

ELIZABETH DE OLIVEIRA

ASPECTOS PATOLÓGICOS DE *Botryodiplodia theobromae* Pat.
EM RELAÇÃO A SEMENTES DE ALGODOEIRO
(*Gossypium hirsutum* L.)

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras como parte das exigências do curso de Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador:

Prof. JOSÉ DA CRUZ MACHADO

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

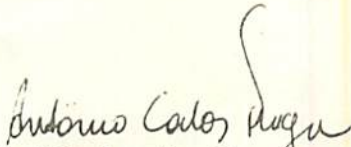
1994

ELIZABETH DE OLIVEIRA

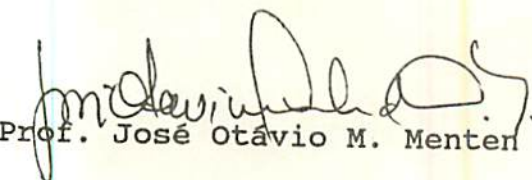
**ASPECTOS PATOLÓGICOS DE *Botryodiplodia theobromae* Pat. EM RELAÇÃO
A SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.)**

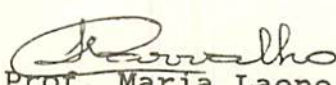
Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura de Lavras, como parte das exigências
do Curso de Agronomia, área de concentração em
Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

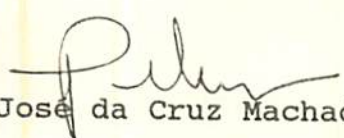
APROVADA em 27 de junho de 1994.


Prof. Antônio C. Fraga

Maria A. Souza Tanaka
Pesq. Maria Aparecida S. Tanaka


Prof. José Otávio M. Menten


Prof. Maria Laene M. Carvalho


Prof. José da Cruz Machado
Orientador

AGRADECIMENTOS

Meu eterno agradecimento,

à Escola Superior de Agricultura de Lavras, pelos ensinamentos;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo apoio ao projeto de pesquisa;

aos produtores de sementes de algodoeiro do Estado de Minas Gerais, ao Dr. Julio Pedro Laca-Buendia, pesquisador da EPAMIG - MG e ao IAPAR - PR, pelo fornecimento de amostras de sementes utilizadas neste estudo;

ao professor José da Cruz Machado, pela orientação e valiosos ensinamentos na área de fitopatologia;

aos professores Maria Laene M. Carvalho, Janice Guedes Carvalho, Maria das Graças G. C. Vieira, Mozart Martins Ferreira e Antônio Carlos Fraga, pelas imprescindíveis informações e sugestões apresentadas durante a condução do estudo;

ao professor José Otávio M. Menten e à pesquisadora Maria Aparecida S. Tanaka pela participação na banca examinadora;

aos estudantes e amigos: em especial a Gladys A. F. de Andrade, bolsista de iniciação científica do CNPq, que participou e colaborou em todas as etapas de realização do trabalho; à Liliana A. A. Pereira pelo auxílio na condução de experimentos, à Denise G. Santana, pelo auxílio nas análises estatísticas e ao Santiago J. M. Baroffio e ao Eduardo S. Marques pelo auxílio na digitação do manuscrito;

aos funcionários das Coordenadorias de Pós-graduação e de Pesquisa, da Biblioteca, Gráfica, Laboratórios e Secretarias dos Departamentos de Fitossanidade e Fitotecnia e em especial à laboratorista Ana Maria dos Santos, pelo indispensável apoio;

ainda, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que o trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

	Página
Capítulo 1. INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
Capítulo 3. OCORRÊNCIA E SOBREVIVÊNCIA DE <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat. EM SEMENTES DE ALGODOEIRO (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) PRODUZIDAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS	22
Capítulo 4. EFEITOS E TRANSMISSIBILIDADE ÀS SEMENTES DE <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat. EM ALGODOEIRO (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	41
Capítulo 5. TRANSMISSIBILIDADE E EFEITOS DE <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat. A PARTIR DE SEMENTES DE ALGODOEIRO (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	66
Capítulo 6. SOBREVIVÊNCIA DE <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat. ASSOCIADA A SEMENTES DE ALGODOEIRO (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) NO SOLO	91
Capítulo 7. SENSIBILIDADE DE <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat. A FUNGICIDAS "IN VITRO" E INCORPORADOS A SEMENTES DE ALGODOEIRO (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	104
Capítulo 8. DISCUSSÃO GERAL	122

Capítulo 1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Apesar da importância da cultura algodoeira como atividade produtiva, no contexto da agricultura nacional e da posição de destaque do Brasil em relação à produção mundial de algodão em pluma, nos últimos 10 anos, a área cultivada em suas principais regiões produtoras foi drasticamente reduzida. De 1,221 milhões de hectares em 1984, a área plantada no Centro-Sul foi reduzida a apenas 653 mil ha, na safra 93/94 (Blecher, 1994). Entre vários fatores determinantes desta redução, inclui-se também a necessidade de aprimoramento de tecnologias para maior produtividade do algodoeiro. Neste contexto, a qualidade física, fisiológica e sanitária das sementes desta cultura tem sido objeto de preocupações. A exemplo do que ocorre com 90% das culturas destinadas à alimentação humana em todo o mundo, propagadas por semente verdadeira, a condição deste insumo é fundamental para a obtenção de produções economicamente viáveis.

Com maior ênfase a partir da década de 80, várias publicações têm mostrado a ocorrência de muitas espécies de fungos em associação com sementes de algodoeiro, produzidas em diversas regiões do país e também os efeitos de algumas dessas espécies sobre a germinação das sementes e transmissibilidade às plântulas (Bueno, 1986; Pizzinatto, 1988; Tanaka, 1990).

Face à importância das doenças cujos agentes causais são transmissíveis por sementes, recentemente, a comunidade científica, através da Associação Brasileira de Tecnologistas de Sementes, propõe o estabelecimento de padrões de tolerância para alguns destes patógenos em sementes básicas e certificadas/fiscalizadas do algodoeiro (Proposta...1992). O estabelecimento destes padrões constitui certamente um passo importante para um maior controle da qualidade sanitária dentro dos programas de produção de sementes, evitando riscos de epidemias e de

outros tipos de danos que têm se constituído em obstáculos para um aumento de produtividade na cultura algodoeira.

Dentre os fungos patogênicos encontrados em sementes de algodoeiro, no Brasil, *Botryodiplodia theobromae* distingue-se por sua frequência de ocorrência relativamente alta na região do Triângulo, no Estado de Minas Gerais (Sobreira, 1988). Este patógeno, típico das regiões tropicais e subtropicais, onde causa sérios prejuízos a numerosas espécies vegetais cultivadas (Punithalingan, 1976), é relatado no algodoeiro apenas como agente causal da podridão das maçãs (Bagga, 1970), sendo pouco estudado quanto às implicações de sua associação às sementes desta cultura.

Considerando-se estes aspectos, estabeleceu-se como objetivos neste estudo, em diferentes etapas, avaliar: 1 - a ocorrência de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro produzidas no Estado de Minas Gerais; 2 - sua sobrevivência em sementes armazenadas; 3 - efeitos sobre plantas e sementes; 4 - transmissibilidade e sobrevivência associada a sementes e 5 - sensibilidade a fungicidas "in vitro" e incorporados a sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGGA, H.S. Pathogenicity studies of organisms involved in the cotton boll-rot complex. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, n.1, p.158-60, jan. 1970.
- BLECHER, B. Safra bate recorde apesar do governo. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 31 mar. 1994. Guia da Safra 94: especial A-1, p. 4-5.

- BUENO, J.T. **Influência de genótipo e local de produção na incidência de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado do Paraná.** Piracicaba: ESALQ, 1986. 99p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- PIZZINATTO, M.A. **Relação entre densidade e qualidade de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. var. *Latifolium* Hutch) e patogenicidade de *Fusarium* spp.** Link ex. Fr. Piracicaba, ESALQ, 1988. 122p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- PROPOSTA de níveis de tolerância de patógenos para programa de certificação de sementes no Brasil. In: WORKSHOP BRASILEIRO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES, 1, LAVRAS, 1991. **Diretrizes...** Lavras: ABRATES, 1991.n.p.
- PUNITHALINGAN, E. *Botryodiplodia theobromae*. s.l., 1976. (CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 519).
- SOBREIRA, D.G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais.** Lavras, ESAL, 1988. 70p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro.** Piracicaba, ESALQ, 1990. 111p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).

Capítulo 2. REFERENCIAL TEÓRICO

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Ocorrência de fungos em associação com sementes de algodoeiro.

A associação de patógenos com sementes constitui para os primeiros um mecanismo eficiente de sobrevivência e dispersão na natureza, sendo esta via utilizada por um número significativo de agentes causais de doenças importantes em plantas cultivadas. Os patógenos permanecem geralmente viáveis por períodos de tempo mais prolongados em associação com sementes de seus hospedeiros, comparado a sua sobrevivência em outro órgão vegetal ou isoladamente no solo. Isto é particularmente verdadeiro na condição de dormência das sementes, sendo conhecidos poucos exemplos nos quais o patógeno morre ou é inativado antes que a viabilidade das sementes seja seriamente reduzida. Assim, esta associação determina o prolongamento do período potencial de transmissão e as sementes constituem por conseguinte uma forma eficaz de introdução aleatória do patógeno no campo, estabelecendo numerosos focos de infecção primária. Associam-se também às sementes, muitos microorganismos agentes de deterioração das mesmas durante períodos de armazenagem e ainda outros saprófitas. Dentre os grupos de agentes que podem se associar às sementes, os fungos predominam em número e diversidade e são de forma geral referidos em duas categorias: o grupo patogênico de campo e o grupo de armazenamento, levando-se em consideração os tipos de danos e os aspectos ecológicos em que podem atuar (Baker e Smith, 1966; Neergard, 1979; Machado, 1980, Machado, 1988).

Richardson (1990) em publicação editorada pela ISTA, relata 19 gêneros de fungos que podem ocorrer em sementes de algodoeiro, incluindo várias espécies patogênicas da fase de

campo e outras de armazenamento. Relata também espécies cujo grau de associação com esta oleaginosa ainda é desconhecido.

Dentre os fungos patogênicos de importância econômica, que podem ser veiculados por sementes de algodoeiro, destacam-se as espécies *Colletotrichum gossypii* South. e *C. gossypii* South. var. *cephalosporioides* A. S. Costa (= *Glomerella gossypii* (South.) Edg.), agentes causais das doenças denominadas antracnose e ramulose do algodoeiro, respectivamente, e que também podem causar tombamento de plântulas e apodrecimento de frutos (Kimati, 1980). Estes dois patógenos são transmitidos principalmente via sementes e apresentam grande variação fisiológica e patogênica, dentro de cada espécie, enquanto diferentes genótipos de algodoeiro podem apresentar variação na resistência aos mesmos (Tanaka, 1990; Tanaka, 1991). Entre os causadores de murcha são destaques *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen e *Verticillium* spp. Espécies no gênero *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Ascochyta gossypii* Syd., *Botryodiplodia theobromae* Pat. e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. são os mais importantes dentre muitas espécies que podem causar o tombamento de plântulas e/ou a podridão das maçãs do algodoeiro. Ainda espécies de *Alternaria* e *Ascochyta gossypii* são causadoras de manchas foliares (Kimati, 1980; Watkins, 1981; Pizzinato, 1987; Pizzinato, 1988).

Inúmeras espécies de fungos consideradas em geral saprófitas, comumente encontradas em sementes de algodoeiro, podem ser correlacionadas à baixa qualidade destas. Por exemplo, algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Alternaria* podem deteriorar as sementes desta planta durante o armazenamento, sendo este dano maior sob condições de temperatura e umidade favoráveis à sua proliferação (Lima et al, 1984; Pizzinato,

1988; Menezes et al, 1982a). Ainda, *Aspergillus* e *Rhizopus* podem causar manchas nas fibras do algodão, depreciando sua qualidade (Cia, 1977).

De maneira geral, informações de literatura indicam que numerosos são os fungos constatados em sementes de algodoeiro no Brasil. Neste sentido a Tabela 1 reúne os gêneros e espécies citados por referências bibliográficas.

Algumas das publicações referidas na Tabela 1, limitam-se a informar os gêneros e ou espécies de fungos encontradas nas sementes, enquanto outras relatam suas frequências e níveis de ocorrência em função de métodos utilizados para detecção, da presença e ausência de linter nas sementes, de cultivares e de locais de produção, em diferentes Estados do Brasil. Desta forma, torna-se difícil generalizar dados quantitativos sobre a ocorrência de tais fungos em sementes de algodoeiro nas várias regiões produtoras do país. Apesar disto, em duas avaliações desta natureza, realizadas no Estado de Minas Gerais, observa-se que o patógeno, *B. theobromae* não foi encontrado em amostras de sementes de algodoeiro na safra 80/81, ocorreu em 3,6% das amostras analisadas na safra 81/82 (Tanaka e Paolinelli, 1984) e na safra 85/86 foi detectado com frequência de 13,15 a 78,94%, variável em função da proveniência das amostras e dos métodos de detecção utilizados (Sobreira, 1988). Estes relatos sugerem aumento na incidência de *B. theobromae* nos cultivos de algodoeiro do Estado de Minas Gerais.

TABELA 1. Gêneros e espécies de fungos citados na literatura, que podem ocorrer em sementes de algodoeiro produzidas no Brasil.

