ágar-água a 2%), acrescido de 71,30 g de manitol, obtendo-se o potencial osmótico de $-1,0$ MPa (Machado, 2002). As placas foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Ao final desse período, foi examinada cada semente individualmente ao microscópio estereoscópio, verificando-se a incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, através da porcentagem de ocorrência deste patógeno nas sementes analisadas.

3.3.2.4 Delineamento experimental

Para todos os testes foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. A análise de variância foi realizada em esquema fatorial 6×3 (isolados, métodos de inoculação). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

3.3.3 Ensaio 2. Comparação dos métodos de inoculação em função do período de exposição das sementes ao patógeno, sob restrição hídrica

As sementes com diferentes potenciais de inóculo de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, obtidas em função dos diferentes tempos de exposição (24, 48, 72, 96 e 120 h), foram semeadas em caixas plásticas contendo como substrato solo/areia na proporção de 1:1. Foi utilizado o isolado Fov 27 com base em resultados de ensaios anteriores. Utilizou-se a densidade de 150 sementes para cada método de inoculação. Como tratamento controle foram utilizadas sementes não inoculadas. Em seguida, as caixas plásticas foram colocadas em câmara de crescimento vegetal com temperatura ajustada para $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h, por 21 dias. O cálculo da quantidade de água necessária para atingir 70% da capacidade de campo foi realizado segundo recomendações de Brasil (1992).

Avaliou-se diariamente o número de plântulas emergidas até a estabilização do estande. Estes dados foram ponderados para índice de velocidade de emergência (IVE) segundo Maguire (1962). Aos 21 dias, foram realizadas avaliações de estande final, altura de plântulas e severidade da doença. Este último foi ponderado para índice de doença (%), segundo o índice de McKinney (1923).

3.3.3.1 Delineamento experimental

O ensaio foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com três repetições de 50 sementes por bandeja. A análise de variância foi realizada em esquema fatorial 5x3x2 (tempos de exposição das sementes; métodos de inoculação; inóculo). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o

programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000) e as médias ajustadas a um modelo de regressão, conforme a natureza dos dados.

3.4 Avaliação da influência da composição do substrato na detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro, pelo método de incubação em substrato de papel com restrição hídrica.

3.4.1 Preparo das sementes

Para este ensaio as sementes foram inoculadas pelo método de imersão em suspensão de conídios de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, com incubação em substrato de papel com restrição hídrica de $-1,0$ MPa, preparado conforme descrição anterior. Foi utilizada uma amostra composta de proporções iguais (20%) de sementes de cada potencial de inóculo de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, conforme procedido no ensaio de inoculação anterior (item 3.3.2).

Em todos os tratamentos foram utilizadas placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com os respectivos substratos, de acordo com os substratos estabelecidos neste ensaio (Tabela 3). A incubação das placas foi realizada a temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h por sete dias, segundo recomendações para a análise sanitária de sementes (Brasil, 1992; ISTA, 2002).

TABELA 3 – Composição dos substratos utilizados em adição ao papel de filtro e ágar diluído na proporção de 5g/L.

Substrato	Composição do substrato
2,4 - D	Ágar-água + sal de 2,4-diclorofenoxiacético (10 ppm)
BDA	Extrato de 200 g batata + 20 g dextrose + 71,3 g manitol
DG - 18	140 mL de glicerol + 8 g glicose + 4 g peptona + 0,8 g KH ₂ PO ₄ + 0,4 g MgSO ₄ .7H ₂ O + 900 mL de água destilada + 71,3 g manitol + 2 mL de solução (750 mg de cloranfenicol + 20 mg de dichloran)
Quintozene	15 g peptona + 1,0 g KH ₂ PO ₄ + 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O + 1 L de água destilada + 71,3 g manitol + 1,0 g de estreptomina e 1,0 g de quintozene (PCNB).
BDA + iprodione	Meio BDA + 71,3 g manitol + iprodione (2,5 ppm)
Extrato de sementes de algodoeiro	Líquido obtido da trituração de 50 g de sementes de algodoeiro + 20 g sacarose + 71,3 g manitol

3.4.2 Avaliação da ocorrência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* nas sementes inoculadas

A avaliação da influência dos substratos testados constou da determinação da incidência e da coloração roxa, típica do micélio de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* desenvolvidos sobre ou ao redor das sementes, com o auxílio do microscópio estereoscópico. De forma análoga, avaliações foram realizadas também para a ocorrência de *F. verticillioides*, *F. semitectum* e *F.*

solani nas sementes inoculadas. Quando necessário, foi utilizado o microscópio óptico para confirmação das estruturas dos fungos.

Para todos os isolados foram realizados cultivo dos fungos, em meio BDA, a partir de algumas sementes, com vistas à confirmação das características micro-morfológicas dos isolados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. A análise de variância foi realizada em esquema fatorial 6 x 6 (substratos, isolados).

Para as outras espécies de *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. semitectum* e *F. solani*), foi utilizado a análise de variância com apenas um fator (substrato).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

3.4.3 Avaliação do método de detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes provenientes de flores inoculadas

Para este ensaio a inoculação foi realizada em plantas com idade de 60 dias, ocasião em que apresentaram botões florais, utilizando-se o isolado Fov 27, cuja maior agressividade já havia sido demonstrada.

Para o cultivo das plantas, a semeadura foi realizada em canteiros de 1m de largura x 5m de comprimento, em casa-de-vegetação. Manejo, adubação e tratamentos culturais foram realizados de acordo com recomendações para o cultivo de algodão (Fuzatto et al., 1998). Aproximadamente 60 dias após semeadura, uma suspensão de conídios ajustado para 10^6 conídios/mL foi pulverizada diariamente nas flores, até cessar o período de floração. Após a formação dos capulhos, o algodão foi colhido, deslintado com ácido sulfúrico e as sementes submetidas à assepsia superficial com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% por 1 minuto (Menezes et al., 1979; Pizzinatto et al., 1984; Tanaka & Paolinelli,

1984). Posteriormente, duzentas sementes foram submetidas ao teste de sanidade pelo método de incubação em substrato de papel, escolhido com base nos resultados de ensaios anteriores. Foram utilizadas 25 sementes por placa de Petri de 15 cm de diâmetro, com oito repetições, incubadas a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Verificação da patogenicidade dos isolados pelo teste de imersão de raízes

Todos os isolados de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* mostraram-se virulentos ao algodão pela metodologia empregada, havendo diferença quanto a agressividade (Tabela 1A). Os isolados CNPA 0007 e Fov 27 foram os mais agressivos (Tabela 1). Por outro lado, as outras espécies de *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. semitectum* e *F. solani*) não apresentaram sintomas de murcha ou outro tipo de dano visual na avaliação realizada.

Este tipo de comportamento diferenciado por parte de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* foi também observado por Pizzinatto & Menten (1991), em trabalho onde foram comparados dois isolados deste fungo. Esta variabilidade patogênica também foi relatada por Colyer (1986).

TABELA 1 – Porcentagem de incidência e severidade dos sintomas de murcha de fusarium em plântulas de algodão inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e *Fusarium* spp. Lavras, MG, 2006.

Isolados	Incidência (%)	Severidade – ID (%)
Fov 07	73 c	28 c
Fov 27	100 a	56 a
Fov 101	80 b	35 b
CNPA 0007	100 a	61 a
MT – 01	73 c	15 d
CML 0567 (<i>F. verticillioides</i>)	0 d	0 e
<i>F. semitectum</i>	0 d	0 e
CML 0576 (<i>F. solani</i>)	0 d	0 e
Controle *	0 d	0 e

As médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

* Controle = raízes de plântulas cortadas e mergulhadas em água destilada e esterilizada.

4.2 Eficácia dos métodos de inoculação de sementes de algodoeiro baseado em técnica de restrição hídrica

4.2.1 Ensaio 1 - Comportamento dos isolados a diferentes métodos de inoculação

No teste de germinação observou-se diferença significativa na interação métodos de inoculação e virulência dos isolados para as variáveis analisadas (Tabela 2A).

Pela Tabela 2, com relação à porcentagem de germinação, os isolados reagiram diferentemente em cada método de inoculação aplicado. Esta variação na reação entre os isolados pode ser explicada pela sua ação patogênica sob condições favoráveis à infecção e colonização desses em sementes. Para os isolados mais agressivos (Fov 27 e CNPA 0007) não houve diferença quanto à eficácia entre os métodos de inoculação estudados. Para os isolados menos agressivos (Fov 07 e MT-01), os métodos de inoculação em que as sementes permaneciam em contato com os conídios e não com o micélio fúngico desenvolvido sobre o substrato, foram os mais eficazes. No entanto, a redução da porcentagem de germinação, em cada método de inoculação, quando comparado com o tratamento controle, foi resultado da influência da presença do patógeno nas sementes.