Fungos (referências*)	Fungos (referências*)
<i>Alternaria alternata</i> (10)	<i>Chaetomium</i> spp. (2, 4, 7, 8)
<i>Alternaria macrospora</i> (13)	<i>Cladosporium</i> spp. (2, 4, 6, 7, 8, 10)
<i>Alternaria</i> spp. (1, 2, 3, 4, 8, 10)	<i>Colletotrichum gossypii</i> (2, 8, 10, 13)
<i>Alternaria tenuis</i> (2, 6, 7, 8)	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> (11, 12, 13)
<i>Arthrobotrys</i> sp. (2)	<i>C. gloeosporioides</i> (1)
<i>Aspergillus candidus</i> (10)	<i>Colletotrichum</i> sp. (6, 7)
<i>A. clavatus</i> (10)	<i>Coanephora</i> sp. (5)
<i>A. flavus</i> (1, 10, 13)	<i>Curvularia lunata</i> (7, 10)
<i>A. fumigatus</i> (4)	<i>Curvularia</i> spp. (1, 2, 8, 13)
<i>A. glaucus</i> (10)	<i>Cylindrocladium</i> sp. (10)
<i>A. niger</i> (1, 10)	<i>Doratomyces</i> sp. (5)
<i>A. ochraceus</i> (10)	<i>Dreschelera</i> sp. (8)
<i>Aspergillus</i> spp. (2, 4, 7, 8, 10)	<i>Epicoccum purpuracens</i> (10)
<i>A. tamarii</i> (10)	<i>Epicoccum</i> sp. (2, 8)
<i>Aschochyta</i> sp. (10)	<i>Fusarium acuminatum</i> (10)
<i>Botryodiplodia theobromae</i> (2, 5, 7, 8, 10, 13)	<i>F. concolor</i> (2)
<i>Botrytis</i> (2)	<i>F. culmorum</i> (6)
<i>Chaetomium globosum</i> (10)	<i>F. equiseti</i> (2, 6, 8, 9, 10)
<i>F. fusarioides</i> (2, 6, 9)	<i>Mucor</i> sp. (10)
<i>F. larvarum</i> (2)	<i>Myrothecium</i> sp. (10)
<i>F. lateritum</i> (10)	<i>Neurospora</i> sp. (2, 8)
<i>F. moniliforme</i> (1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 13)	<i>Nigrospora sphaerica</i> (10)
<i>F. moniliforme</i> f. <i>subglutinans</i> (9)	<i>Nigrospora</i> sp. (1, 2, 4, 7, 8)
<i>F. oxysporum</i> (1, 4, 6, 8, 9, 10)	<i>Penicillium</i> spp. (1, 2, 4, 7, 8, 10, 13)
<i>F. oxysporum</i> f. <i>vasinfectum</i> (2, 13)	<i>Phoma</i> sp. (2, 6, 7, 10)
<i>F. poae</i> (2)	<i>Phomopsis</i> sp. (8)
<i>F. sambucinum</i> (2, 9)	<i>Pestalotia</i> sp. (2, 8, 10)
<i>F. semitectum</i> (2, 6, 8, 9, 10)	<i>Pithomyces</i> sp. (2)
<i>F. solani</i> (2, 6, 9, 10)	<i>Pythium</i> spp. (1, 2, 3, 6)
<i>F. sulphureum</i> (2)	<i>Rhizoctonia solani</i> (1, 2)
<i>Fusarium</i> spp. (2, 3, 6, 7, 8, 10, 13)	<i>Rhizoctonia</i> sp. (6, 7, 8)
<i>F. xylarioides</i> (6, 9)	<i>Rhizopus</i> spp. (2, 3, 4, 7, 8, 10)
<i>Gonatobotrys</i> sp. (2, 8)	<i>Sclerotium</i> sp. (7)
<i>Helminthosporium</i> sp. (2, 7, 10)	<i>Spicaria</i> sp. (2)
<i>Macrophomina phaseolina</i> (2, 3, 4, 7)	<i>Trichoderma</i> (2, 7, 8, 10)
<i>Macrophomina</i> sp. (6)	<i>Trichothecium roseum</i> (7)
<i>Mycelia sterilia</i> (10)	<i>Verticillium alboatrum</i> (2)
<i>Monilia</i> sp. (8, 10)	<i>Verticillium</i> sp. (6)

* 1 = Menezes et al (1979); 2 = Geraldi (1981); 3 = Lima et al (1982); 4 = Menezes et al (1982a); 5 = Menezes et al (1982b); 6 = Pizzinatto; Soave e Cia. (1984); 7 = Tanaka e Paolinelli (1984); 8 = Bueno (1986); 9 = Pizzinatto, (1988); 10 = Sobreira (1988); 11 = Tanaka (1990); 12 = Tanaka (1991); 13 = Machado e Langerak (1993).

2. Caracterização e aspectos patológicos de *Botryodiplodia theobromae* em relação a espécies vegetais cultivadas.

Em cultura pura, as colônias de *B. theobromae* Pat. são acinzentadas a negras, com abundante micélio aéreo e ao reverso são foscas ou negras. Formam picnídios simples ou compostos, frequentemente agregados, estromáticos, ostiolados, subovóides para elipsóides - oblongos, com parede espessa e base truncada. Os conídios maduros tornam-se uniseptados e de coloração castanho- amarelados, sendo longitudinalmente estriados. As dimensões destes conídios variam entre (18-)20-30 x 10-15 μ . As paráfises quando presentes são hialinas, cilíndricas, algumas vezes septadas, tendo mais de 50 μ de comprimento. Nas folhas, caules e frutos de plantas infectadas por este fungo, os picnídios são imersos, tornando-se erupentes. Podem ocorrer isoladamente ou agrupados, apresentando 2 a 4mm de largura. São ostiolados e frequentemente pilosos e podem apresentar extrusão de conídios com aspecto de uma massa preta. Em sua fase perfeita o referido fungo é denominado *Physalospora rhodina* Berk e Curt. apud. Cooke. Segundo relatos de literatura existem 19 sinónimas para *B. theobromae* Pat., incluindo *Diplodia gossypina* Cooke e *Lasiodiplodia theobromae* Pat. Griff. & Maubl. (Punithalingan, 1976).

Para Sutton (1980), *Lasiodiplodia* é o nome genérico correto a ser adotado para este patógeno em substituição a *Botryodiplodia theobromae* Pat.. De acordo com este autor, muitas espécies de fungos são comumente referidas como *Botryodiplodia* Sacc., que foi tipificada por *Botryodiplodia juglandicola* (Schw) Sacc. e se diferenças em morfologia conidial sobreviverem, a nova avaliação dos conceitos genéricos neste grupo, então *B. theobromae* será mantida em *Lasiodiplodia* Ell. & Ev. apud. Clendenin.

Vários estudos relatam aspectos da fisiologia de *B. theobromae*. Rao e Singhal (1978), verificaram que a formação de picnídios em meio de cultura é dependente de indução pela luz. Honda e Aragaki (1978) obtiveram maior produção de picnídios sob comprimentos de onda entre 344,5 e 519nm e exudação de conídios apenas sob comprimentos de onda inferiores a 333nm, sendo estes valores próximos às faixas de luz ultra violeta e azul. De acordo com Okey e Adisa (1988), as condições ótimas para a germinação de conídios de *B. theobromae* caracterizam-se por 100% de umidade relativa, temperatura de 30°C e pH 7,0, não sendo influenciada pela luz. Gupta (1977) verificou que a germinação de conídios a 30°C, aumenta em função da concentração de sacarose no meio. Ainda estudos de Wang e Pinckard (1971) e de Wang e Pinckard (1972) mostram sua capacidade em produzir várias enzimas pécicas, além de celulasas, proteases e outras.

Do ponto de vista ecológico, *B. theobromae* é característico das regiões tropicais e subtropicais onde ocorre com ampla distribuição em cerca de 500 espécies vegetais hospedeiras, sendo considerado um parasita não especializado; um mesmo isolado é capaz de infectar diferentes hospedeiros (Tu e Cheng, 1970; Punithalingan, 1976; Varma e Bilgrami, 1977).

O tipo de dano e extensão dos prejuízos causados por *B. theobromae* são variáveis em função da espécie vegetal parasitada e incluem deterioração de sementes, 'damping off', murcha, seca, definhamento, formação de cancrios em caules de espécies arbóreas, podridão de frutos antes e após colheita, podridão de tubérculos, raízes e frutos armazenados, além de outros (Punithalingan, 1976; Kranz, Schmutterer e Koch, 1977; Adisa, 1983).

Com frequência este patógeno é encontrado nas sementes de seus hospedeiros e embora algumas vezes seja relatada sua ação na deterioração destas (Richardson, 1990), em muitos

cultivos não se conhecem detalhes e o significado desta associação quanto à transmissibilidade às progênes. Com relação a estes aspectos, foi demonstrado que sua presença na semente de milho resulta em descoloração, o que permite sua detecção sem a necessidade de incubação. O micélio é encontrado internamente, podendo atingir todas as partes da semente, inclusive o embrião. Quando a semente inicia a germinação, o fungo é transmitido sistemicamente e pode causar a morte em pré e pós emergência, sendo este efeito maior quando a semente encontra-se severamente infectada (Kumar e Shetty, 1983). Estudos através da microscopia eletrônica de varredura mostraram a presença de micélio de *B. theobromae* na cavidade entre o embrião e endosperma em sementes de *Pinus caribea*, porém não elucidaram as vias de penetração do patógeno (Rees, 1988). Em sementes de algodoeiro, Roncadori, Mc Carter e Crawford (1971) verificaram sua presença em sementes inteiras e em embriões isolados, quando submetidos ao teste de sanidade. A obtenção de correlações significativas entre altos níveis de incidência do patógeno e baixos percentuais de germinação de sementes de algodoeiro são indicativos de sua ação na deterioração destas (Roncadori, Mc Carter e Crawford, 1971; Bueno, 1986). ←

No cacaueteiro, *B. theobromae* pode ser encontrada causando a doença denominada "morte descendente". Esta doença se manifesta inicialmente nos ramos, pela formação de manchas úmidas, de coloração escura, seguida de murcha e queda das folhas. Os ramos secam e morrem, apresentando a casca mole que se desintegra e se desprende do lenho e os tecidos internos apresentam lesões necróticas de coloração castanha. A planta morre e nos ramos atacados encontram-se numerosos picnídios do fungo. Entretanto, embora confirmada a patogenicidade de *B. theobromae* como agente causal desta enfermidade, acredita-se que a severidade da mesma

pode estar associada a fatores tais como estado nutricional da planta, suprimento de água e condições físicas do solo (Bastos e Evans, 1979).

Em plantas de abacateiro, *B. theobromae* causa a doença denominada "morte regressiva" que se caracteriza pela necrose e seca dos tecidos afetados e avança progressivamente do ápice até os galhos grossos e tronco, resultando em queda da folhagem, definhamento e morte (Rondon e Guevara, 1984). Em pimenta-do-reino pode causar a murcha e queda das folhas devido ao apodrecimento da região nodal (Radhakrishnan e Mammooty, 1987) e no coqueiro causa a "queima das folhas" (Souza Filho, Santos Filho e Robbs, 1979; Ram e Leal, 1990). Sharma, Mohanam e Florence (1984) verificaram em plantios de *Eucaliptus* com idade de 9 a 16 meses, alta incidência de murcha e morte das plantas, determinada pela presença de cancro e constrição típica na região do colo, causada por *B. theobromae*.

Muitos frutos tropicais comestíveis tais como goiaba, banana e manga, podem ser deteriorados pela ação deste fungo em pré e pós colheita (Adisa, 1983; Adisa, 1985; Mandal e Dasgupta, 1985). Podem ser também deteriorados em pré e pós colheita, mandioca, inhame e batata doce; nestes casos a infecção tem início através de ferimentos, principalmente pela cicatriz remanescente da ligação com a parte aérea do vegetal (Krantz, Shumutterer e Koch, 1977).

Os efeitos do parasitismo de *B. theobromae* em algodoeiro estão relacionados particularmente ao apodrecimento das maçãs, segundo Bagga (1970); Kimati (1980) e Watkins (1981). Estudos ao microscópio eletrônico de varredura mostram que as hifas deste fungo podem penetrar nas maçãs do algodoeiro diretamente através da camada superficial de cera, através dos pelos epidérmiais ou dos estômatos, passando facilmente a cutícula e parede celular, sem a formação de apressórios ou 'peg' de infecção (Snow e Sachdev, 1977). Os sintomas de necrose

decorrentes da infecção destes frutos está associada à produção de enzimas de degradação pelo patógeno (Wang e Pinckard, 1972).

A podridão das maçãs incide no algodoeiro, principalmente quando ocorrem períodos prolongados de chuva, durante sua formação e colheita e pode ser detectada com maior frequência em lavouras mais densas e mais desenvolvidas. Estas maçãs não apresentam boa deiscência e o algodão colhido é sempre de qualidade inferior (Lagiere, 1968; Cia, 1977). Balmer, Bastos Cruz e Silveira (1967), avaliando a ocorrência de fungos que afetam as maçãs do algodoeiro no Estado de São Paulo, isolaram *B. theobromae* em cerca de 25% das amostras examinadas. De acordo com o Cotton Disease Council, nos Estados Unidos da América (citado por Sanders & Snow, 1978) as perdas causadas pela podridão das maçãs em cultivos de algodoeiro na Lousiana, durante os 25 anos anteriores, foi em média, aproximadamente 11%.

Estudos realizados por Pizzinatto, Soave e Cia (1983), inoculando cinco isolados de *B. theobromae* em plantas de três cultivares de algodoeiro, em várias idades, confirmaram a patogenicidade deste fungo apenas às maçãs, apesar de se verificar sua capacidade em invadir e sobreviver por vários meses nos tecidos vegetativos das plantas. Porém, mais recentemente a patogenicidade de *B. theobromae* causando seca de brotos e ramos em plantas de algodoeiro com 45 dias de idade, foi demonstrada por Lakshmana e Mohan (1989). Estes relatos sugerem a susceptibilidade diferenciada de cultivares de algodoeiro, conforme verificado por Cauquil e Follin (1970) em relação a este e outros patógenos agentes causais da podridão de maçãs. Sugerem também a possível existência de raças fisiológicas do patógeno *B. theobromae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADISA, V.A. Fruit rot diseases of guava (*Psidium guajava*) in Nigéria. **Indian Phythopatology**, New Delhi, v.38, n.3, p.427-430, Sep. 1985.
- ADISA, V. A. Storage rots of banana fruits in some Nigerian markets. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, p.29-36, fev. 1983.
- BAGGA, H.S. Pathogenicity studies of organisms involved in the cotton boll-rot complex. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, n.1, p.158-160, Jan. 1970.
- BAKER, K.F.; SMITH, S.H. Dynamics of seed transmission of plants pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.4, p.311-334, 1966.
- BALMER, E.; BASTOS CRUZ, B.P.; SILVEIRA, A.P. Ocorrência de fungos que afetam as maçãs do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.34, n.3, p.161-167, jul/set. 1967.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. Ocorrência de "morte descendente" do cacaueiro no Território Federal de Rondônia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.3, p.483-486, out. 1979.
- BUENO, J.T. **Influência de genótipo e local de produção na incidência de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado do Paraná**. Piracicaba, ESALQ, 1986. 99 p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- CAUQUIL, J.; FOLLIN, J. C. Étude de l'action de quelques caractères morphologiques ou génétiques sur le comportement du cotonnier à l'égard des pourritures de capsules. I. La resistance à la bacteriose. *Coton Fibr. trop.* v.25, n.3, p.375-380, 1970. In: **REVIEW OF PLANT PATHOLOGY**, London, v.50, abst. 1250, 1971.

- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.3, n.3, p.167-93, maio/jul.. 1977.
- GERALDI, M. A. P. Sanidade de Sementes de algodoeiro. **Summa Phythopatologica**, Piracicaba, v.7, p.15-16, jun/dez. 1981.
- GUPTA, O. A note on effect of different concentrations of sucrose on spores germination of *Colletotrichum papaye* and *Botryodiplodia theobromae*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.30, n.1, p.282-283, Mar. 1977.
- HONDA, Y.; ARAGAKI, M. Effect of monochromatic radiation on pycnidial formation and exudation of conidia in *Botryodiplodia theobromae*. **Mycologia**, Ithaca, v.70, n.3, p.605-613, May/June. 1978.
- KIMATI, H. Doenças do algodoeiro - *Gossypium* spp. In: GALLI, F., ed. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Ceres, 1980. v.2, p. 29-48.
- KRANZ, J.; SCHUMUTTERER, H.; KOCH, W. **Diseases pest and weeds in tropical crops**. Berlim: Verlag Paul Parey, 1977. 666 p.
- KUMAR, V.; SHETTY, H. S. Seed-borne nature and transmission of *Botryodiplodia theobromae* in maize (*Zea mays*). **Seed Science & Technology**, Zurick, v.11, p.781-789, 1983.
- LAGIÈRE, R. **El Algodon**. Barcelona: Editorial Blume, 1968. 292 p.
- LAKSHMANAN, P.; MOHAN, S. Twig and stem blight of cotton caused by *Botryodiplodia theobromae*. **Plant Pathology**, Harpenden, v.38 n.2, p.290-292, 1989.

- 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, n.3, p.401-406, out. 1982.
- LIMA, E. F.; VIEIRA, R. M.; CARVALHO, J. M. F. C. Influência de *Rhizopus* sp, *Aspergillus niger* e *A. flavus* na deterioração de sementes de algodoeiro armazenadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.3, p.555-560, Out. 1984.
- LIMA, E.F.; CARVALHO, L.P.; CARVALHO, J.M.F.C. Sobrevivência de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.R. *Latifolium*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.3, p.247-252, out. 1988.
- MACHADO, J.C. **Patologia de sementes - Fundamentos e Aplicações**. Lavras: Ministério da Educação, 1988. 105 p.
- MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.I. Improvement of a blotter method to ~~detect~~ economically important fungi associated with seeds of cotton. In: SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, Ottawa, 1993. **Proceedings...** Ottawa: ISTA, 1993. p.48-58.
- MACHADO, J.C. **Studies seed-borne diseases of Zinnia, African Marigold and soybean**. Manchester: University of Manchester, 1980. 187p. (Tese - PhD).
- MANDAL, N. C.; DASGUPTA, M. K. Role of host and host pathogen interaction in the efficacy of benzimidazoles. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.38, n.3, p.366, Sep. 1985.
- MENEZES, M.; BARROS, S.T.; COELHO, R.S.B.; FERNANDES, M.J.S. Inventário fúngico de sementes de cultivares de algodão herbáceo, *Gossypium hirsutum* L. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.2, p.470, jun, 1982a.

- MENEZES, M.; BARROS, S.T.; MARIANO, R.L.R.; COELHO, R.S.B. Inventário fúngico de sementes de cultivares de algodão mocó, *Gossypium hirsutum* var. Marie-Galante Hutch. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.2, p.471, jun. 1982b.
- MENEZES, M.; BEZERRA, J.L.; ROSA RAMOS, L.B. Microflora fúngica de sementes de quatro cultivares de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.1, p.129, fev. 1979.
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. Londres: Macmillan Press, 1979. v.1, 839p.
- OKEY, E.N.; ADISA, V.A. Some nutritional requirements and the effects of four environmental factors on spore germination and growth of *Lasiodiplodia theobromae* and *Pseudocercospora timorensis*. **Cryptogamie Mycologie**, v.9, n.1, p.67-74, 1988.
- PIZZINATTO, M.A. **Relação entre densidade e qualidade de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. var. *Latifolium* Hutch) e patogenicidade de *Fusarium* spp.** Link ex Fr. Piracicaba: ESALQ, 1988. 122 p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- PIZZINATTO, M.A. Testes de sanidade de sementes de algodão. In: SOAVE, J., ed. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.331-357.
- PIZZINATTO, M.A.; SOAVE, J.; CIA, E. Patogenicidade de *Botryodiplodia theobromae* Pat. a plantas de diferentes idades e maçãs de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, n.2, p.223-228, jun. 1983.
- PIZZINATTO, M.A.; SOAVE, J.; CIA, E. Levantamento de patógenos em sementes de seis cultivares de algodoeiro em diferentes localidades do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.1, p.101-8, fev. 1984.
- PUNITHALINGAN, E. *Botryodiplodia theobromae*. s.l, 1976. (CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 519).

- RADHAKRISHNAN, T. C.; MAMMOOTTY, K. P. Nodal rotting of pepper. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.40, n.1, p.124, Mar. 1987.
- RAM, C.; LEAL, E.C. Determinação da época e do número de aplicações de fungicidas no controle da queima do coqueiro (*Cocos nucifera*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.3, p.229-231, set. 1990.
- RAO, P.V.; SINGHAL, G.S. Characterization of light dependent synchronous pycnidial production in *Botryodiplodia theobromae*. **Transactions British Mycological Society**, London, v.70, n.1, p.121-129, Feb. 1978.
- REES, A. A. Infection of *Pinus caribea* seed by *Lasiodiplodia theobromae*. **Transactions British Mycological Society**, London, v.90, n.2, p.321-324, 1988.
- RICHARDSON, M.J. **An annotated list of seed-borne diseases**. Zurich: The International Seed Testing Association, 1990. n.p.
- RONCADORI, R. W.; Mc CARTER, S. M.; CRAWFORD, J. L. Influence of fungi on cotton seed deterioration prior to harvest. **Phytopathology**, St. Paul, v.61 p.1326-28, Nov, 1971.
- RONDON, A.; GUEVARA, Y. Algunos aspectos relacionados con la muerte regressiva del aguaje (*Persea americana* Mill). **Agronomia Tropical**, v.34, n.1-3, p.119-129, Jan/Jun. 1984.
- SANDERS, D.E.; SNOW, J.P. Dispersal of airborne of boll-rotting fungi and the incidence of cotton boll rot. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, n.10, p.1438-41, Out. 1978.
- SHARMA, J. K.; MOHANAN, C.; FLORENCE, J. M. A new stem canker disease of *Eucalyptus* caused by *Botryodiplodia theobromae* in India. **Transactions British Mycological Society**, London, v.83, n.1, p.162-163, Ago. 1984.

- SNOW, J.P.; SACHDEV, M.G. Scanning electron microscopy of cotton boll invasion by *Diplodia gossypina*. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, n.5, p.589-591, May 1977.
- SOBREIRA, D.G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais**. Lavras: ESAL, 1988. 70 p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- SOUZA FILHO, B. F.; SANTOS FILHO, H. P.; ROBBS, C. F. Etiologia da "queima" das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, n.1, p.5-10, fev. 1979.
- SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
- TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 111 p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- TANAKA, M.A.S. Problemas da detecção do agente causal da ramulose em sementes de algodão. In: MENTEN, J.O.M., ed. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991. p. 93-106. (Anais da 2ª Semana de Atualização em Patologia de Sementes, Piracicaba, 1991).
- TANAKA, M.A.S.; PAOLINELLI, G. de P. Avaliação sanitária e fisiológica de sementes de algodão produzidas em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.6, n.1, p.71-81, jan/abr. 1984.
- TU, C.C.; CHENG, Y.H. Studies on the sources of *Diplodia gossypina* Cooke for primary infection on cotton. **Pl. Prot. Bull.**, Taiwan v.12, n.4, p.147-151, 1970. In: **REVIEW OF PLANT PATHOLOGY**, London, v.51 n.9, p.596, abst. 3384, Set. 1972.
- VARMA, U.; BILGRAMI, K. S. New host records of *Botryodiplodia theobromae*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.30, n.4, p.579, Dec. 1977.

- WANG, S.C.; PINCKARD, J.A. Pectic enzymes produced by *Diplodia gossypina* in vitro and in infected cotton bolls. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.8, p.1118-1124, Aug. 1971.
- WANG, S.C.; PINCKARD, J.A. Some biochemical factors associated with the infection of cotton fruit by *Diplodia gossypina*. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, n.4, p.460-465, Apr. 1972.
- WATKINS, G.M., ed. **Compendium of cotton diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1981. 87p.

Capítulo 3. OCORRÊNCIA E SOBREVIVÊNCIA DE *Botryodiplodia theobromae* Pat. EM SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.) PRODUZIDAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS.

OCORRÊNCIA E SOBREVIVÊNCIA DE *Botryodiplodia theobromae* Pat. EM SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.) PRODUZIDAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS.

RESUMO

No presente trabalho, avaliou-se a ocorrência de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro das regiões do Triângulo e Norte do Estado de Minas Gerais, safra 90/91, utilizando-se sementes com e sem linter. O fungo foi detectado em 100% das amostras de sementes provenientes da região do Triângulo, independentemente da presença de linter. Na região Norte, foi detectado em 90,2 e 82% das sementes analisadas com e sem linter, respectivamente. Os níveis de ocorrência nas amostras estiveram em geral, abaixo de 25%, que é a proposta para o padrão de tolerância do fungo na classe de sementes certificadas/fiscalizadas no Brasil, e menores na região Norte. A maioria das amostras apresentou crescimento médio de *B. theobromae* por semente, cobrindo mais de 50% de sua superfície visível, estimado através da atribuição de notas. A ocorrência de *B. theobromae* em sementes armazenadas durante 11 meses, sofreu declínio acentuado a partir do quarto mês e atingiu níveis próximos a zero, a partir do oitavo mês, quando as sementes foram mantidas em ambiente de laboratório. A ocorrência do patógeno foi preservada ao longo deste período, quando as sementes foram mantidas em câmara fria e seca. A avaliação do percentual de germinação das sementes realizada em três épocas, durante o período de armazenamento, mostrou aumento aos 6 e 11 meses, sendo este efeito maior em ambiente de laboratório.

SUMMARY

Occurrence and survival of *Botryodiplodia theobromae* Pat in cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.) produced in the State of Minas Gerais, Brazil.

The occurrence of *B. theobromae* was evaluated in seed samples of cotton produced in the regions of Triângulo and North of Minas Gerais State, Brazil, in 1990/91. Analysis were made considering seeds with lint and seeds without lint. The fungus was detected in 100% of the seed samples examined from Triângulo region, irrespective to the presence or absence of lint. In the North region, *B. theobromae* was detected in 90,2 of the samples with linted seeds and in 82% of the samples with delinted seeds. The occurrence levels of this fungus in seed samples were generally lower than 25%, which is the standard tolerance figure proposed in Brasil, and were lower in the North region than in the Triângulo region. Most of the seed samples presented growth of *B. theobromae* on individual seed covering more than 50% of its visible top surface, evaluated by diferent notes. The occurrence of *B. theobromae* in seed samples during storage for eleven months declined greatly from the fourth month, reaching almost zero from the eighth month on, when they were stored at laboratory conditions. The occurrence of *B. theobromae* was preserved during eleven months when seeds were stored in cold and dry room. Evaluation of seed germination rate, was done at the beginning and the 6th and 11th month during storage, showing the results an increasing in this rate which was higher under laboratory condition.

INTRODUÇÃO

O fungo *Botryodiplodia theobromae* é relatado como um dos microorganismos particularmente envolvidos no apodrecimento de frutos do algodoeiro (Bagga, 1970; Wang e Pinckard, 1972), podendo ser encontrado em associação com as sementes desta cultura (Richardson, 1990). Estudos conduzidos por Roncadori, Mc Carter e Crawford (1971), mostraram correlação significativa entre altos níveis de ocorrência de *B. theobromae* no embrião e baixos percentuais de germinação de sementes de algodoeiro recém colhidas, evidenciando sua ação na deterioração das sementes antes da colheita. Estes autores armazenaram as sementes durante cinco meses em câmara fria e verificaram redução na ocorrência de *B. theobromae*, embora não significativa, de 10,5% para 9,0% após o armazenamento.

Análises de sanidade de sementes de algodoeiro provenientes das regiões do Triângulo e Norte do Estado de Minas Gerais, pelo método de incubação em papel de filtro, mostraram ausência deste patógeno em amostras da safra 80/81 e sua ocorrência em 3,6% das amostras da safra 81/82 (Tanaka e Paolinelli, 1984). Análises realizadas em sementes da safra 85/86, utilizando-se os métodos de incubação em papel de filtro e de incubação em meio ágar, mostraram elevada ocorrência do referido fungo, principalmente nas amostras produzidas na região do Triângulo (Sobreira, 1988). De acordo com este autor, os percentuais de ocorrência nas amostras da região do Triângulo foram de 78,94 e 50% em meio ágar e em papel de filtro, respectivamente, e na região Norte, de 13,15 e 21,05%. Estes percentuais referem-se à ocorrência de *B. theobromae* em análises conduzidas nos mesmos anos de produção das sementes, não

havendo informações sobre sua ocorrência em sementes possivelmente armazenadas para plantio no ano seguinte.

Neste estudo, estabeleceu-se como objetivos, a avaliação da ocorrência de *B. theobromae* em amostras de sementes fiscalizadas de algodoeiro, no Estado de Minas Gerais, no ano agrícola de 90/91, levando-se em consideração a procedência geográfica e a sobrevivência do patógeno ao longo do armazenamento por 11 meses, sob diferentes condições de ambiente.

MATERIAL E METODOS

1. Avaliação da ocorrência de *Botryodiplodia theobromae*.

Foram analisadas 81 amostras de sementes, 53 provenientes da região do Triângulo e 28 provenientes da região Norte do Estado de Minas Gerais. As amostras pertenciam à cultivar IAC - 20, exceto quatro amostras da região do Triângulo, que eram da cultivar Redenção. A extratificação para coleta das amostras foi feita considerando-se a proporcionalidade de áreas plantadas nestas regiões, conforme lista de registro de produtores de sementes fiscalizadas de algodoeiro no ano agrícola 90/91, fornecida pela Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de Minas Gerais.