Sob condições ideais para o desenvolvimento do patógeno que são fornecidas no teste de germinação (temperatura e umidade), observou-se que a inoculação teve influência considerável na germinação das sementes, principalmente em relação aos isolados mais agressivos (Fov 27 e CNPA 0007) que reduziram o percentual de germinação a valores desprezíveis quando comparados com o controle (sementes não inoculadas), em todos os métodos de inoculação (Tabela 2).

TABELA 2 – Porcentagem de germinação de sementes de algodoeiro submetidos às condições do teste padrão de germinação, inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Fov) em três métodos de inoculação com restrição hídrica. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Isolados de Fov	Métodos de Inoculação		
	1 ^{/1}	2 ^{/2}	3 ^{/3}
Controle*	69,25 b A	70,50 b A	86,25 a A
Fov 07	54,50 ab A	56,00 a AB	41,50 b BC
Fov 27	0,00 a B	0,00 a E	2,00 a D
Fov 101	53,50 a A	35,00 b CD	53,50 a B
CNPA 0007	5,00 a B	7,50 a E	5,50 a D
MT - 01	57,50 a A	52,00 a BC	29,50 b C

As médias com mesma letra, minúscula nas linhas, e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

* Controle = sementes não inoculadas; ^{/1}= imersão das sementes por 10 minutos na suspensão de 10^6 conídios/mL e incubação em substrato com restrição hídrica; ^{/2} = atomização do inóculo na concentração de 10^6 conídios/mL sobre o substrato com restrição hídrica e sobre as sementes; ^{/3} = sementes em contato com micélio do fungo, desenvolvido em substrato com restrição hídrica durante 72 horas.

A decisão de se concentrar os estudos em metodologia na qual lança-se mão do recurso da restrição hídrica, ou condicionamento osmótico das sementes, foi tomada considerando-se que por outros métodos de inoculação perde-se vantagens no que tange a manutenção de viabilidade das sementes após a sua inoculação, e tendo-se em mente que por meio da restrição hídrica é possível obter sementes com diferentes potenciais de inóculo onde o processo de infecção pode ser controlado.

Baseado nestes resultados fica evidenciado que a elevada eficácia das metodologias de inoculação comparadas neste trabalho e reforçam os resultados

de outros estudos, nesta linha de pesquisa, como os de Machado et al. (2004). Estes autores observaram que *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* inoculado em sementes de algodoeiro, sob diferentes potenciais osmóticos (-0,4 a -1,0 MPa) provocaram redução de germinação e conseqüente aumento no percentual de sementes mortas. Neste caso houve um maior período de exposição das sementes ao patógeno, com o potencial osmótico mais negativo, garantindo o processo de infecção das sementes.

Os resultados observados para a intensidade da doença, expressos em porcentagens de índice de doença (ID), em todos os métodos, evidenciam a maior agressividade dos isolados Fov 27 e CNPA 0007 (Tabela 3). No entanto, os métodos de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1) e contato direto com o micélio (método 3) destacaram-se como os mais eficazes em causar infecção de sementes, não havendo diferença estatística entre eles.

Pela literatura, em estudos com outros patossistemas, como *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro, foi observado uma tendência semelhante ao que ocorreu neste trabalho (Tanaka & Menten, 1991). Neste estudo com os agentes da antracnose e ramulose, verificou-se que o método de contato direto das sementes de algodoeiro com colônias dos fungos foi o mais eficaz, seguido pelo método de imersão das sementes em suspensão de inóculo. Ressalta-se que no referido trabalho a restrição hídrica não foi utilizada. O aparecimento de sintomas nestes casos pode ocorrer, sujeito, ao patossistema em questão. Em caso onde os sintomas aparecem somente a partir de alto potencial de infecção das sementes, o método de contato sem a restrição hídrica fica limitado em questão do tempo de exposição das sementes ao patógeno.

TABELA 3 – Porcentagem de índice de doença (ID) em plântulas de algodão inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Fov) em três métodos de inoculação com restrição hídrica e submetidas às condições do teste padrão de germinação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Isolados de Fov	Métodos de Inoculação		
	1 ^{/1}	2 ^{/2}	3 ^{/3}
Controle*	0,00 a C	0,00 a D	0,00 a C
Fov 07	37,00 a B	31,25 a C	38,00 a B
Fov 27	88,50 a A	82,50 a A	88,50 a A
Fov 101	28,25 a B	37,25 a C	40,25 a B
CNPA 0007	76,50 a A	56,75 b B	82,25 a A
MT - 01	26,75 a B	26,75 a C	33,50 a B

As médias com mesma letra, minúscula nas linhas, e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

* Controle = sementes não inoculadas; ^{/1}= imersão das sementes por 10 minutos na suspensão de 10^6 conídios/mL e incubação em substrato com restrição hídrica; ^{/2} = atomização do inóculo na concentração de 10^6 conídios/mL sobre o substrato com restrição hídrica e sobre as sementes; ^{/3} = sementes em contato com micélio do fungo, desenvolvido em substrato com restrição hídrica durante 72 horas

No que tange a emergência de plântulas em solo/areia, a interação métodos de inoculação e isolados não foi significativa para as variáveis analisadas (Tabela 3A).

Com relação aos métodos de inoculação, houve diferença estatística significativa apenas para as variáveis estande final e altura de plântulas (Tabela 4). O método de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1) proporcionou redução do estande e plântulas menores comparado aos demais métodos de inoculação (Tabela 4), o que pode ter sido o resultado de um maior nível de infecção das sementes inoculadas por este método. Entretanto, deve-se

lembrar que um método de inoculação ideal deve garantir a infecção de sementes e manter de forma satisfatória seu poder germinativo para posterior utilização (Machado et al., 2004).

TABELA 4 – Índice de velocidade de emergência (IVE), estande final, altura e índice de doença (ID), provenientes de sementes submetidas a três diferentes métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Método de Inoculação	IVE	Estande final (%)	Altura (cm)	ID (%)
1 ¹	7,46 a	64,92 b	7,0 b	6,45 a
2 ²	7,91 a	70,50 a	7,3 ab	6,18 a
3 ³	8,16 a	71,67 a	7,7 a	5,31 a

As médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹= imersão das sementes por 10 minutos na suspensão de 10^6 conídios/mL e incubação em substrato com restrição hídrica; ² = atomização do inóculo na concentração de 10^6 conídios/mL sobre o substrato com restrição hídrica e sobre as sementes; ³ = sementes em contato com micélio do fungo, desenvolvido em substrato com restrição hídrica durante 72 horas.

O método de inoculação por imersão das sementes em suspensão de conídios por um determinado período de tempo, já foi objeto de estudos por outros pesquisadores (Balmer et al., 1966; Halfon-Meiri & Volcani, 1977; Tanaka & Menten, 1991). Este método apresenta como desvantagem a caracterização de, apenas, o processo de contaminação e não infecção. Além disso, a secagem das sementes pode resultar na morte da maioria dos conídios por ressecamento (Tanaka & Menten, 1991). Estas desvantagens foram superadas pela restrição hídrica utilizada no presente trabalho, na qual após a imersão, as sementes foram submetidas a diferentes períodos de exposição ao

fungo sob restrição hídrica, garantindo uma maior infecção e obtenção de diferentes potenciais de inóculo.

Sabe-se que a discrepância de resultados revelados pelos dois testes de avaliação aplicados, teste de germinação em laboratório e emergência em solo / areia, é compreensível com base nos princípios e fundamentos de fitopatologia. Para que uma doença venha a ocorrer, é necessário que aconteça a interação patógeno, hospedeiro e ambiente. Caso haja alteração de um desses componentes, como o ambiente, podem ocorrer variações na incidência e na severidade da doença. Neste trabalho, ao mudar o substrato de papel germitest para solo/areia, em ambos os testes de avaliação, foi observada uma acentuada redução nos índices de doença, havendo valores mais elevados para o teste de germinação em laboratório (Tabela 3 e 4). Isso pode ser devido às condições mais favoráveis que o teste de germinação em rolo de papel proporciona ao desenvolvimento das sementes e, conseqüentemente, do patógeno. Isto também foi observado por Machado et al. (2001) e Henning & França Neto (1980), com relação ao patossistema *Phomopsis sojae* em sementes de soja. Este patógeno teve um comportamento mais agressivo em teste de germinação em laboratório do que em emergência em solo/areia. Este fato provavelmente é devido ao mecanismo de escape no qual a plântula, ao emergir, libera o tegumento infectado no solo enquanto que, no teste de germinação (rolo de papel) o tegumento permanece em contato com os cotilédones, por um período de tempo maior.

Para a variável índice de velocidade de emergência (IVE), a ausência de diferença estatística entre os tratamentos, para os três métodos de inoculação (Tabela 4), pode estar relacionada às condições de restrição hídrica que foram as mesmas em todos os casos.

Comparando-se os isolados, pode-se observar diferença significativa entre eles para todas as variáveis analisadas (Tabela 5). O isolado Fov 27, seguido do CNPA 0007 e MT-01 foram os mais agressivos.