A amostragem foi realizada de acordo com procedimentos prescritos nas Regras para análise de sementes (Brasil, 1976), sendo cada amostra constituída de 2 kg de sementes, acondicionadas em sacos de papel ou pano. A coleta e análises foram realizadas no período de

agosto a outubro de 1991, antecedendo ao período de plantio do algodoeiro no Estado de Minas Gerais, que é realizado na segunda quinzena de outubro a primeira quinzena de novembro.

As amostras foram mantidas em ambiente de laboratório até sua utilização, sendo este período sempre inferior a 30 dias. Em laboratório, cada amostra foi homogeneizada manualmente, retirando-se de cada, a amostra de trabalho destinada à análise sanitária. De cada amostra de trabalho foram analisadas 200 sementes com linter e 200 sementes deslintadas quimicamente.

As sementes com linter foram superficialmente desinfestadas pela imersão em etanol 70%, durante 1 minuto e posteriormente secas sobre papel de filtro.

O deslinteramento químico foi feito pela adição de 10 ml de ácido sulfúrico concentrado em cerca de 300 sementes, seguido de agitação com bastão de vidro durante dois a três minutos e lavagem em água corrente. Para neutralizar o ácido sulfúrico residual, as sementes foram imersas por dez minutos em solução de bicarbonato de sódio 1%, seguido de lavagem em água corrente e secas à sombra sobre papel de filtro.

Em capela de fluxo laminar, sementes com linter e sementes sem linter foram individualmente transferidas para placas de plástico transparente, diâmetro de 15 cm, contendo cada, três discos de papel de filtro esterilizados e umedecidos em solução de 2,4 Diclorofenoxiacetato de sódio, 10 ppm, também esterilizada. Em cada placa foram semeadas 25 sementes equidistantes, sendo preparadas oito placas contendo sementes com linter e oito placas contendo sementes sem linter, para cada amostra. As placas foram incubadas em câmara com temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, usando-se lâmpadas de luz negra Silvânia 30w. Aos sete dias de incubação, determinou-se a presença de *B. theobromae* nas sementes, através de observação ao microscópio estereoscópico.

O percentual de ocorrência foi determinado considerando-se o percentual de amostras portadoras de *B. theobromae*, em relação ao número total de amostras examinadas por região. Os níveis de ocorrência foram determinados considerando-se os percentuais de sementes com incidência de *B. theobromae* em cada amostra examinada. Os níveis de ocorrência obtidos foram submetidos a análise de distribuição de freqüências, discriminando-se as regiões produtoras e presença ou não de linter nas sementes.

Avaliou-se também o crescimento do patógeno sobre a superfície das sementes. Para isto, foram atribuídas notas de acordo com a extensão de seu crescimento sobre cada semente, conforme a escala: 1 - presença de frutificação em pontos isolados na superfície superior das sementes; 2 - incidência cobrindo cerca de um quarto desta superfície; 3 - cobrindo cerca de metade da superfície; 4 - cobrindo cerca de três quartos da superfície e 5 - cobrindo toda a superfície visível da semente. Para cada amostra determinou-se a nota média. Considerando-se as regiões produtoras e a presença ou não de linter, foram calculados os percentuais de amostras apresentando nota média inferior a 3, correspondente ao crescimento do fungo sobre menos de 50% da superfície visível das sementes e de amostras com nota média superior a 3, correspondente ao seu crescimento sobre mais de 50% desta superfície.

2. Sobrevivência de *Botryodiplodia theobromae* em sementes durante o armazenamento.

Foram utilizadas amostras de quatro lotes de sementes de algodoeiro cultivar IAC - 20, produzidas na região do Triângulo, safra 91/92, selecionadas pelos seus níveis de ocorrência de *B. theobromae*, determinados pelo teste de incubação em papel de filtro.

Cada amostra, após homogeneização manual foi dividida ao meio, sendo metade armazenada em ambiente de laboratório e a outra metade em câmara seca e fria (40% UR e 10°C), em embalagens de papelão. A intervalos de 30 dias, cada amostra foi novamente homogeneizada, retirando-se de cada uma, 200 sementes que foram submetidas ao teste de sanidade, após deslincamento químico. O deslincamento e a análise de sanidade foram realizados de acordo com os procedimentos descritos anteriormente.

O armazenamento teve início em outubro de 1992, sendo finalizado em outubro de 1993.

A germinação das sementes de cada amostra foi determinada aos 0; 6 e 11 meses do período de armazenamento. Foram utilizadas 200 sementes retiradas de cada amostra, após homogeneização manual. Estas foram colocadas em rolo de papel Germitest, em oito repetições de 25 e mantidas por quatro dias em germinador à temperatura de 25°C. O percentual de germinação foi determinado de acordo com procedimentos descritos nas Regras para análise de sementes (Brasil, 1992).

Os dados de ocorrência de *B. theobromae* e de germinação das sementes, obtidos aos 0;6 e 11 meses de armazenamento foram submetidos a análises estatísticas de variância. Para isto os percentuais de ocorrência foram transformados por $\log (x + 10)$ e os de germinação por $\text{sen} \sqrt{\frac{x}{100}}$.

As médias de temperatura e de umidade relativa mensais, obtidas por determinações diárias na Estação Climatológica localizada no campus da Escola Superior de Agricultura de Lavras, durante o período de armazenamento das sementes, encontram-se na Figura 1.

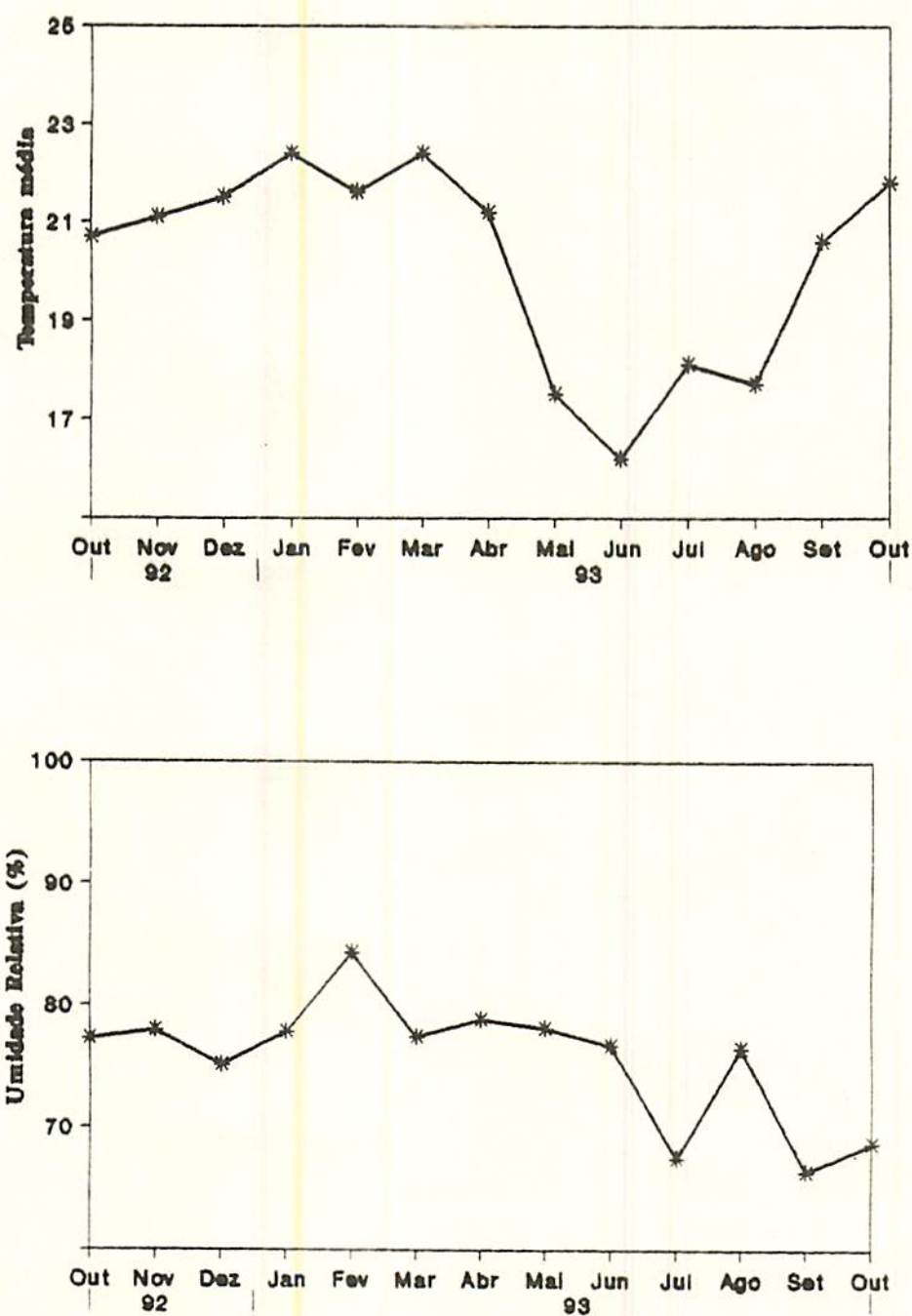


FIGURA 1. Temperaturas e umidades relativas médias mensais, obtidas por determinações diárias na Estação Climatológica localizada no campus da Escola Superior de Agricultura de Lavras. ESAL - Lavras, 1994.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Avaliação da ocorrência de *Botryodiplodia theobromae*

Os resultados da análise sanitária esquematizados na Tabela 1 e Figura 2 mostram a ocorrência de *B. theobromae* nas amostras de sementes de algodoeiro provenientes das regiões do Triângulo e Norte do Estado de Minas Gerais.

TABELA 1. Ocorrência de *B. theobromae* em amostras de sementes de algodoeiro produzidas nas regiões do Triângulo e Norte do Estado de Minas Gerais, analisadas com e sem linter. ESAL - Lavras, 1994.

Regiões		Ocorrência entre as amostras (%)	Nível de ocorrência (%)		
			Mínimo	Média	Máximo
Triângulo	s/ linter	100,0	0,5	9,8	36,0
	c/ linter	100,0	0,5	12,6	33,0
Norte	s/ linter	82,0	0,5	3,2	17,0
	c/ linter	90,2	0,5	2,6	17,5

Com base no valor do padrão de tolerância proposto pela Associação Brasileira de Tecnologistas de Sementes, de 25% para sementes certificadas/fiscalizadas (Machado, comunicação pessoal), constata-se que a maioria das amostras estaria dentro dos limites estabelecidos para este patógeno. Nota-se também que os níveis de ocorrência são ainda menores na região Norte, em relação à região do Triângulo, provavelmente em decorrência da maior pluviosidade que predomina na região do Triângulo. De acordo com Lagiére (1968) o apodrecimento de frutos do algodoeiro, causado por *B. theobromae*, é favorecido em maior escala pelas condições de alta umidade do ambiente. Observa-se ainda na região do Triângulo,

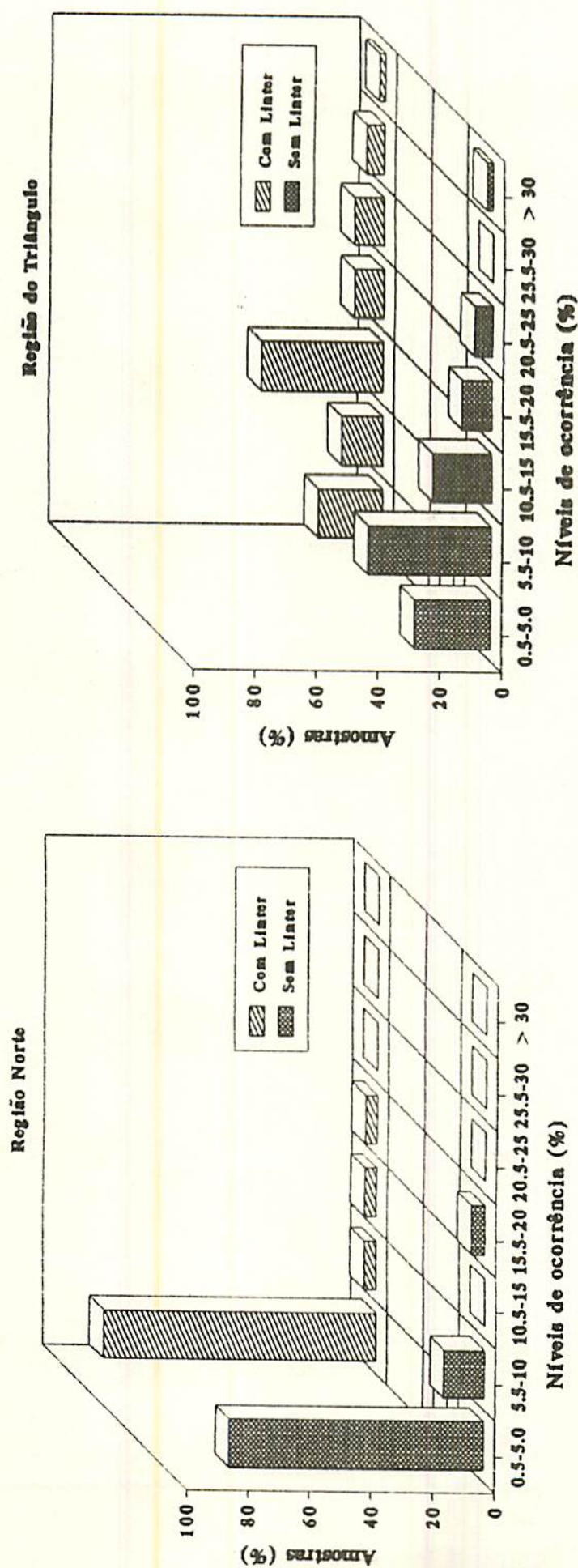


FIGURA 2. Frequência das amostras portadoras de *B. theobromae* em função dos níveis de ocorrência em sementes de algodoeiro com e sem linter, provenientes das regiões Triângulo e Norte do Estado de Minas Gerais. ESAL - Lavras, 1994.

tendência das amostras analisadas com linter em apresentarem níveis de ocorrência do fungo, em geral mais altos que quando analisadas sem linter (Figura 2).

Na Tabela 2 estão expressos os resultados referentes à avaliação do nível de crescimento de *B. theobromae* sobre a superfície das sementes pelo do teste de incubação em papel de filtro.