As plântulas emergidas do tratamento cujas sementes não foram inoculadas (controle) permaneceram isentas do patógeno, diferenciando-se das inoculadas com fungo apenas com relação ao índice de doença (Tabela 5).

TABELA 5 – Índice de velocidade de emergência (IVE), estande final, altura e índice de doença (ID) de plântulas em ensaios de inoculação de sementes com diferentes isolados de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Isolado	IVE	Estande Final (%)	Altura (cm)	ID (%)
Controle *	8,45 a	77,83 a	7,7 a	0,00 d
Fov 07	8,29 a	74,33 a	7,8 a	3,68 c
Fov 27	7,48 ab	63,00 bc	7,0 ab	10,12 a
Fov 101	8,47 a	72,33 a	7,8 a	6,18 bc
CNPA 0007	6,58 b	55,83 c	7,3 ab	9,38 ab
MT - 01	7,78 b	70,83 ab	6,5 b	6,53 ab

As médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Controle = semente não inoculada

Pelo teste de sanidade a interação métodos de inoculação e isolados foi significativa para a incidência de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Tabela 4A).

Para sementes não inoculadas, não foi observado o crescimento do patógeno, comprovando que estas se encontravam livres do fungo em questão (Tabela 6).

Pela Tabela 6, observa-se diferença estatística entre os métodos de inoculação apenas para os isolados CNPA 0007 e MT-01, sendo a maior incidência do patógeno nas sementes inoculadas pelo método de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1).

TABELA 6 – Porcentagem média de ocorrência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em testes de sanidade de sementes de algodoeiro inoculadas com diferentes métodos e com diferentes isolados na temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12h. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Isolados	Métodos de Inoculação		
	1 ^{/1}	2 ^{/2}	3 ^{/3}
Controle*	0,0 a C	0,0 a B	0,0 a B
Fov 07	52,0 a AB	47,0 a A	50,0 a A
Fov 27	68,0 a A	43,0 a A	43,0 a A
Fov 101	37,0 a B	28,0 a A	21,0 a A
CNPA0007	78,0 a A	42,0 b A	30,0 b A
MT - 01	67,0 a A	31,0 b A	39,0 ab A

Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas linhas, e letra maiúscula, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

^{/1}= imersão das sementes por 10 minutos na suspensão de 10^6 conídios/mL e incubação em substrato com restrição hídrica; ^{/2} = atomização do inóculo na concentração de 10^6 conídios/mL sobre o substrato com restrição hídrica e sobre as sementes; ^{/3} = sementes em contato com micélio do fungo, desenvolvido em substrato com restrição hídrica durante 72 horas; *Controle = semente não inoculada

Pelos resultados deste ensaio, nos três testes avaliados, o método de inoculação por imersão das sementes na suspensão de conídios por 10 min com posterior incubação em restrição hídrica (método 1), possibilitou um maior

processo infeccioso das sementes. Este método, provavelmente proporcionou uma maior concentração e adesão de conídios nas sementes inoculadas. Desta forma, estima-se que os conídios tiveram um contato mais íntimo com as sementes sendo capazes de atingir o embrião mais eficazmente.

Os três métodos de inoculação comparados neste estudo apresentam como vantagens a facilidade de execução, a sua eficácia na produção de sementes infectadas, a padronização da concentração de inóculo e a possibilidade de uso destas sementes inoculadas por períodos mais prolongados. Uma limitação seria a necessidade de um maior controle da assepsia dos materiais envolvidos na operação, posto que as chances de contaminações externas são evidentes.

4.2.2 Ensaio 2 - Efeito do período de exposição das sementes ao patógeno sob condições de restrição hídrica.

Pela análise de variância, o fatorial método de inoculação x período de exposição x inóculo (presença e ausência) foi significativo para o índice de velocidade de emergência (IVE) e estande final (Tabela 5A).

Sabe-se que o nível de inóculo presente na semente influencia o nível de germinação e a taxa de transmissão de patógenos (Menten, 1988; Machado, 1988, 1994; Machado & Pozza, 2005). Estes, quando associados à semente, são grandes causadores de morte em pré e pós-emergência de plântulas, reduzindo, portanto, a germinação (Tanaka, 1994). No entanto, com a técnica de restrição hídrica, da forma como tem sido utilizada, os métodos de inoculação possibilitam a infecção de sementes com diferentes níveis de inóculo de acordo com o tempo de exposição da semente ao patógeno (Machado et al., 2001). Neste trabalho, o maior tempo de contato das sementes com a colônia fúngica provocou o aumento da infecção das sementes pelo patógeno,

conseqüentemente, causando redução na velocidade de emergência e no estande final (Figuras 1 e 2). As sementes expostas ao fungo por cinco dias sofreram maior pressão de inóculo, refletindo em menor porcentagem de germinação. Contudo, é preciso que se considere que o condicionamento osmótico também pode exercer influência na germinação de sementes (Figuras 1 e 2). Como houve um acréscimo no valor de vigor em sementes sem inóculo, o decréscimo desse valor em sementes inoculadas pode ser atribuído à interação patógeno-semente.

O condicionamento osmótico/restrição hídrica em algodão pode influenciar na germinação e no vigor de sementes dependendo das condições de estresse provocadas. Guimarães (1991) concluiu que esse condicionamento em sementes de algodão é uma alternativa viável para maximizar o desempenho de germinação sob qualquer condição. No entanto, concentrações salinas ou restrições hídricas no substrato, naquele estudo, contribuíram para uma leve redução do vigor das sementes. No presente trabalho onde a restrição hídrica foi de $-1,0$ MPa, observa-se que o ponto máximo do índice de velocidade de emergência ocorreu nas sementes que permaneceram em torno de 50 h em contato com o patógeno sob restrição hídrica (Figura 1). Da mesma forma, em estudos com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* inoculada em feijão, a germinação das sementes foi afetada a partir de 36 h de contato da bactéria com as sementes (Valarini & Menten, 1991). Em outro estudo conduzido por Machado et al. (2004) a influência de *Colletotrichum gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodão inoculadas sob restrição hídrica variou em função do período de exposição das sementes a estes fungos. Para infecção destas foi necessário prolongar o tempo de exposição por mais de 48 h. Nestas circunstâncias, estes fungos provocaram a morte de sementes quando expostas a um maior período de tempo, devido ao maior nível de potencial de inóculo.

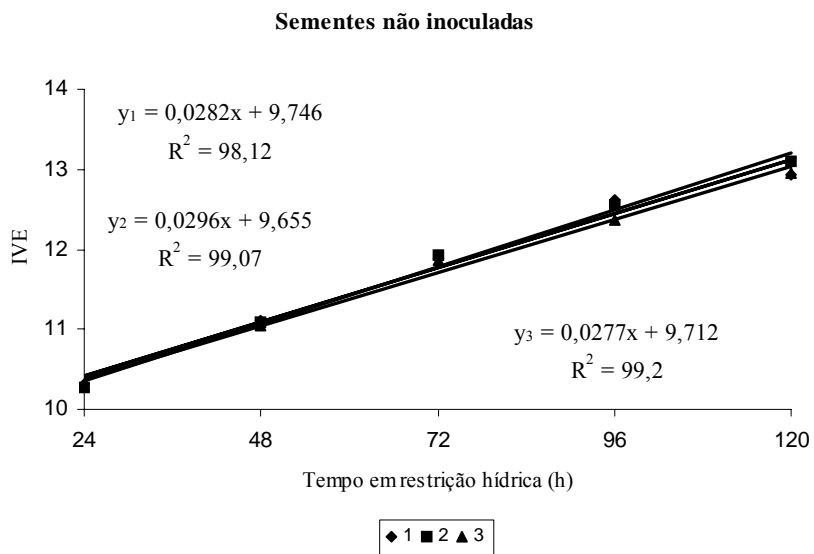
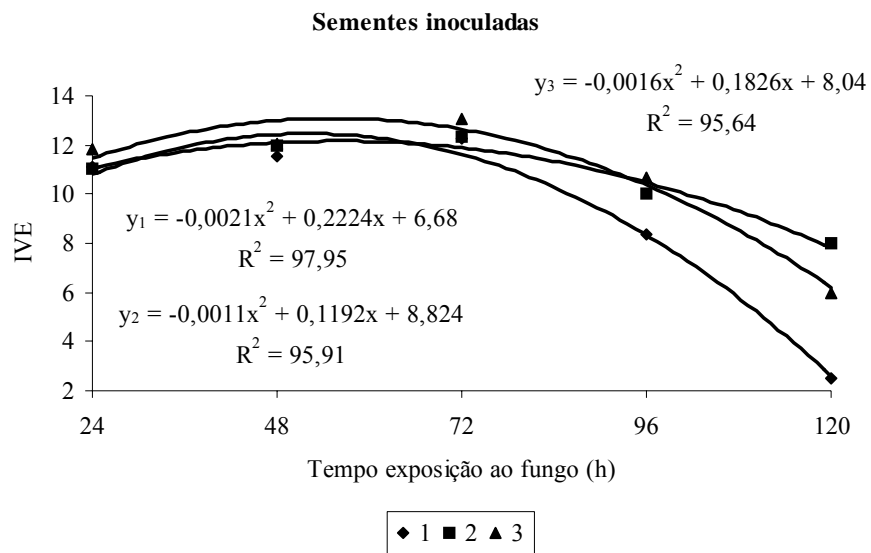