TABELA 2. Percentual de amostras de sementes de algodoeiro em função da extensão do crescimento médio de *B. theobromae* produzido sobre a superfície visível das sementes, durante o teste de sanidade. ESAL - Lavras, 1994.

Percentual de cobertura da semente pelo fungo	Percentual de amostras portadoras de <i>B. theobromae</i>			
	Triângulo		Norte	
	s/ linter	c/ linter	s/ linter	c/ linter
≤ 50	17	41,5	26,1	30,8
≥ 50	83	58,5	73,9	69,2

Para ambas as regiões consideradas no presente estudo observa-se que *B. theobromae* apresentou a cobertura média por semente, superior a 50% da superfície visível das sementes, na maioria das amostras. Para a região do Triângulo a proporção de cobertura de *B. theobromae*, superior a 50%, é da ordem de 5:1 em se tratando de sementes sem linter.

Estes resultados revelam que em geral as sementes de algodoeiro veiculam elevada quantidade de inóculo, de *B. theobromae*, fazendo com que haja uma alta probabilidade deste patógeno atingir os tecidos da plântula por ocasião da germinação. Segundo informações de literatura, considerando outros tipos de fungos e sementes e dentro deste aspecto de potencial de inóculo, as chances de transmissão de um patógeno a partir de sementes à progênie, com possibilidade de ocorrência de doenças em caráter epidêmico são tanto maiores na medida que o potencial de inóculo associado às sementes é mais elevado (Aulakh, Mathur e Neergard, 1974). Fica evidenciado também que a não quantificação do potencial de inóculo por semente, nos

resultados de testes de sanidade faz com que a interpretação destes resultados sejam questionáveis de certa forma, do ponto de vista epidemiológico.

Em se tratando de um fungo com crescimento micelial acentuado, conforme nota-se em avaliações em meios de cultura, pode-se também admitir que a presença de *B. theobromae* em alto potencial de inóculo nas sementes pode dificultar não só o crescimento de outros fungos associados às sementes de algodoeiro como também dificultar a visualização destes durante o exame das sementes pelo teste de papel de filtro. O crescimento excessivo de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro, possivelmente sobrepujando o de outros fungos presentes nas mesmas é também um fato de enorme preocupação, já referido por outros autores. Machado e Langerak (1993), tratam desse problema como um dos fatores principais que tornam o "blotter test" em algodoeiro questionável para a detecção de fungos em geral. De acordo com estes autores, o crescimento exuberante de *B. theobromae* sobre o papel de filtro, além de causar contaminações secundárias atingindo outras sementes, dificulta o desenvolvimento de outros fungos. Sugerem a adição do fungicida iprodione, em baixa concentração, ao papel substrato, como forma de reduzir seu crescimento e assim facilitar a avaliação dos demais fungos.

2. Sobrevivência de *Botryodiplodia theobromae* em sementes durante o armazenamento.

Os resultados referentes ao comportamento de *B. theobromae* e à germinação das sementes, durante o período de armazenamento, encontram-se na Figura 3 e Tabelas 3 e 4.

Pela Figura 3 vê-se que em ambiente de laboratório *B. theobromae* apresentou um acentuado declínio a partir do 4^o mês de armazenagem, chegando a níveis próximos de zero, a

partir do 8º mês. Por outro lado, em câmara fria, observa-se uma maior estabilidade dos níveis médios de ocorrência do patógeno no decorrer de todo o período de armazenamento.

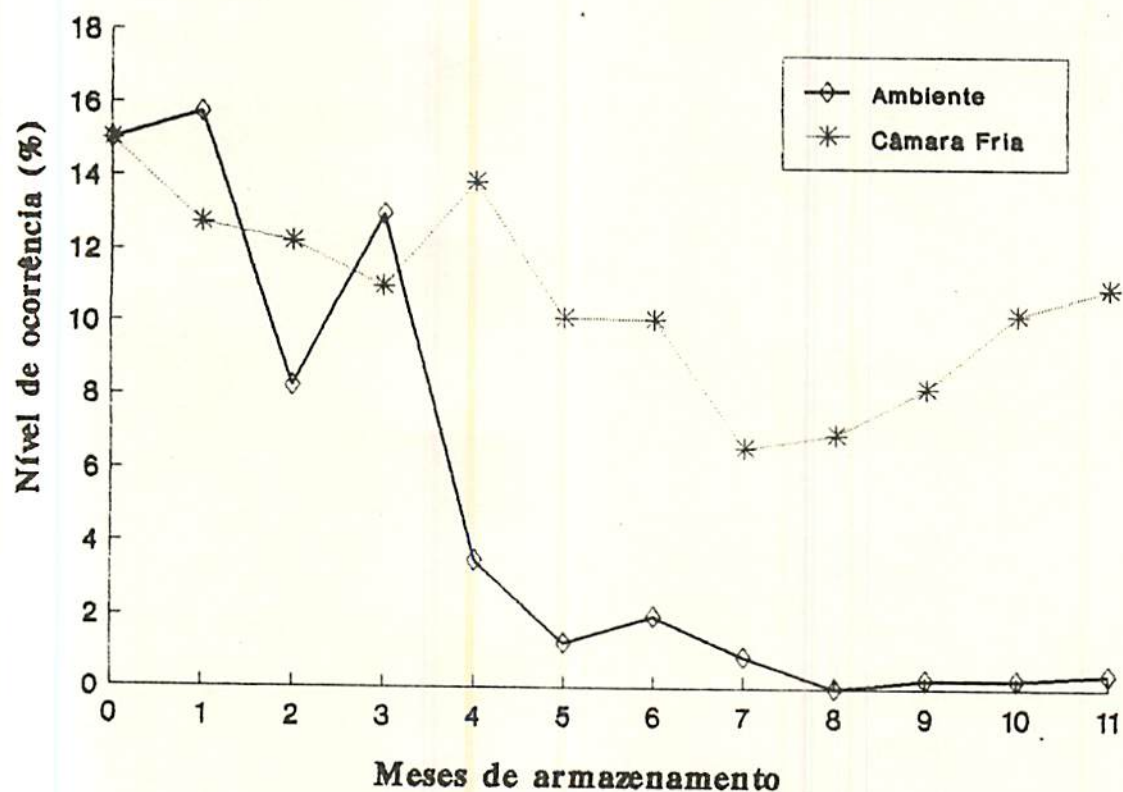


FIGURA 3. Níveis médios de ocorrência de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro armazenadas em câmara fria e seca e em ambiente de laboratório. ESAL - Lavras, 1994.

TABELA 3. Níveis médios de ocorrência de *B. theobromae* em amostras de sementes de algodoeiro armazenadas em ambiente de laboratório e em câmara fria. ESAL - Lavras, 1994.

Local de armazenagem	Meses de armazenamento		
	0	6	11
Ambiente	15,0 aA	2,0 bB	0,4 bB
Câmara fria	15,0 aA	10,1 aA	11,0 aA

CV = 5,1%. Médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 4. Percentuais médios de germinação das sementes de algodoeiro armazenadas em ambiente de laboratório e em câmara fria. ESAL - Lavras, 1994.

Local de armazenagem	Meses de armazenamento		
	0	6	11
Ambiente	30 aB	58 aA	69 aA
Câmara fria	30 aC	41 bB	59 bA

CV = 8,7%. Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ainda em câmara fria, as reduções aparentes, em relação ao nível inicial (Figura 3) não foram consistentes e suficientes para determinar diferenças significativas aos seis e onze meses do armazenamento (Tabela 3).

Em termos estatísticos, as avaliações feitas em três épocas durante o período de armazenamento (Tabela 3) indicam que em câmara fria o nível de *B. theobromae* não sofreu variações significativas o que não ocorreu em condições de armazenagem em ambiente de laboratório, onde, após seis meses, o declínio de *B. theobromae* foi expressivo. Prováveis causas do declínio de *B. theobromae*, quando as sementes foram armazenadas em ambiente de laboratório podem ser atribuídas às variações de temperatura sempre acima de 10°C e a grandes variações de umidade relativa do ar (Figura 1). Nestas circunstâncias, a alternância de populações microbianas nas sementes pode levar à predominância de organismos antagônicos a *B. theobromae*, fazendo com que sua sobrevivência seja desfavorecida no intervalo de 70% a 90%

de UR (Figura 1). Há citações de predominância típica alternada de certas espécies de fungos de armazenamento, como *Aspergillus glaucus*, *A. flavus* e *Penicillium* sp (Neergaard, 1979; Berjak, 1987), não se descartando a ocorrência de espécies de *Bacillus* e de outras bactérias nestas condições. Da mesma forma estudos conduzidos por Lima et al (1988), tratando da sobrevivência de *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides*, mostraram que o armazenamento de sementes de algodoeiro à temperatura ambiente, fez com que o índice de ocorrência desse fungo sofresse um declínio drástico a partir do 8º mes.

Os resultados referentes à germinação das sementes (Tabela 4) sugerem que o declínio na viabilidade de *B. theobromae* pode ter sido o fator principal determinante dos índices mais elevados da taxa de germinação no transcorrer do período de armazenagem. Isto é possível, uma vez que *B. theobromae* pode causar a deterioração e morte das sementes de algodoeiro (Roncadori, Mc Carter e Crawford, 1970; Oliveira, Machado e Andrade, 1993).

Do ponto de vista de controle, os resultados obtidos no presente estudo mostram que a inativação de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro através do armazenamento em condições semelhantes ao ambiente de laboratório (temperatura média de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa média de $76\pm 5\%$), pode ser uma alternativa para o aproveitamento de lotes reprovados em um determinado ano, em decorrência da ação deste patógeno na fase de germinação. Por sua vez, a armazenagem de sementes em câmara fria e seca, revela que nestas condições os níveis de ocorrência de *B. theobromae* são preservados e isto tem sua aplicação prática em termos de reavaliação de amostras quando necessário.

CONCLUSÕES

1. Sementes de algodoeiro provenientes da região do Triângulo do Estado de Minas Gerais apresentam maior incidência de *B. theobromae*, em relação à região Norte, evidenciando maior potencial desta última para produção de sementes livres deste patógeno.
2. Sementes de algodoeiro são capazes de veicular *B. theobromae* em elevada proporção.
3. A viabilidade do inóculo de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro, foi preservada em câmara fria e seca e sofreu declínio acentuado em ambiente de laboratório durante onze meses de armazenagem. ✕
4. O armazenamento de sementes de algodoeiro portadoras de *B. theobromae* resultou em aumento do percentual de germinação após seis e onze meses, sendo esse efeito mais acentuado em ambiente de laboratório, em relação à câmara fria e seca. ✕

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AULAKH, K.S.; MATHUR, S.B.; NERGAARD, P. Comparison of seed-borne infection of *Drechslera oryzae* as recorded on blotter and in soil. **Seed Science & Technology**, v.2, p.385-391, 1974.
- BAGGA, H. S. Pathogenicity studies of organisms involved in the cotton boll-rot complex. **Phytopathology**, St. Paul, n.60, n.1, p.158-60, Jan. 1970.

- BERJAK, P. Stored seeds: The problems caused by microorganisms (with particular reference to the fungi). In: NASSER, L.C.; WETZEL, M.M. & FERNANDES, J.M. **Seed Pathology**. International Advanced Course: Passo Fundo, ABRATES, 1987a. pt.1, p.38-50.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1976. 188p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- LAGIÈRE, R. **El Algodon**. Barcelona: Editorial Blume, 1968. 292p.
- MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. I. Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton. In: SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, Ottawa, 1993. **Proceedings...** Ottawa: ISTA, 1993. p.48-58.
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. Londres: Macmillan Press, 1979. v.1, 839p.
- OLIVEIRA, E.; MACHADO, J. C.; ANDRADE, G. A. F. Patogenicidade de *Botryodiplodia theobromae* a sementes de algodoeiro. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.3, n.3, p.93, jun. 1993.
- RICHARDSON, M. J. **An annotated list of seed-borne diseases**. Zürich: The International seed Testing Association, 1990. n.p.
- RONCADORI, R. W.; Mc CARTER, S. M.; CRAWFORD, J. L. Influence of fungi on cotton seed deterioration prior to harvest. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, p.1326-28, Nov. 1971.
- SOBREIRA, D. G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais**. Lavras: ESAL, 1988. 70p.(Tese - Mestrado em Fitossanidade).

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

WANG, S. C. & PINCKARD, J. A. Some biochemical factors associated with the infection of cotton fruit by *Diplodia gossypina*. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, n.4, p.460-5, Apr. 1972.

Capítulo 4. EFEITOS E TRANSMISSIBILIDADE ÀS SEMENTES DE
Botryodiplodia theobromae* Pat. EM ALGODOEIRO (*Gossypium
***hirsutum* L.).**

EFEITOS E TRANSMISSIBILIDADE ÀS SEMENTES DE *Botryodiplodia theobromae* Pat.
EM ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.).

RESUMO

Plântulas de algodoeiro, cultivadas em substrato de ágar e solução nutritiva, sob condições controladas, intactas ou com folhas feridas por estilete, foram inoculadas com micélio de *B. theobromae*. Plantas jovens, em floração e em frutificação, com ou sem ferimentos, foram inoculadas com suspensão de conídios do fungo e em outro estudo com micélio, colocado em locais marcados no caule, folhas, flores e frutos. O solo contido em vasos foi contaminado através de sementes de algodoeiro com *B. theobromae*, sendo aí cultivadas plantas até a produção. Frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, conforme sua localização nas plantas, foram individualmente inoculados com suspensão de conídios. Cinco genótipos de algodoeiro foram inoculados com suspensão de conídios, na época de frutificação, sendo os frutos destes inoculados em separado, com micélio, em caixas Gerbox. *B. theobromae* causou lesões necróticas, seca e morte das plântulas "in vitro" e lesões necróticas nas plantas jovens, onde sobreviveu até a época de frutificação. Em plantas em floração não causou infecção mas provocou podridão seca dos frutos e seca dos ramos apicais nas plantas em frutificação. Estes efeitos não foram influenciados pelos ferimentos. Parte dos frutos infectados, em todos os estádios de desenvolvimento, apodreceu totalmente e a maioria completou a deiscência, transmitindo o patógeno às sementes. Os cinco genótipos estudados mostraram-se susceptíveis e transmitiram *B. theobromae* às sementes.

SUMMARY

Effects and seed transmissibility of *Botryodiplodia theobromae* Pat on cotton (*Gossypium hirsutum* L.).

Cotton seedlings cultivated on agar nutrient medium, under controlled conditions, and growing plants in different stages in soil substrate were inoculated with *B. theobromae* mycelium and or conidial suspension. Part of the inoculated seedlings and plants were artificially wounded prior to the inoculation. Additional set of experiments was carried out considering inoculation different organs of the plants such as stem, leaves, flowers and fruits. Cotton plants were cultivated in pots with contaminated soil using colonized cotton seeds with *B. theobromae*. Fruits in different development stages, according to their plant position were individually inoculated with conidium suspension. Five cotton breeding lines were inoculated with conidia at the frutification time and their fruits inoculated separately in plastic boxes. *B. theobromae* caused necrotic lesions and death of seedlings "in vitro" and necrotic lesions on young plants wherein it survived until the cotton harvest. This pathogen was not able to infect plants at the flowering stage but caused dry rot of fruits and progressive dry of stem in plants with fruits. These effects were not influenced by wounding tissues prior to the inoculation. Part of the infected fruits in all development stages was completely rot and the majority completed their dehiscence and transmitted the fungus to seeds. The five breeding lines studied were susceptible to and transmitted *B. theobromae* to the seeds.

INTRODUÇÃO

O fungo *Botryodiplodia theobromae* Pat. ocorre em ampla distribuição geográfica no mundo, principalmente na faixa entre 40° norte e 40° sul do equador, em associação com mais de 500 espécies vegetais hospedeiras. Em fase teleomórfica é denominado *Physalospora rhodina* Berk & Curt. apud Cooke e dentre 19 sinónimas inclui-se *Diplodia gossypina* Cooke (Punithalingan, 1976).

No algodoeiro, o referido fungo é relatado como capaz de penetrar os tecidos verdes dos frutos causando seu apodrecimento que, em geral, impede a deiscência Lagiere (1968); Bagga (1970). O micélio ramifica-se na superfície dos frutos e as hifas penetram o pericarpo, normalmente através da camada de cera na cutícula ou através dos pelos epidermais e pelas aberturas estomáticas, sem a formação de apressórios ou "peg" de infecção (Snow e Sachdev, 1977). Aparentemente, a penetração e invasão dos tecidos ocorre em função da produção de enzimas pecticas produzidas pelo fungo, além de proteases, fosfatases e outras (Wang e Pinckard, 1971; Wang e Pinckard, 1972). Genótipos de algodoeiro apresentando resistência ao apodrecimento de frutos causado por este e por outros patógenos, foram encontrados na África (Cauquil e Follin, 1970).

Em estudo conduzido por Pizzinatto et al (1983), a inoculação de plantas de algodoeiro em várias idades não produziu sintomas de doença, embora o fungo tenha sobrevivido nos tecidos vegetativos de várias plantas. Entretanto, recentemente, foi relatada a seca de ramos em plantas de algodoeiro, tendo como causa *B. theobromae* (Lakshamanan e Mohan, 1989).

No Estado de Minas Gerais, *B. theobromae* foi detectado em amostras de sementes de algodoeiro provenientes de diferentes regiões, com frequência de até 78,9% (Sobreira, 1988). Tal ocorrência generalizada pode indicar a transmissão do fungo para as sementes, provenientes de capulhos, abertos por ocasião da colheita, embora seja considerada a possibilidade de contaminação das sementes através de esporos que, de acordo com Sanders e Snow (1978) podem ser veiculados pelo ar.

O presente trabalho visou avaliar os efeitos da inoculação de *B. theobromae* em algodoeiro, cultivar IAC-20, nos estádios de plântulas, cultivadas "in vitro", de plantas em várias fases de desenvolvimento e a transmissibilidade do patógeno para as sementes a partir de maçãs infectadas em diferentes estádios de desenvolvimento. Foi objetivo também avaliar a patogenicidade do fungo a diferentes genótipos inoculados durante a fase de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes e em casa-de-vegetação telada, do Departamento de Fitossanidade da Escola Superior de Agricultura de Lavras no período de setembro de 1991 a abril de 1993.

1. Efeitos de *B. theobromae* em plântulas de algodoeiro cultivadas "in vitro".

Sementes da cultivar IAC-20 utilizadas neste estudo foram deslintadas através de ácido sulfúrico concentrado, na proporção de 10ml do ácido para cerca de 300 sementes, seguido de

agitação com bastão de vidro, por dois a três minutos e depois lavagem em água corrente. Logo após as sementes foram imersas em solução de bicarbonato de sódio 1%, durante dez minutos e novamente lavadas em água corrente. Através de diferenças de densidade em água procedeu-se à seleção das sementes eliminando-se a fração flutuante.

As sementes selecionadas foram superficialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1%, secas sobre papel de filtro esterilizado, em capela de fluxo laminar e assepticamente transferidas para tubos de ensaios 3x20cm, contendo 10 ml de meio ágar-solução nutritiva de Hoogland (1950), completa, diluída 10 vezes e esterilizados por autoclavagem, durante 20 minutos a 121°C, 1,5 atm, colocando-se uma semente por tubo. Os tubos, vedados com algodão, foram incubados em câmara de crescimento vegetal com temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h usando-se lâmpada luz do dia Grolux 40W.

Aos 15 dias da semeadura, as plântulas obtidas foram selecionadas pela ausência de sintomas de doença e de danos mecânicos visíveis. Plântulas com e sem ferimentos nas folhas, feitos com auxílio de estilete, foram inoculadas com discos, 5mm de diâmetro, contendo micélio, retirados da periferia da colônia de *B. theobromae*; face micelial em contato direto com o tecido foliar. Nas plantas não inoculadas foram colocados discos de meio BDA sem inóculo do fungo. Foram estabelecidos 40 repetições para cada tratamento, totalizando 160 tubos. Estes foram novamente incubados por mais 15 dias quando procedeu-se à avaliação dos danos causados pelo fungo nas plântulas.

O isolado do fungo utilizado procedeu de sementes de algodoeiro produzidas na região do Triângulo, no Estado de Minas Gerais, e foi cultivado por sete dias em meio BDA (extrato de

200g de batata, 20g de ágar purificado, Merck e 20g de dextrose/l), em incubadora a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, utilizando-se lâmpada luz negra, Silvania 30W.

2. Efeitos da inoculação de suspensão de conídios de *B. theobroame* em plantas de algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento.

Neste estudo, constituído por 12 tratamentos em esquema fatorial, plantas de algodoeiro em três fases de desenvolvimento (fase juvenil, floração e frutificação), com ou sem ferimentos, foram inoculadas ou não com *Botryodiplodia theobromae*, usando-se como inóculo suspensão de conídios. Cada tratamento foi repetido dez vezes, sendo cada parcela experimental constituída por um vaso com 5 Kg de substrato, contendo duas plantas, totalizando 120 vasos e 240 plantas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Foram utilizadas sementes de algodoeiro cultivar IAC-20, isentas de fungos patogênicos, provenientes de amostra selecionada dentre as amostras analisadas quanto ao perfil sanitário, pelo método de incubação em papel de filtro. Estas sementes foram deslintadas quimicamente e selecionadas conforme procedimento descrito no item 1.

Em cada vaso foram semeadas quatro sementes, à profundidade de 3cm, sendo o desbaste feito logo após a emergência das plântulas. Aos 30 dias pós-semeadura, as plantas de todos os vasos foram inoculadas com os fungos micorrízicos *Acaulospora morrowae* Spain & Schenck e *Glomus clarum* Schenck & Smith, multiplicados em vasos de cultivo contendo *Brachiaria decumbens* Staf. como hospedeiro e solo e vermiculita (1:1) fumigado, como substrato.

O substrato de cultivo do algodoeiro foi composto por Latossolo, areia e esterco de curral na proporção de 3:1:1, sendo fertilizado com N=300; P=200; K=150; Mg=15; B=0,2; Cu=1,5;

Mo=0,1; Zn=5 mg/Kg de substrato, nas formas de sulfato de amônia, superfosfato simples, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, ácido bórico, sulfato de cobre, molibdato de amônio e sulfato de zinco, respectivamente, com base em resultados da análise química e recomendações para a adubação do algodoeiro, conforme Malavolta (1980). O nitrogênio foi parcelado em três vezes e os micronutrientes foram aplicados em solução.

O inóculo de *B. theobromae* foi constituído por suspensão de conídios em concentração de $2,3 \cdot 10^4$, com germinação acima de 90%, sendo sua viabilidade avaliada pelo método descrito por Odell e Smith (1982). Para a obtenção de conídios o fungo foi cultivado por 15 dias em meio BDA, em câmara de incubação, a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, sob luz negra com fotoperíodo de 12h. Os conídios foram removidos da colônia por lavagem com água esterilizada, sendo a suspensão filtrada em gase e a ela adicionada uma gota de espalhante adesivo Tween 20. A concentração de conídios na suspensão foi determinada com auxílio da câmara de Neubauer.

A inoculação foi feita com atomizador De Vilbiss, aplicando-se cerca de 5ml da suspensão de conídios por vaso. As plantas foram mantidas sob câmara úmida preparada pela cobertura com sacos plásticos transparentes, durante 48h.

Os ferimentos nas plantas foram feitos nas folhas e caules, flores e frutos, conforme a época de inoculação, com auxílio de pequena placa de isopor pontilhada com alfinetes, por ocasião das inoculações.

O estudo foi realizado no período de setembro de 1991 a fevereiro, 1992.

Ao final, 15 dias após a última inoculação, os danos causados pelo fungo foram avaliados de acordo com a seguinte escala de notas: 1- ausência de sintomas; 2- presença de manchas necróticas nas maçãs, folhas sem sintomas; 3- manchas necróticas nas maçãs e nas folhas; 4-

maças totalmente apodrecidas; 5-maças apodrecidas e morte descendente das plantas, com seca de brotos, folhas e ramos. Os índices de doença das plantas foram determinados pela fórmula de McKiney, utilizada por Tanaka (1990).

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância após transformação por $\log(x + 10)$.

3. Efeitos da inoculação de micélio de *B. theobromae* em plantas de algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento.

Adotou-se os mesmos tratamentos descritos no item anterior, porém com inoculação feita em locais marcados nas plantas.

O inóculo foi constituído por discos (diâmetro de 5mm) retirados da margem de colônia de *B. theobromae* cultivada em meio BDA, por sete dias, a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, sob luz negra e fotoperíodo de 12h. Nos tratamentos não inoculados colocou-se discos de meio BDA esterilizados. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, totalizando 60 vasos e 120 plantas de algodoeiro. O inóculo foi localizado nos caules e superfície das folhas, nas flores e superfície dos frutos, quando presentes. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 48 horas sob câmara úmida, feita pela cobertura com sacos plásticos transparentes, da mesma forma adotada no estudo anterior.

As avaliações da incidência e evolução dos sintomas foram feitas a partir de 15 dias da inoculação, em cada estágio de desenvolvimento das plantas.

O estudo foi conduzido no período de setembro de 1992 a fevereiro de 1993.

Ao final, após 15 dias da última inoculação, segmentos dos tecidos vegetais foram retirados nos locais inoculados, superficialmente desinfestados por imersão durante um minuto em

etanol 96% e um minuto em hipoclorito de sódio 1%, e lavagens em água esterilizada e então transferidos para meio BDA e incubados, para verificar a presença de *B. theobromae*.

4. Desenvolvimento de plantas de algodoeiro em substrato contaminado com *B. theobromae*.

Quarenta vasos foram utilizados neste estudo, constando da incorporação de *B. theobromae* ao substrato de semeadura, tendo como alvo permitir o contato do inóculo com as raízes das plantas, tornando-se possível, assim, a avaliação dos efeitos deste patógeno sobre o desenvolvimento e frutificação do algodoeiro.

O substrato de 20 vasos foi contaminado colocando-se ao centro de cada um quatro sementes com abundante crescimento de *B. theobromae*, à profundidade de 3cm, após seleção através de testes de sanidade. Nos 20 vasos restantes foram colocadas em cada um, quatro sementes, sem crescimento fúngico, previamente autoclavadas durante 20 minutos, 121°C, 1,5 atm. O local de cada semente foi marcado com um palito. Durante uma semana os vasos foram diariamente irrigados para possibilitar o crescimento do fungo. Após este período procedeu-se à semeadura de quatro sementes viáveis, em cada vaso, a uma distância aproximada de 5cm das sementes com *B. theobromae*, colocadas inicialmente. Após a emergência, procedeu-se ao desbaste das plântulas, cultivando-se duas plantas por vaso.

As plantas foram conduzidas por cinco meses, no período de dezembro de 1992 a abril de 1993 quando determinou-se o número de frutos produzidos por planta e possível presença de sintomas causados pelo fungo.

Amostras de raízes coletadas em todos os vasos foram lavadas e incubadas durante 15 dias em câmara úmida para verificar a presença de *B. theobromae*.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

5. Transmissibilidade de *B. theobromae* de frutos infectados para sementes de algodoeiro.

Foram delineados 6 tratamentos, em esquema fatorial, constituídos por três estádios de desenvolvimento dos frutos, conforme sua localização no terço inferior, médio e superior da planta, correspondendo a frutos em início de deiscência, em início de maturação, com cor amarelada e maçãs verdes, jovens, respectivamente e, duas inoculações (presença e ausência de *B. theobromae*). Cada parcela experimental foi composta por dois frutos presentes em plantas distintas do mesmo vaso e cada tratamento foi repetido 10 vezes, totalizando 120 frutos em 120 plantas, em 60 vasos.

Os frutos previamente selecionados foram identificados com fitas plásticas com diferentes colorações. Cada fruto foi individualmente pulverizado com água, nos tratamentos não inoculados e pulverizados com cerca de 5ml de suspensão de conídios de *B. theobromae*, em concentração de $2,0 \times 10^4$ conídios/ml e apresentando viabilidade acima de 90%, nos tratamentos inoculados, conforme procedimento seguido no item 1. Todos os frutos foram revestidos com saco plástico transparente durante 48 horas.