FIGURA 1 - Índice de velocidade de emergência de sementes de algodão inoculadas e não inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* com três diferentes métodos em função do tempo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

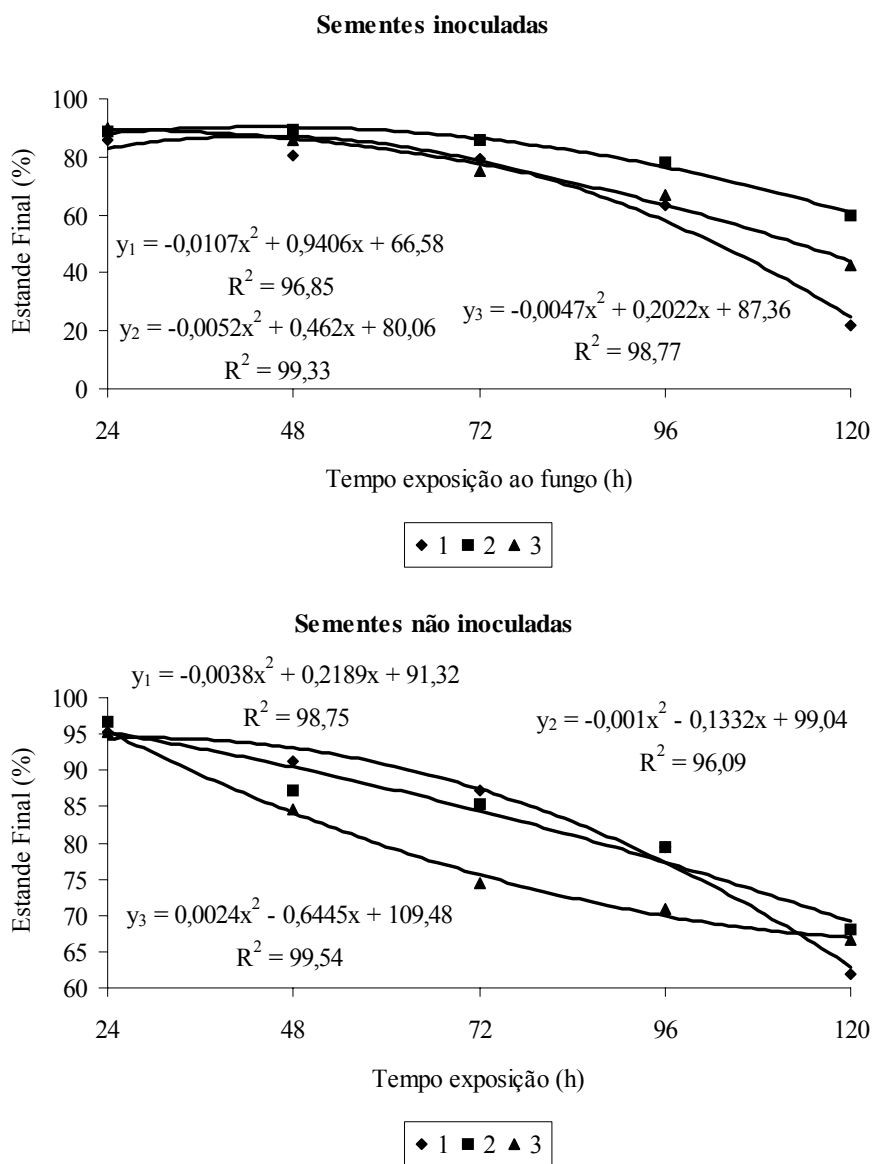


FIGURA 2 – Estande final proveniente de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* com três diferentes métodos em função do tempo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

À medida que houve aumento do período de exposição das sementes à restrição hídrica com manitol a $-1,0$ MPa, livre do patógeno, o índice de velocidade de emergência também foi maior (Figura 1). No entanto, sob estas condições houve redução do estande final (Figura 2), por ter ocorrido o início da protusão radicular no período de 120 h, ocasionando a morte das sementes após secagem ao ar.

Apesar da particularidade de cada cultura, os resultados observados neste trabalho são condizentes com os observados por Lopes et al. (1996). Estes autores relataram uma redução da germinação de sementes de cebola, com o aumento do período de condicionamento osmótico até oito dias. No entanto, estas apresentaram uma maior velocidade de germinação.

Com relação à severidade da doença, o índice porcentual aumentou com o aumento do período de exposição das sementes ao patógeno. Com 48 h de exposição das sementes ao fungo, a severidade foi de 27-29% para os três métodos de inoculação estudados (Figura 3). No entanto, nos períodos de exposição de 96 e 120 h, pelo método de inoculação de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1), o índice de doença (ID) foi maior quando comparado ao método de contato direto das sementes ao micélio do fungo (método 3), evidenciando o processo de infecção (Figura 3).

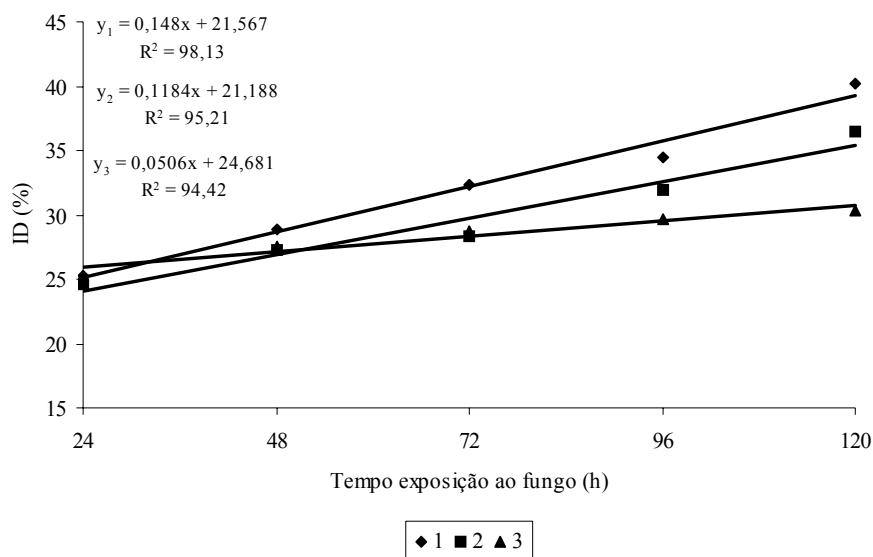


FIGURA 3 – Severidade da fusariose em plântulas provenientes de sementes inoculadas com três diferentes métodos em função do tempo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

4.3 Influência da composição do substrato na detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro, pelo método de incubação em substrato de papel com restrição hídrica

A interação substratos e isolados foi significativa para a incidência e a coloração roxa do micélio de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Tabela 6A).

Em todos os substratos testados foi observada a ocorrência do patógeno em questão sobre as sementes de algodoeiro (Tabela 8). No entanto, sob as condições padrões de incubação para testes de sanidade de sementes, 20°C e fotoperíodo de 12 h, o substrato que possibilitou maiores valores de incidência de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e formação da coloração roxa do micélio foi o

papel de filtro umedecido com quintozene diluído. Neste caso, a porcentagem média de ocorrência do patógeno nas sementes (incidência) e sua respectiva coloração foi de 100% para quase todos os isolados testados (Tabelas 8 e 9), com exceção apenas para o isolado Fov 101. O substrato BDA diluído também se destacou quanto à incidência de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Tabela 8), porém foi observada uma maior ocorrência de *Rhizopus* sp., que pode comprometer a avaliação dos resultados, desfavorecendo a sua utilização em testes de rotina.

TABELA 8 - Incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em testes de sanidade com diferentes substratos, inoculadas pelo método de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1) e incubadas a 20°C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Isolados	Substratos					
	2,4 - D	BDA	BDA + Iprodione	DG - 18	Quintozene	Extrato de algodão
Controle*	0 a D	0 aC	0 aC	0 aC	0 aB	0 aC
Fov 07	89 a A	100 aA	98 aA	93 aA	100 aA	97 aA
Fov 27	61 b B	100 aA	99 aA	89 aA	100 aA	93 aA
Fov 101	50 bcB	83 aB	43 cB	50 bcB	93 aA	66 bB
CNPA0007	66 c C	97 aAB	99 aA	77 bcA	100 aA	87 abB
MT - 01	30 d B	93abAB	93 abA	78 bcA	100 aA	67 cA

Médias com mesma letra, minúscula nas linhas, e maiúscula, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Controle = semente não inoculada

TABELA 9 – Porcentagem de ocorrência da coloração roxa do micélio de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em testes de sanidade com diferentes substratos, inoculado pelo método de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1) e incubadas a 20°C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Isolados	Substratos					
	2,4 - D	BDA	BDA + Iprodione	DG - 18	Quintozene	Extrato de algodão
Controle*	0 a B	0 a B	0 a B	0 a C	0 a C	0 a B
Fov 07	45 b A	99 a A	98 a A	100 a A	100 a A	100 a A
Fov 27	63 b A	100 a A	96 a A	100 a A	100 a A	100 a A
Fov 101	45 b A	90 a A	10 c B	76 bc B	47 b B	94 a A
CNPA0007	41 a A	100 a A	95 ab A	78 bc AB	100 a A	100 a A
MT - 01	63 b A	81 ab A	16 c B	83 bc AB	100 a A	100 a A

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas linhas, e maiúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

* Controle = semente não inoculada

Com relação ao substrato contendo quintozene (PCNB), seu uso em meio de cultura é amplamente conhecido para isolamentos de espécies de *Fusarium* a partir do solo, na maioria dos casos (Nash & Snyder, 1962; Ali et al., 1991). Este meio também foi utilizado em análise de sementes de outras espécies conforme relatado por Prasad (1982) e Chiocchetti et al. (2001).

Em estudos de aperfeiçoamento do teste de sanidade de sementes de algodão, por meio da incubação em substrato de papel, foi proposta a adição de baixas doses de alguns compostos fungicidas, como iprodione e dichloran, ao

papel de filtro, para contornar o problema de incidência e desenvolvimento rápido de *Botryodiplodia theobromae* e *Rhizopus stolonifer* (Machado & Langerak, 1993). No presente trabalho, pôde-se observar que mesmo em baixas doses daqueles fungicidas, ainda houve crescimento de *Rhizopus* sp em algumas sementes, dificultando a avaliação sanitária das sementes incubadas nos substratos contendo BDA + iprodione e DG-18.

A menor incidência de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* neste trabalho foi observada quando as sementes foram submetidas ao método de incubação em substrato de papel + 2,4-D em calda agarizada (Tabela 8). Isto também foi observado por Machado (2002) e Machado et al. (2004) em outros estudos com sementes de algodão. Estes autores observaram redução em até 40% na ocorrência de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, com o uso de 2,4-D. Esses resultados indicam um efeito fungitóxico do 2,4-D em relação a este patógeno sob condições do teste de incubação em papel de filtro.

O substrato contendo extrato de sementes de algodoeiro obteve uma porcentagem média de ocorrência de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Tabela 8). No entanto, quase 100% das sementes com a presença do patógeno apresentaram a facilidade de detecção através da coloração roxa, típica deste fungo (Tabela 9). Este substrato teve a desvantagem da alta incidência de saprófitas, o que prejudicou uma melhor avaliação destes resultados.

Dos seis substratos testados, o quíntozene se mostrou como o mais adequado, eficaz, preciso e seguro na detecção de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em testes de rotina. Este substrato possibilitou uma sensibilidade maior na detecção deste patógeno, com relação tanto a sua incidência quanto a coloração típica deste fungo (Figura 4).

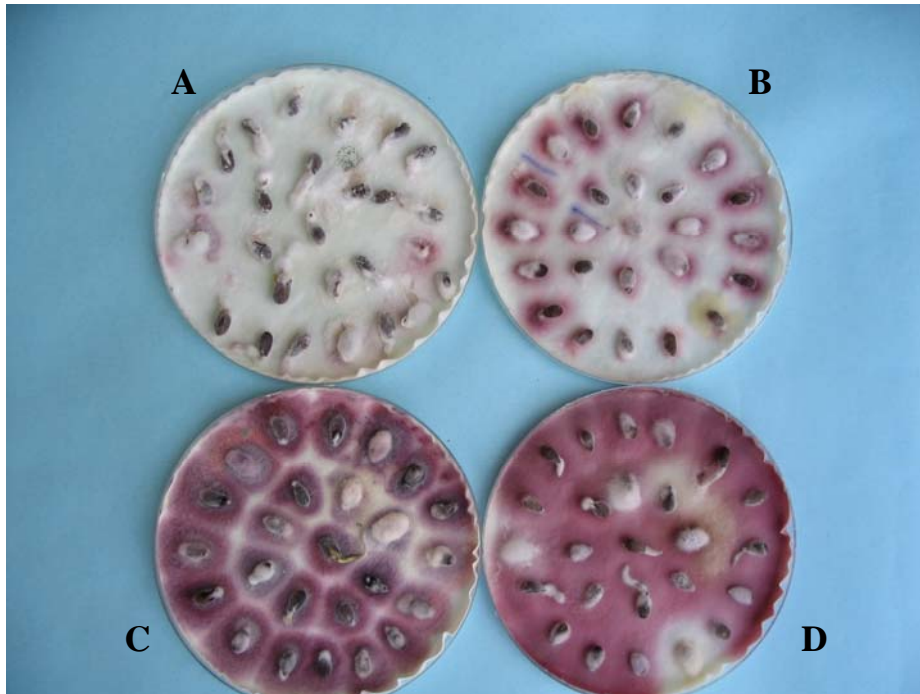


FIGURA 4 – Diferença entre incidência e coloração roxa do micélio, típica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, com relação a alguns substratos utilizados neste estudo. (A) 2,4-D; (B) BDA+iprodione; (C) Quintozene; (D) BDA. UFLA, Lavras – MG, 2006.

Com isso, no atual trabalho houve uma inibição evidente de outros fungos, alguns dos quais podem mascarar ou dificultar a identificação e quantificação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro, como é o caso de *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.. Esta inibição foi conseguida pelo substrato contendo quintozene (PCNB). Por um outro ângulo é importante ressaltar que o uso de quintozene em testes de rotina em laboratório pode implicar em riscos adicionais para operadores do mesmo. Isto significa que o seu uso, da forma como foi testado, deve ser

procedido de maior rigor e em casos onde a detecção (semi) seletiva de *Fusarium oxysporum* é demandada. Provavelmente o uso de doses menores de quintozene, ou seja, abaixo de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seria uma alternativa que pode possibilitar o uso deste produto em análises sanitárias de sementes, em rotina de laboratório.

No que tange a rapidez, não houve distinção marcante entre os substratos, já que o período de incubação foi de sete dias para todos. No entanto, com relação a economicidade, o substrato contendo quintozene foi o mais oneroso por conter mais ingredientes com custos individuais em média mais elevados (Tabela 2B). É importante, neste caso, avaliar a relação de custo/benefícios. Este substrato foi o que proporcionou maiores índices e maior clareza de detalhes na detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* nas sementes testadas (Figura 5).



FIGURA 5 – Estruturas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em meio BDA, isolado de sementes incubadas em substrato de papel + quintozene. UFLA, Lavras – MG, 2006.

Em relação à coloração de colônias, isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* apresentaram coloração roxa distinta das colônias das demais espécies de *Fusarium* (Figura 6).

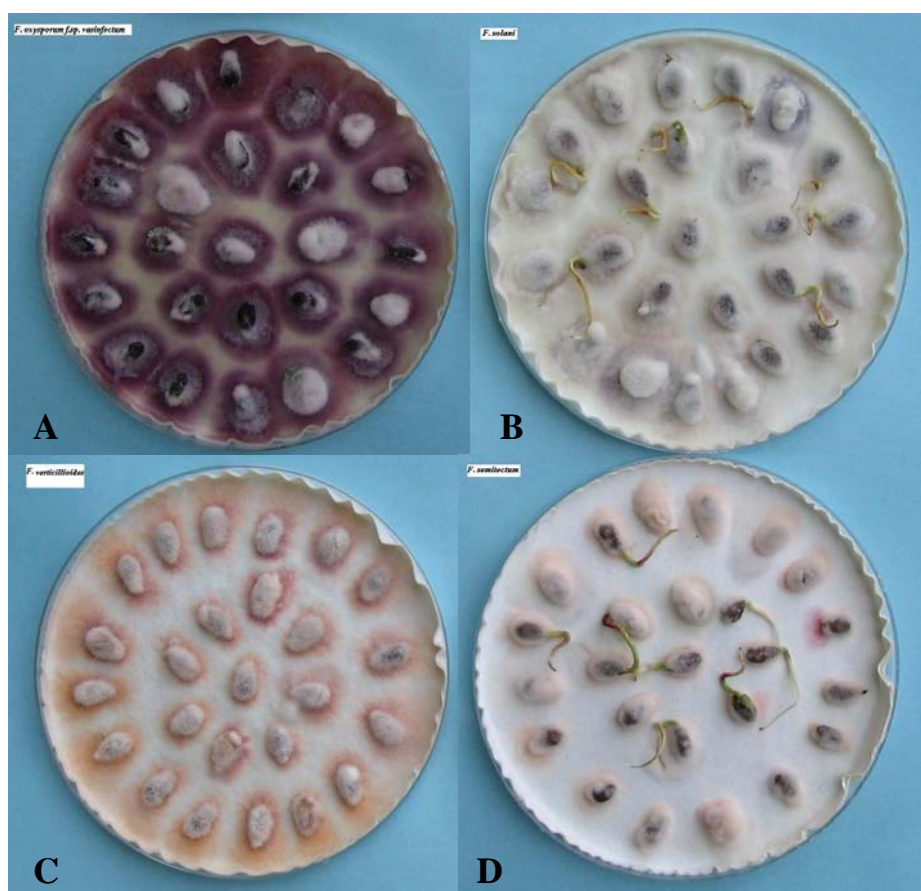


FIGURA 6 – Incidência e colorações típicas de cada isolado em substrato contendo papel de filtro + quitozene, incubados a 20°C, por sete dias com fotoperíodo de 12 h. (A) *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (B) *F. solani* (C) *F. verticillioides* (D) *Fusarium semitectum*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Quanto à ocorrência de outras espécies de *Fusarium*, não houve diferença significativa entre os substratos para a avaliação de porcentagem de incidência de *F. verticillioides* (CML 0567) (Tabela 11). Com exceção dos substratos umedecidos com o meio DG-18 diluído e o extrato de sementes de algodão, a incidência deste fungo nas sementes foi de 100%.