Para obtenção do inóculo, *B. theobromae*, isolado de plantas infectadas, foi cultivado por sete dias em meio BDA e inoculado em frutos de algodoeiro, da cultivar IAC-20, seccionados e

autoclavados a 121°C, 1,5 atm durante 1h, posicionados em placas de petri de vidro (diâmetro de 15cm), contendo três folhas de papel de filtro umidecidas em água destilada. As placas foram incubadas por 15 dias em câmara a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 12h, sob luz negra, até a formação abundante de picnídios. Para o preparo do inóculo, os picnídios foram removidos por raspagem com bisturi e macerados em almofariz de porcelana. Adicionou-se água esterilizada ao macerado e este foi filtrado em gase. A concentração de conídios no filtrado foi determinada em contagens feitas em câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada pelo método de Odell e Smith (1982).

Na avaliação, após 30 dias da inoculação, determinou-se os números de frutos apodrecidos e de capulhos. As sementes colhidas nos capulhos foram deslintadas com ácido sulfúrico e submetidas à análise sanitária. Para isto foram colocadas em placas de petri de plástico transparente, diâmetro 15cm, sobre três folhas de papel de filtro embebidas em solução de 2,4-Diclorofenoxiacetato de sódio, 10 ppm, em quantidades de 25 sementes por placa. As placas foram incubadas por sete dias em câmara a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, sob luz negra e fotoperíodo de 12h. A incidência do fungo nas sementes foi avaliada ao estereomicroscópio.

O estudo foi conduzido no período de outubro de 1992 a março de 1993.

Os dados obtidos para incidência de *B. theobromae* nas sementes foram submetidos à análise de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

6. Susceptibilidade de diferentes genótipos de algodoeiro à infecção por *B. theobromae*.

A susceptibilidade de diferentes genótipos de algodoeiro, ao patógeno, foi avaliada pela inoculação de plantas na época de frutificação, determinando-se a ocorrência de apodrecimento

dos frutos. Foram definidos 10 tratamentos, constituídos por plantas das cultivares IAC-20, EPAMIG 4 - Redenção, PR-45-1, proveniente do Estado do Paraná, linhagens EPAMIG - C-25-1 e EPAMIG - C-14-1, fornecidas pela EPAMIG, MG, inoculadas e não inoculadas com suspensão de esporos do fungo. Cada parcela experimental foi constituída por um vaso de 5 kg contendo duas plantas e cada tratamento foi repetido 10 vezes, totalizando 100 vasos e 200 plantas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

O estudo foi conduzido no período de outubro de 1992 a março de 1993.

A inoculação foi feita utilizando-se suspensão de conídios de *B. theobromae* ($2,0 \times 10^4$ conídios/ml), obtidos de acordo com o procedimento descrito no item anterior. As plantas foram pulverizadas com água ou suspensão de conídios, conforme os tratamentos, aplicando-se cerca de 5ml da suspensão por vaso, e foram mantidas por 48 horas sob câmara úmida feita com sacos plásticos transparentes.

As sementes colhidas nos capulhos, 15 dias após a inoculação, foram deslintadas com ácido sulfúrico e submetidas à análise de sanidade pela incubação em papel de filtro.

Os dados obtidos para incidência de *B. theobromae* nas sementes foram submetidos à análise de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

Em laboratório, frutos verdes, provenientes de plantas destes mesmos genótipos, foram superficialmente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio, colocados em caixas tipo gerbox, contendo papel mataborrão úmido, e inoculados ou não com *B. theobromae*. O inóculo foi constituído por discos de colônia do fungo, cultivado por sete dias em meio BDA, após reisolamento de plantas inoculadas. Foram inoculados quatro frutos para cada genótipo, individualizados nas caixas gerbox. Nos frutos utilizados como controle foram colocados discos

de meio BDA, diâmetro 5mm, esterilizados. As caixas foram tampadas para formação de câmara úmida e mantidas por 15 dias em câmara a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h, sob lâmpadas de luz negra.

As médias de temperatura e de umidade relativa mensais, obtidas em determinações diárias feitas na Estação Climatológica localizada no campus da Escola Superior de Agricultura de Lavras, durante o período de condução destes estudos encontram-se na Figura 1.

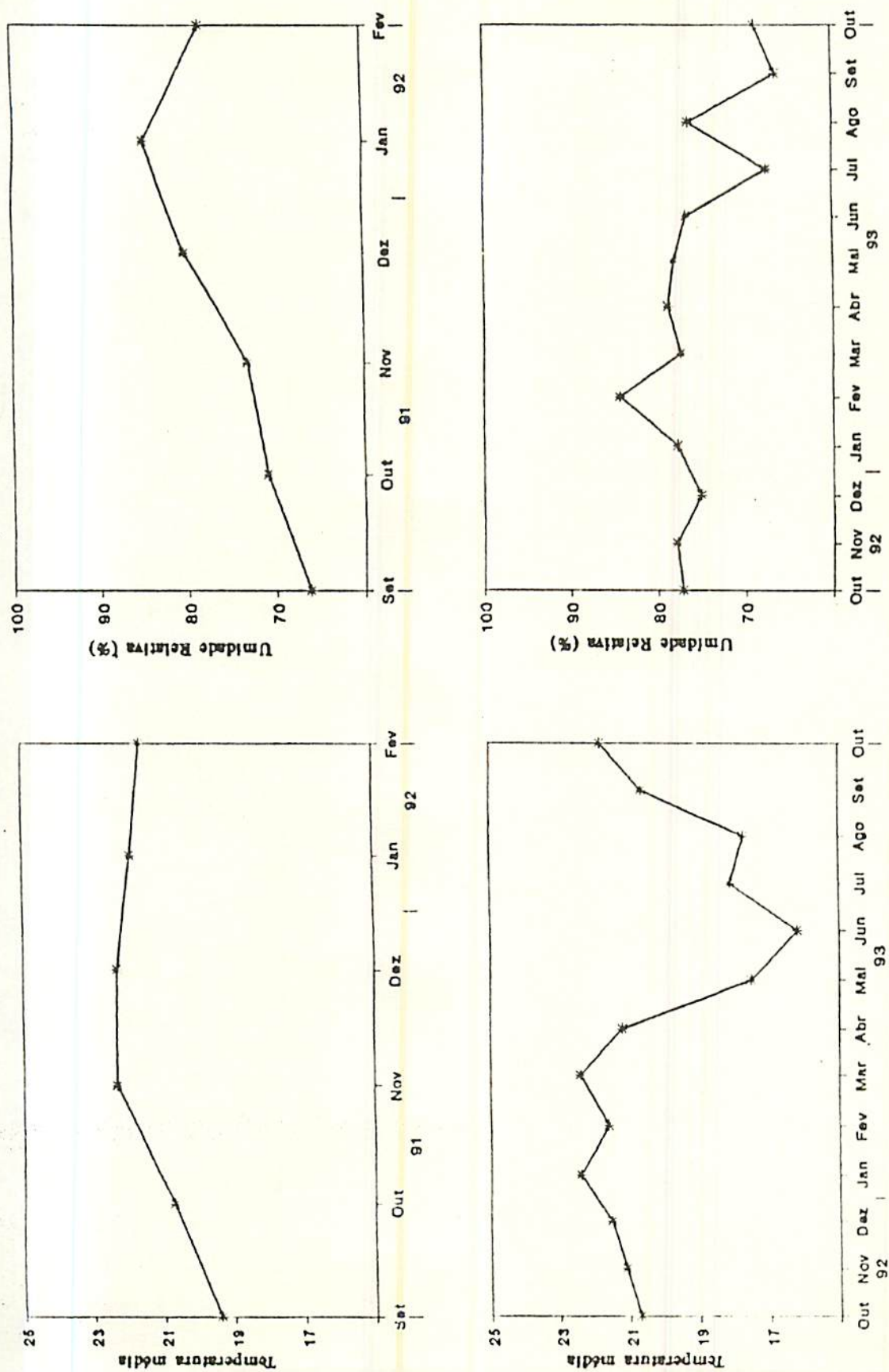


FIGURA 1. Temperaturas e umidades relativas médias mensais, obtidas por determinações diárias na Estação Climatológica localizada no campus da Escola Superior de Agricultura de Lavras. ESAL - Lavras, 1994.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Efeitos de *B. theobromae* em plântulas de algodoeiro cultivadas "in vitro".

A inoculação de plântulas de algodoeiro "in vitro" (Tabela 1) resultou no aparecimento de lesões necróticas que evoluíram até causar seca total e morte das plântulas, sendo este efeito mais acentuado na presença dos ferimentos feitos nas folhas.

TABELA 1. Efeitos da inoculação de plântulas de algodoeiro com micélio de *B. theobromae*, "in vitro" e da inoculação de plantas em diferentes fases de desenvolvimento, com suspensão de conídios do patógeno, sob condições de casa-de-vegetação telada. ESAL - Lavras, 1994.

A - Inoculação de plântulas "in vitro"

	Plântulas mortas (%)	
	Não inoculadas	Inoculadas
s/ ferimento	0,0	55,0
c/ ferimento	0,0	100,0

B - Inoculação de plantas em casa-de-vegetação

Fase de desenvolvimento das plantas		Índice de doença (%)	
		Não inoculadas	Inoculadas
Fase juvenil	s/ferimento	0,0	0,0
	c/ferimento	0,0	0,0
Floração	s/ferimento	0,0	0,0
	c/ferimento	0,0	0,0
Frutificação	s/ferimento	0,0	44,5
	c/ferimento	0,0	61,0
MÉDIAS		0,0 b	52,5 a

CV=14,3%. Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para índice de doença.

2. Efeitos da inoculação de suspensão de conídios de *B. theobromae* em plantas de algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento.

A inoculação das plantas em várias fases de desenvolvimento, com suspensão de conídios, causou danos apenas por ocasião da frutificação, com apodrecimento dos frutos e seca dos ramos apicais, levando, em alguns casos, à morte descendente das plantas. A presença de ferimentos em várias partes das plantas, embora proporcionando maior índice de doença, não diferiu significativamente do tratamento de inoculação sem ferimentos (Tabela 1). Os frutos apodrecidos apresentaram aspecto de secos, de coloração marrom, ou negra devido à extrusão de densa massa de conídios pelo fungo e em geral, não completaram o processo de deiscência. Algumas vezes os carpelos se desprenderam levemente, em sentido longitudinal, permanecendo ligados nas extremidades e outras vezes desprenderam-se apenas na região apical, mostrando nestes casos, as fibras com coloração cinza, devido ao crescimento micelial de *B. theobromae* no interior dos frutos (Figura 2).

3. Efeitos da inoculação de micélio de *B. theobromae* em plantas de algodoeiro em diferentes fases de desenvolvimento.

A inoculação das plantas em várias fases de desenvolvimento, com micélio do fungo, em posições localizadas, determinou o aparecimento de lesões necróticas no caule e nas folhas das plantas em fase juvenil. Estas lesões atingiram diâmetro de um a dois centímetros e não evoluíram além desta extensão, permanecendo confinadas nos locais inoculados. O fungo não conseguiu penetrar os tecidos de plantas adultas inoculadas na época de floração, não se verificando lesões

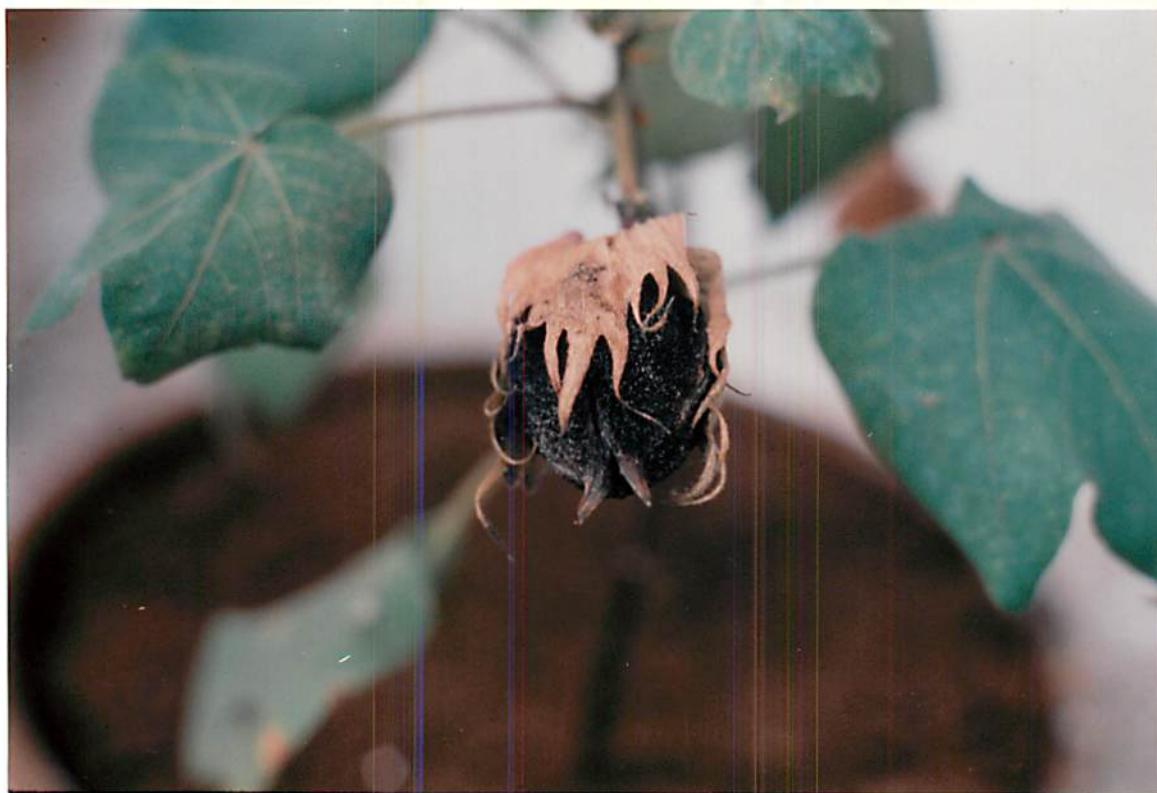


FIGURA 2. Podridão das maçãs do algodoeiro, causada por *Botryodiplodia theobromae*, ESAL - Lavras, 1994.

necróticas. Nas plantas inoculadas na época de frutificação, além das lesões necróticas nas folhas e caule, estas foram verificadas também nos frutos que rapidamente apresentaram aspectos de secos (Tabela 2).

Na avaliação final *B. theobromae* foi reisolado dos tecidos das plantas nos locais inoculados e que apresentaram lesões necróticas.

Foi encontrado um fruto infectado e que não fora inoculado, evidenciando a disseminação do patógeno por algum vetor causal, possivelmente por ácaro ou algum inseto.