Para *F. semitectum*, a maior incidência foi observada nos substratos umedecidos com quintozene e BDA + iprodione, diluídos, sendo que estes não diferiram estatisticamente dos substratos umedecidos com BDA e 2,4-D em calda agarizada (Tabela 11). No entanto, somente o substrato umedecido com quintozene não apresentou a presença de *Rhizopus* sp.

Com relação a *F. solani*, os substratos umedecidos com quintozene, BDA + iprodione e 2,4-D em calda agarizada, resultaram em 100% de incidência dos mesmos (Tabela 11), sendo facilmente observadas gotículas de coloração branco-leitosa e brilhante sobre as sementes.

TABELA 11 – Incidência (%) de *Fusarium* spp. em testes de sanidade com diferentes substratos, inoculadas pelo método de imersão das sementes em suspensão de conídios (método 1) e incubadas a 20°C, com 12h de luz/12h de escuro, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Substratos	<i>Fusarium</i> spp.		
	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>F. solani</i>
2,4 - D	100,0 a	88,0 ab	100,0 a
BDA	100,0 a	88,0 ab	91,0 ab
BDA + Iprodione	100,0 a	94,0 a	100,0 a
DG – 18	97,0 a	73,0 b	97,0 ab
Quintozene	100,0 a	99,0 a	100,0 a
Extrato de sementes algodão	92,0 a	46,0 c	90,0 b

Médias com mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Em estudos de isolamento e identificação de *Fusarium solani* f.sp. *glycines* do solo, o meio de Nash & Snyder foi modificado pelo aumento da quantidade de quintozene (PCNB), conseguindo-se colônias típicas deste patógeno. No entanto, devido a sua similaridade com *F. solani* f.sp. *phaseoli*, não foi possível distinguí-los neste meio, sendo necessário fazer o teste de patogenicidade (Cho et al., 2001).

Com base nos resultados do presente trabalho, sugere-se que o substrato contendo papel de filtro umedecido em quintozene (PCNB) seja utilizado na detecção precisa e segura de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, assim como na detecção de outras espécies de *Fusarium*.

4.3.1 Verificação da eficácia do método de detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, contendo quintozene, em sementes provenientes de flores inoculadas

De duzentas sementes provenientes de inoculação nas flores, avaliadas pelo método do papel de filtro umedecido com quintozene diluído, para detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, apenas seis apresentaram incidência deste patógeno, o que corresponde a 3,0% de incidência (Figura 6). Demais espécies não foram computadas pela baixa incidência de estruturas desenvolvidas nas sementes.

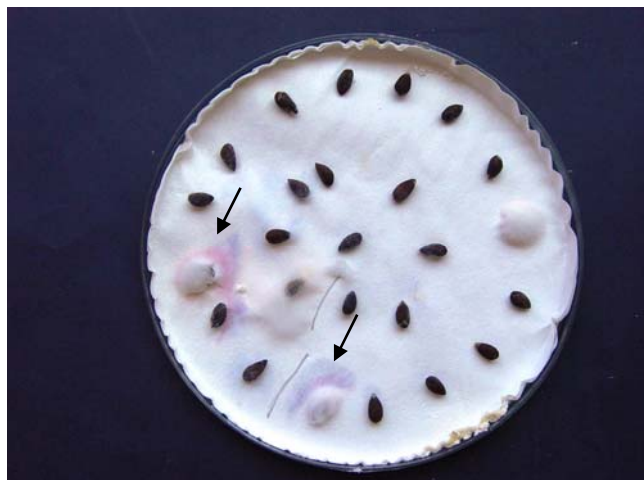


FIGURA 6 – Incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodão provenientes de inoculação em flores, produzidos em casa-de-vegetação e submetidas ao teste de sanidade pelo método do papel de filtro + quintozene e incubadas a 20°C, fotoperíodo de 12h, por sete dias. UFLA, Lavras – MG, 2006.

Mesmo com uma ocorrência numérica baixa deste patógeno em sementes, o substrato contendo quintozene foi capaz de detectar com eficácia a presença de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. De certa forma, esta baixa incidência indica que *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* é um fungo que ocorre em baixos índices nas sementes de plantas infectadas naturalmente no campo.

5 CONCLUSÕES

1. O método de inoculação pela imersão das sementes na suspensão de conídios por 10 minutos, seguido de incubação em substrato de papel com restrição hídrica de $-1,0$ MPa, foi o mais eficaz na obtenção de sementes infectadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.
2. O período de 50 h de contato das sementes com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em substrato com restrição hídrica foi capaz de produzir 27-29% de sementes infectadas, sem afetar sua qualidade fisiológica. Com o aumento do período de exposição das sementes ao fungo, o índice de doença aumenta de forma linear até o período de 120h.
3. O uso do substrato contendo quitozina permite detectar com segurança e eficácia a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1987. v.1, 175 p.

ALBUQUERQUE, M. C. F. **Desempenho germinativo e testes de vigor para sementes de girassol, milho e soja, semeadas sob condições de estresse ambiental**. 2000. 161 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção e Tecnologia de Sementes) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

ALI, H.; SUMMERELL, B. A.; BURGESS, L. W. An evaluation of three media for the isolations of *Fusarium*, *Alternaria* and other fungi from sorghum grain. **Australasian Plant Pathology**, Australia, v.20, n.4, p. 134-138, 1991.

ATKINSON, G. F. Some diseases of cotton. **Alabama Agricultural Experiment. Station**, III. Frenching, v. 41p. 19-29, 1892.

BALL, S.; REEVES, J. Application of rapid techniques to seed health testing – prospectus and potential. In: Duncan, J. M.; Torrance, L. (Ed) **Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens**. Oxford: Blackwell Scientific, 1992.

BALMER, E.; SALGADO, C. L.; CIA, E.; CAMPOS, H. Efeito do potencial de inóculo de *Colletotrichum gossypii* South. sobre o tratamento das mudinhas do algodoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 23, p. 325-338, 1966.

BEDENDO, I. P. Doenças vasculares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 44, p. 838-847.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 1992. 360 p.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for fusarium research**. 3. ed., Sydney, University of Sydney, 1994. 133 p.

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A. Q. Diagnose e controle de doenças de algodão. Cuiabá: UFMT/FAMEV, 2000. 55 p.

CELANO, F. A. O. **Desempenho de sementes de algodão durante o armazenamento, após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica de restrição hídrica**. 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHIAVEGATO, E. J. Importância potencial de doenças do algodoeiro nas regiões produtoras do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3., 2001, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande: EMBRAPA/UFMS, 2001.

CHIOCCHETTI, A.; SCIAUDONE, L.; DURANDO, F.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* on basil. **Plant Disease**, v. 85, p. 607-611, jun, 2001.

CHO, J. H.; RUPE, J. C.; CUMMINGS, M. S.; GBUR JR, E. E. Isolation and identification of *Fusarium solani* f.sp. *glycines* from soil on modified Nash and Snyder's medium. **Plant Disease**, v. 85, n. 3, p. 256-260, mar, 2001.

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Controle das doenças do algodoeiro. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 5., 2001, Lavras. **Palestras...** Lavras: UFLA-DFP-NEFIT, 2005.

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. (Ed.) **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Potafós, 1999. p. 121-131.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 33-48.

COLYER, P. D. Pathogenicity of *Fusarium* species associated with cotton seedlings diseases in Northern Louisiana. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 1093, 1986.

COSTA, M. L. N. **Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro por meio da restrição hídrica.** 2000. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARAES, R. M.; POZZA, E. A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, 2003.

COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARÃES, R. M.; POZZA, E. A.; ORIDE, D. Efeito de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* no desempenho de sementes de feijoeiro infectadas artificialmente. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7, 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002. p. 42.

COUTINHO, W. M.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M.; FERREIRA, D. F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio agar-água. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

DAVIS, R. G. *Fusarium* species in the internal microflora of Mississippi cottonseed. **Seed Science and Technology**, v. 5, p. 587-591, 1977.

DESLANDES, J. A. A “murcha” ou “queima” do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, v. 13, n. 10/11/12, p. 511-514, 1938.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FUZATTO, M. G.; CARVALHO, L. H.; CIA, E.; SILVA, N. M.; CHIAVEGATO, E. J.; LÜDERS, R. R. Algodão (*Gossypium hirsutum* L.). In: FAHL, J. I. et al. (Coord.). **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 6. ed. Campinas: IAC, 1998. (Boletim, 200).

GOULART, A. C. P. Principais fungos transmitidos pelas sementes de soja, feijão, milho e algodão. **Correio Agrícola**, São Paulo, n.2, p. 18-21, 1995.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes de algodão com fungicidas para controle do tombamento causado por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 247. 1998. Suplemento.

GUIMARÃES, R. M. **Efeito do condicionamento osmótico sobre a germinação e desempenho de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob condições ideais e de estresse térmico, hídrico e salino.** 1991. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

HALFON-MEIRI, A.; VOLCANI, Z. A combined methos for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 5, p. 129-139, 1977.

HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. B. Problemas na avaliação de germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* spp. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 2, n. 3, p. 9-22. 1980.

HILLOCKS, R. J. Infection of cotton seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton varieties resistant or susceptible to Fusarium Wilt. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 60, p. 141-143, 1982.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**, Bassersdorf, CH-Switzerland, ISTA, 2002. 138 p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION – ISTA. Seed health testing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 4, n. 1, p. 152-155, 1976.

JULIATTI, F. C.; RUANO, O. Algodão (*Gossypium hirsutum* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM L. (Ed.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. v. 2, p. 555-558, 1997.

KRUG, H. P. Fusarium como causador da murcha do algodoeiro no Brasil. **Rodriguésia**, v. 2, p. 319-321, 1936 (Edição especial).

LIMA, E. F.; CARVALHO, L. P.; CARVALHO, J. M. F. C. Comparação de métodos de análise sanitária e ocorrência de fungos em sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, p. 401-406, 1982.

LOPES, H. M.; FONTES, P. C. R.; MARIA, J.; CECON, P. R.; MALAVASI, M. M. Germinação e vigor de sementes de cebola (*Allium cepa* L.) influenciados pelo período e temperatura de condicionamento osmótico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 2, p. 173-179, 1996.

MACHADO, A. Q.; CASSETARI NETO, D; GUERRA, W. D. Primeiro relato de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) no estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, Suplemento, p. 215, 2003.

MACHADO, A. Q. Fusariose do algodoeiro: situação atual da doença no centro-oeste. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 5., 2005, Lavras. **Palestras...** Lavras: UFLA-DFP-NEFIT, 2005

MACHADO, A. Q.; MACHADO, J. C. Estudo da relação entre o potencial de inóculo de *Fusarium verticillioides* (syn. *F. moniliforme*) e o desempenho de sementes de milho por meio da técnica de restrição hídrica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7, 2002, Sete lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002. p. 453.

MACHADO, A. Q. Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. 2002. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MACHADO, J. C.; GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; SOUZA, R. M. Use of water restriction technique in seed pathology. In: ISTA / PDC SYMPOSIUM, 4., Wageningen - The Netherlands. Apr/May 2002.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. Adequação do teste de sanidade (“blotter test”) visando detecção de fungos em sementes de algodoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 7., 1994, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá: EMBRAPA, 1994. p. 97.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. General incubation methods for routine seed health analysis. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. (Ed). **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**. Bassersdorf, CH-Switzerland: ISTA, 2002. p. 48-80.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton. In: PLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, 1., Ottawa: ISTA, 1993. p. 48-58.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.

- MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de sementes**, v. 26, n. 4, p. 62-67, 2004.
- MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 229-263. 1994.
- MACHADO, J. C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106 p.
- MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed). **Sementes**: qualidade fitossanitária. Viçosa: UFV-DFP, 2005. Cap. 13, p. 375-398.
- MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.
- MAGALHÃES, F. H. L. **Restrição hídrica em patologia de sementes**: novas aplicações. 2005. 131 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr., 1962.
- MANN, R. S. **Diversidade do complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares**. 146 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG. 2002.
- McGEE, D. C. Principles advantages and limitations of seed health testing methods. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD FILHO, D. S. **Seed-borne fungi**: a contribution to routine seed health analysis. Bassersdorf, CH-Switzerland, ISTA, 2002. p. 2-8.
- McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-219, nov. 1923.
- MENDONÇA, M.; ALVES, G. Microflora of cottonseed in Mozambique. **Agronomia Moçambicana**, Moçambique, v. 7, n. 4, p. 207-210, 1973.

MENEZES, M.; BEZERRA, J. L.; RAMOS, R. L. B. Microflora fúngica de sementes de quatro cultivares de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, p. 129, 1979.

MENTEN, J. O. M. Testes de sanidade de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 1., 1988, Piracicaba. **Palestras...** Piracicaba: FEALQ, 1988. 76 p.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Jan./Feb. 1995.

NASCIMENTO, S. R. C.; KUROSZAWA, O. C.; MARINGONI, O. C. Avaliação de raças fisiológica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 214-217, 1995.

NASH, S. M.; SNYDER, W. C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. **Phytopathology**, v. 52, p. 567-572, 1962.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2. ed. London: McMillan Press, 1979. 1190 p.

NELSON, P. E. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: Mace M. F., et al. (Ed.) **Fungal wilt diseases of plants**. New York: Academic Press, 1981. p. 51-80.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium specie: illustrated manual for identification**. London. Ed. Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

PIZZINATTO, M. A.; MENTEN, J. O. M. Patogenicidade de oito espécies de *Fusarium*, isoladas de sementes, às plântulas de algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 17, p. 124-134, 1991.

PIZZINATTO, M. A.; SOAVE, J.; CIA, E. Levantamento de patógenos em sementes de seis cultivares de algodoeiro em diferentes localidades no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p. 101-109, 1984.

PIZZINATTO, M. A. Testes de sanidade de sementes de algodão. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. (Ed). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap. 13, p. 331-346.

PRADO, P. E. R.; MACHADO, J. C.; CARVALHO, E. M.; SOUSA, M. V. Eficácia do tratamento químico de sementes de algodão em relação ao potencial de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002. p. 52.

PRASAD, T. Detection of fungi in stored grains and estimations of mycotoxins. In: MATHUR, S. B.; JORGENSEN, J. (Ed) **Seed Pathology**, Copenhagen, 1982, p. 175-181.

SANTOS, A. C. K. S. *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro: detecção, inoculação artificial e controle químico. 1995. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SILVA, V. A. S.; JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F. C. Reação de genótipos de *Gossypium hirsutum* à murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*). **Revista Horizonte Científico**, Uberlândia, v.1, n. 4, 2005. Disponível em: <<http://www.propp.ufu.br/revistaelectronica/edicao2005/vida2005/reacao.PDF>> Acesso em 10 dez 2005.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopathology**, v. 44, p. 338-342. 1953.

SOAVE, J. PIZZINATTO, M. A.; TANAKA, M. A. S.; DO AMARAL, H. M.; BARRETO, N.; BRUNO, R. A.; LEÃO, M. F.; MENTEN, J. O. M.; RUANO, O.; URBEN, A. F. Testes comparativos de sanidade de sementes de algodoeiro realizados no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.2, p. 119-123, 1992.

SOUSA, M. V.; MACHADO, J. C.; ORIDE, D.; PRADO, P. E. R. Metodologia de infecção artificial de sementes de algodão por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002. p. 70.

TADANO, M. **Padrões fitossanitários nas sementes – Proposta de Regulamentação**. Diário Oficial da União, N° 3, terça-feira, 6 de janeiro de 2004.

TANAKA, M. A. S. Doenças do algodoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 8, p. 70-73, 1982.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 125, 1988.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, p. 218-226, 1991.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANNO, M. I. A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v. 15, p. 232-237, 1989.

TANAKA, M. A. S.; PAOLINELLI, G. P. Avaliação sanitária e fisiológica de sementes de algodão produzidas em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 1, p. 71-81, 1984.

TANAKA, M. A. S. Patógenos causadores de tombamento do algodoeiro e seus efeitos sobre a germinação das sementes em diferentes temperaturas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 29-33, mar. 1994.

TANAKA, M. A. S. Transmissão planta-semente e semente-plântula do agente causal da ramulose do algodoeiro. In: MENTEN, J. O. M. **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/FEALQ, 1995. p. 171-178.

TÓFFANO, W. B. A “fusariose” do algodoeiro e o comportamento das variedades do I.A.C. **O Biológico**, v. 29, n. 5, p. 92-96. 1963.

VALARINI, P. J.; MENTEN, J. O. M. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e a germinação. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 17, n. 3/4, p. 227-231, Jul/Dez. 1991.

VIEIRA, M. G. G. C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). 114 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 1996.

VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Applicability of molecular techniques for detection of seed-borne fungi under certification. In: MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J.; JACCOUD FILHO, D.S (Ed). **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**. Zürich: ISTA, 2002, p. 80-89.

VILELA, M.; PRADO, P. E. R.; MACHADO, J. C.; CARVALHO, E. M. Detecção de *Fusarium oxysporum* em sementes de feijão e algodão por meio de substrato seletivo: avaliações preliminares. In: CICESAL, 17., 2004, Lavras. **Resumos...** Lavras:UFLA/FAEPE, 2004. p. 253.

WATKINS, G.M. (Ed.) **Compendium of cotton diseases**. St. Paul: APS Press, 1981. 87p.

ANEXOS A

	Página	
TABELA 1A	Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência e severidade de murcha de fusarium em plântulas provenientes de sementes inoculadas pelo método de imersão de raízes em suspensão de conídios. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	63
TABELA 2A	Resumo da análise de variância dos dados percentuais referentes ao índice de doença de plântulas e germinação de sementes, provenientes de sementes de algodoeiro inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> . UFLA, Lavras, MG, 2006.....	63
TABELA 3A	Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), estande final, altura e índice de doença de plântulas (ID), provenientes de sementes de algodoeiro inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> . UFLA, Lavras, MG, 2006.....	64
TABELA 4A	Análise de variância dos dados referentes à incidência de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> provenientes de sementes de algodão inoculadas com três diferentes métodos, a 20°C com fotoperíodo de 12 h, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	64
TABELA 5A	Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), estande final, altura e índice de doença de plântulas (ID), provenientes de sementes de algodão inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> pelo método de imersão em suspensão de conídios, em diferentes tempos de exposição. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	65
TABELA 6A	Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência e coloração roxa do micélio de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> provenientes de sementes de algodão inoculadas pelo método de imersão na suspensão de conídios e incubadas em diferentes substratos, a 20°C, fotoperíodo de 12 h, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	66

TABELA 7A	Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência de <i>Fusarium</i> spp. provenientes de sementes de algodão inoculadas pelo método de imersão em suspensão de conídios (método 1) e incubadas em diferentes substratos a 20°C, fotoperíodo de 12 h, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.....	66
-----------	---	----

TABELA 1A - Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência e severidade de murcha de fusarium em plântulas provenientes de inoculação pelo método de imersão de raízes em suspensão de conídios. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM's e Significância	
		Incidência (%)	Severidade (%)
Isolado	8	8427,4653 *	2421,6319 *
Bloco	3	4,7778 ns	8,3333 ns
Erro	24	4,5486	7,8542
CV (%)		4,51	12,97

* = teste F significativo a 5%; ns = teste F não significativo a 5%.

TABELA 2A - Resumo da análise de variância dos dados percentuais referentes ao índice de doença em plântulas e germinação de sementes, provenientes de sementes de algodoeiro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM's e Significância	
		Germinação (%)	ID (%)
MI	2	82,5972 ns	384,5000 *
Isolado	5	9285,1556 *	11726,8333 *
MI x Isolado	10	436,6306 *	129,7833 *
Erro	3	69,1944	65,1667
CV (%)		21,64	18,30

* = teste F significativo a 5%; ns = teste F não significativo a 5%.

TABELA 3A - Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), estande ao final de 21 dias, altura e índice de doença em plântulas (ID), provenientes de sementes de algodoeiro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM's e Significância			
		IVE	Est. Final	Altura	ID (%) ¹
MI	2	3,0200 ns	312,3889 *	3,0193 *	0,3668 ns
Isolado	5	6,4787 *	792,7222 *	3,2625 *	8,4321 *
MI x Isol.	10	0,9712 ns	70,2556 ns	1,4571 ns	0,2937 ns
Bloco	3	0,3802 ns	6,8704 ns	2,1046 *	0,8658 *
Erro	51	1,3825	51,9292	0,7303	0,2467
	CV (%)	14,99	10,44	11,62	20,06

* = teste F significativo a 5%; **ns** = teste F não significativo a 5%.

¹ = dados transformados para $(x + 1)^{1/2}$

TABELA 4A - Análise de variância dos dados referentes à incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* provenientes de sementes de algodão inoculadas com três diferentes métodos, a 20°C com fotoperíodo de 12 h, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Met. Inoc (MI)	2	13,9912	6,9956	4,01*
Isolados	5	340,5305	68,1061	39,01*
MI x Isolados	10	37,8600	3,7860	2,17 *
Bloco	3	18,5172	6,1724	3,54 *
Erro	51	89,0460	1,7460	

CV = 20,89%; * = teste F significativo a 5%; **ns** = teste F não significativo a 5%.

TABELA 5A - Resumo da análise de variância dos dados referentes ao índice de velocidade de emergência (IVE), estande ao final de 21 dias, altura e índice de doença em plântulas (ID), provenientes de sementes de algodão inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* pelo método de imersão em suspensão de conídios (método 1), em diferentes tempos de exposição. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM's e Significância			
		IVE	Est. Final	Altura	ID (%)
MI	2	5,6397 *	88,7111 *	1,9364 ns	29,2053 *
Tempo	4	21,9925 *	544,7222 *	11,7335 *	73,1751 *
Inoc	1	55,3504 *	1269,3778 *	4,1388 *	2289,1690 *
MI x Tempo	8	2,0625 *	28,4889 *	0,1949 ns	6,3031 ns
MI x Inoc	2	6,3468 *	104,7111 *	0,5444 ns	29,2053 *
Tempo x Inoc	4	61,2884 *	364,7667 *	0,7613 ns	73,1751 *
MI x Tempo x Inoc	8	2,1770 *	18,6833 *	0,1315 ns	6,3031 ns
Bloco	2	0,5762 ns	13,6444 *	4,9841 *	7,8190 ns
Erro	58	0,6637	5,9433	0,6595	2,9969
CV (%)		7,43	6,06	7,86	6,91

* = teste F significativo a 5%; **ns** = teste F não significativo a 5%.

TABELA 6A - Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência e coloração roxa do micélio de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* provenientes de sementes de algodão inoculadas pelo método de imersão na suspensão de conídios (met.1) e incubadas em diferentes substratos, a 20°C, fotoperíodo de 12 h, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM's e Significância	
		Incidência Fov (%)	Coloração Roxa (%)
Substrato	5	3294,2444 *	6045,1093 *
Isolado	5	30,657,9778 *	29645,6639 *
Substrato x Isolado	25	551,8978 *	1450,1312 *
Erro	108	66,0370	140,6390
CV (%)		11,74	17,64

* = teste F significativo a 5%; ns = teste F não significativo a 5%.

TABELA 7A - Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência de *Fusarium* spp. provenientes de sementes de algodão inoculadas pelo método de imersão em suspensão de conídios (método 1) e incubadas em diferentes substratos a 20°C, fotoperíodo de 12 h, por sete dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM'S e Significância		
		INCIDÊNCIA		
		F. verticillioides (CML 0567)	F. semitectum	F. solani (CML 0576)
Substrato	5	42,2667 ns	1503,4667 *	87,4667 *
Erro	18	18,4444	54,6667	16,4444
CV (%)		4,37	9,09	4,21

* = teste F significativo a 5%; ns = teste F não significativo a 5%.

ANEXO B

	Página
TABELA 1B	
Qualidade sanitária de sementes de algodão da cultivar Delta Opal, safra 2003/2004, produzidas no município de Rondonópolis, MT. Lavras, MG, 2006.....	68
TABELA 2B	
Custo, aproximado, dos métodos de detecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> em testes de sanidade por 1 Litro de meio modificado para 2% de ágar, acrescido de 71,3 g manitol, relacionado à sensibilidade para detecção da incidência do patógeno. UFLA, Lavras - MG, 2006.....	68

TABELA 1B. Qualidade sanitária de sementes de algodão da cultivar Delta Opal, safra 2003/2004, produzidas no município de Rondonópolis, MT. Lavras, MG, 2006.

Microrganismo	Incidência (%)
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	0,5
<i>Phoma</i> sp.	0,5
<i>Fusarium semitectum</i>	10,0
<i>Fusarium verticillioides</i>	5,0
<i>Aspergillus</i> sp.	30,5
<i>Penicillium</i> sp.	40,5
Trichoderma sp.	1,0

TABELA 2B – Custo, aproximado, dos métodos de detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em testes de sanidade por 1 Litro de meio modificado para 2% de ágar, acrescido de 71,3 g manitol, relacionado à sensibilidade para detecção da incidência do patógeno. UFLA, Lavras - MG, 2006.

Papel de filtro + substratos	Custo em R\$ (aproximado)/ L de meio	Incidência do patógeno (%)*
Quintozene	16,00	98,6
BDA	8,80	94,6
BDA + iprodione	9,00	86,4
2,4-D	2,65	59,2
DG-18	14,00	77,4
Extrato de sementes de algodão	9,00	82,0

* Média da incidência de todos os isolados usados neste trabalho.