4. Desenvolvimento de plantas de algodoeiro em substrato contaminado com *B. theobromae*.

A incorporação de *B. theobromae* ao solo não prejudicou o desenvolvimento normal e produção de frutos das plantas de algodoeiro (Tabela 2), não sendo observados sintomas da presença do fungo na parte aérea dessas plantas. Não foi também observada sua presença nas amostras de raízes analisadas.

5. Transmissibilidade de *B. theobromae* de frutos infectados para sementes de algodoeiro.

Os resultados obtidos mostraram que parte dos frutos infectados, mesmo quando ainda jovens, são capazes de completar o processo de maturação e deiscência, permitindo a colheita de fibras e de sementes portadoras do fungo. Em média, 17,2% dos frutos inoculados não se abriram, impedindo a colheita (Tabela 3). O patógeno foi detectado em média de 15,2% nas sementes provenientes dos frutos inoculados que se abriram e este nível de incidência não foi

TABELA 2. Efeitos da inoculação de plantas de algodoeiro, em diferentes fases de desenvolvimento, com micélio de *B. theobromae*, em posições localizadas e efeitos da incorporação do patógeno ao solo, sob condições de casa-de-vegetação telada. ESAL - Lavras, 1994.

A - Inoculação de plantas		Fase de desenvolvimento das plantas					
Sintomas produzidos		Fase juvenil		Floração		Frutificação	
		s/ fer	c/ fer	s/ fer	c/fer	s/ fer	c/ fer.
Lesões necróticas nas folhas e caule*	Inoc	+	+	-	-	+	+
	Não inoc	-	-	-	-	-	-
Podridão dos frutos*	Inoc	-	-	-	-	+	+
	Não inoc	-	-	-	-	-	-

* (+) = presença, (-) = ausência.

B - Contaminação do solo		
Tratamentos	Nº de frutos produzidos por planta	Sintomas nas plantas
Não inoculado	8,4 a	ausentes
Inoculado	8,5 a	ausentes

CV=4,7%. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3. Percentual de frutos apodrecidos que não completaram a deiscência, calculado em relação ao número total de frutos inoculados em cada estágio de desenvolvimento e níveis médios de incidência de *B. theobromae* nas sementes colhidas nos capulhos. ESAL - Lavras, 1994.

		Estádio de desenvolvimento dos frutos			MÉDIAS
		Jovem	Maduro	Início de deiscência	
Percentual de frutos podres fechados	N	0,0	0,0	0,0	0,0
	I	35,0	10,0	6,6	17,2
Percentual de <i>B. theobromae</i> nas sementes	N	0,0	0,0	0,0	0,0 B
	I	10,5	17,7	17,4	15,2 A

N = não inoculado; I = inoculado

CV=19,4%. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, para a incidência de *B. theobromae* nas sementes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

significativamente diferente em função do estágio de desenvolvimento em que os frutos foram infectados.

Os resultados da Tabela 3 evidenciam um dos possíveis mecanismos adaptativos utilizados por *B. theobromae* para sobrevivência durante os períodos de ausência de plantas de algodoeiro herbáceo, que é de ciclo anual, e de sua disseminação para novas áreas. O percentual de frutos que apodrecem totalmente e não se abrem, poderia garantir sua sobrevivência junto aos restos culturais até o plantio no ano seguinte, nesta mesma área, enquanto as sementes infectadas provavelmente garantiriam sua disseminação para novas áreas de plantio. A sobrevivência de *B. theobromae* em frutos de algodoeiro infectados, pelo menos durante seis meses, quando estes foram deixados na superfície do solo ou enterrados, foi verificada por Tu e Cheng (1970). Sanders e Snow (1978) verificaram que o inóculo inicial de *B. theobromae*, em cultivos de algodoeiro, pode constituir-se de conídios veiculados pelo ar e sugeriram sua proveniência a partir do crescimento saprofítico do fungo em detritos das plantas presentes no solo.

6. Susceptibilidade de diferentes genótipos de algodoeiro à infecção por *B. theobromae*.

Todos os diferentes genótipos de algodoeiro inoculados com *B. theobromae*, por ocasião da produção de frutos, mostraram-se susceptíveis à infecção e transmitiram o fungo para as sementes (Tabela 4).

TABELA 4. Percentual de frutos apodrecidos que não completaram a deiscência, em relação ao número total de frutos produzidos, por cada genótipo e níveis médios de incidência de *B. theobromae* nas sementes colhidas nos capulhos. ESAL - Lavras, 1994.

Genótipos	Inoculação	Frutos secos fechados (%)	Percentual de <i>B. theobromae</i> nas sementes
IAC-20	Não inoc.	0,0	0,0 b
	Inoc.	34,4	21,2 a
EPAMIG-4-REDENÇÃO	Não inoc.	0,0	0,0 b
	Inoc.	1,5	10,3 a
IAPAR-45-1	Não inoc.	0,0	0,0 b
	Inoc.	8,2	3,2 a
EPAMIG-C-25-1	Não inoc.	0,0	0,0 b
	Inoc.	17,5	21,3 a
EPAMIG-C-14-1	Não inoc.	0,0	0,0 b
	Inoc.	14,2	25,8 a

CV=19,4%. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para a incidência de *B. theobromae* nas sementes.

Embora os níveis de incidência de *B. theobromae* nas sementes tenha variado, a análise estatística não mostrou diferenças significativas entre os genótipos. A ocorrência de seca dos ramos apicais foi observada na maioria das plantas inoculadas, exceto para a cultivar IAPAR-45-1 em que nenhuma planta apresentou estes sintomas. Os frutos de todos os genótipos, quando inoculados com micélio e incubados em câmara úmida, apodreceram e recobriram-se de densa massa de conídios de *B. theobromae*.

Os resultados obtidos nas várias etapas deste estudo, mostram que *B. theobromae* é um organismo patogênico ao algodoeiro, capaz de causar danos acentuados nas fases iniciais de desenvolvimento, em substrato livre de outros microorganismos. Trata-se de um patógeno que também pode causar danos severos ao algodoeiro ao final do ciclo produtivo, sendo aparentemente muito agressivo, pela capacidade de colonizar e apodrecer totalmente frutos em poucos dias.

CONCLUSÕES

1 - O fungo *B. theobromae* mostrou-se patogênico ao algodoeiro herbáceo, nos estágios iniciais de desenvolvimento, em estudo 'in vitro', causando a seca e morte de plântulas e ao final do ciclo, causando a podridão dos frutos e seca dos ramos apicais.

2 - Os frutos de algodoeiro quando infectados por *B. theobromae*, independentemente de seu estágio de desenvolvimento, podem apodrecer e secar rapidamente, sem abertura dos carpelos, ou podem completar o processo de maturação e deiscência permitindo a colheita de sementes cujas partes podem abrigar o fungo nos seus tecidos.

3 - As cultivares de algodoeiro IAC-20, EPAMIG-4-Redenção, IAPAR-45-1, e as linhagens EPAMIG-C-25-1 e EPAMIG-C-14-1, são susceptíveis à infecção por *B. theobromae*, verificando-se em todos os genótipos a transmissão do patógeno, de frutos infectados para as sementes produzidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGGA, H. S. Pathogenicity studies of organisms involved in the cotton boll-rot complex. **Phytopathology**, St. Paul v.60, n.1, p.158-60, Jan. 1970.
- CAUQUIL, J.; FOLLIN, J.C. Étude de l'action de quelques caractères morphologiques ou génétiques sur le comportement du cotonnier à l'égard des pourritures de capsules. I. La resistance à la bacteriose. **Coton Fibr. trop.**, v.25, n.3, p.375-380, 1970. In: REVIEW OF PLANT PATHOLOGY, London, v.50, abst 1250, 1971
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Expt. Sta Cir.**, 1950.
- LAGIÈRE, R. **El Algodon**. Barcelona, Editorial Blume, 1968. 292p.
- LAKSHMANAN, P.; MOHAN, S. Twig and stem blight of cotton caused by *Botryodiplodia theobromae*. **Plant Pathology**, Harpenden, v.38, n.2, p.290-292, 1989.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de Nutrição Mineral de Plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 251p.
- ODELL, D. E.; SMITH, J. A simple method for spore germination studies. **Bulletin of the British Mycological Society**, Cambridge, v.16, n.2, p.159-161, Oct. 1982.
- PIZZINATTO, M.A.; SOAVE, J.; CIA, E. Patogenicidade de *Botryodiplodia theobromae* Pat. a plantas de diferentes idades e maçãs de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, n.2, p.223-228. jun. 1983.

- PUNITHALIGAN, E. *Botryodiplodia theobromae*. s.l; 1976. (CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 519)
- SANDERS, D.E.; SNOW, J.P. Dispersal of airborne of boll-rotting fungi and the incidence of cotton boll rot. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, n.10, p.1438-1441, Oct. 1978
- SNOW, J.P.; SACHDEV, M.G. Scanning electron microscopy of cotton boll invasion by *Dyplodia gossypina*. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, n.5, p.589-591, May 1977.
- SOBREIRA, D.G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais**. Lavras: ESAL, 1988. 70 p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 111 p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- TU, C.C.; CHENG, Y.H. Studies on the sources of *Diplodia gossypina* Cooke for primary infection on cotton. **Pl. Prot. Bull. Taiwan**, v.12, n.4, p.147-151, 1970. In: REVIEW OF PLANT PATHOLOGY, London v.51, n.9, p.596, abst. 3384, Set. 1972.
- WANG, S.C.; PINCKARD, J.A Pectic enzymes produced by *Diplodia gossypina* in vitro and in infected cotton boll. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.8, p.1118-1124. Aug. 1971.
- WANG, S.C.; PINCKARD, J.A. Some biochemical factors associated with the infection of cotton fruit by *Diplodia gossypina*. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, n.4, p.460-465, Apr. 1972.

Capítulo 5. TRANSMISSIBILIDADE E EFEITOS DE *Botryodiplodia theobromae* Pat. A PARTIR DE SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.).

TRANSMISSIBILIDADE E EFEITOS DE *Botryodiplodia theobromae* Pat. A PARTIR DE SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.).

RESUMO

A inoculação de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro, semeadas em substrato ágar e solução nutritiva, causou morte pré-emergência e seca de plântulas. A análise de sementes naturalmente portadoras deste patógeno, mostrou sua presença nas sementes e plântulas mortas provenientes de testes de germinação em substrato papel e de emergência em solo. A infecção de sementes deslintadas quimicamente, em nível de 70%, foi obtida pela sua incubação por 24h sobre colônia de *B. theobromae* e a contaminação em nível de 70%, através da rolagem destas sobre a colônia. Estudos utilizando sementes artificialmente infectadas por *B. theobromae*, semeadas em substrato solo, mostraram que o patógeno causa morte em pré-emergência, sendo este efeito maior sob temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ que a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Este efeito do patógeno sobre a emergência foi menos drástico quando as sementes foram apenas contaminadas, devido à frequente retenção do tegumento no solo, sendo favorecido pela temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Quando o patógeno atingiu os tecidos de plântulas emergidas, causou sua seca e morte, sendo este efeito favorecido pela temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

SUMMARY

Transmissibility and effects of *Botryodiplodia theobromae* Pat in relation to cotton seeds.

Inoculation of cotton seeds with *B. theobromae* on agar nutrient medium resulted in death of seedlings in pre-emergence and post-emergence stages. Analysis of cotton seeds with natural incidence of *B. theobromae* showed the presence of this pathogen on seeds and on dead seedlings developed in germination test on paper and in the emergence test in soil. The infection of seeds, chemically delinted, at 70% level was obtained by keeping the seeds in direct contact with *B. theobromae* growing colonies, during 24h. The contamination of seeds, at 70% level, was also obtained by rolling the seeds for a while on the growing culture. Cotton seeds infected by *B. theobromae* were sowed in soil and there the pathogen was able to kill them in pre-emergence. This effect was higher at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, than at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The effect of *B. theobromae* on the seedling emergence was less observed when the seeds were only contaminated due to the frequent attachment of the seed coats in the soil and it was higher at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Whenever the pathogen was in contact with the seedling tissues, it was able to cause collapse of these parts. This effect was higher at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

INTRODUÇÃO

Muitos fungos são comumente detectados em sementes de algodoeiro destinadas ao plantio, constituindo esta associação um mecanismo eficiente para a sobrevivência e dispersão de algumas espécies patogênicas, em particular (Tanaka e Paolinelli, 1984; Tanaka, 1990).

Os fungos podem estar associados às sementes como contaminantes superficiais, ou infectando seus tecidos internos. Quando espécies patogênicas infectam as sementes, a probabilidade de serem transmitidas às plântulas emergentes é maior, garantindo, sob certas condições o rápido estabelecimento da doença nos estágios iniciais de desenvolvimento da cultura (Neergaard, 1979). De maneira geral, a contaminação superficial da semente por um fungo é mais sujeita a ação de alguns fatores que podem reduzir as chances de sua transmissão à progênie. Por exemplo, a germinação rápida e do tipo epígea, em que se constata a retenção do tegumento no solo, pode evitar a infecção precoce dos tecidos vivos, pelo patógeno (Henning & França Neto, 1980).

Informações de literatura mostram que o fungo *B. theobromae* é conhecido como patogênico aos frutos do algodoeiro, sendo responsável pelo seu apodrecimento (Bagga, 1970; Wang e Pinckard, 1971; Wang e Pinckard, 1972) e ocorre comumente em sementes de algodoeiro produzidas no Estado de Minas Gerais e em outras regiões do país (Bueno, 1986; Sobreira, 1988).

Em termos de influência de *B. theobromae* no desenvolvimento inicial do algodoeiro, nota-se que a carência de informações encontrada na literatura sobre este aspecto, é uma evidência da pouca atenção que este patógeno tem merecido.

Este estudo teve, portanto, por objetivo verificar os efeitos de *B. theobromae* sobre o desempenho de sementes de algodoeiro, bem como sua transmissibilidade a partir das sementes à progênie seguinte.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho constou de estudos conduzidos sob condições controladas de laboratório e em casa de vegetação telada, utilizando-se em todas as amostras de sementes de algodoeiro da cultivar IAC-20, produzida no Estado de Minas Gerais, safra 1992/93. Nos estudos em que as sementes foram inoculadas com *B. theobromae*, foram utilizadas amostras isentas de fungos patogênicos, previamente selecionadas pelo teste de sanidade, incubação em papel de filtro.

1. Efeitos de *B. theobromae* sobre a germinação de sementes de algodoeiro através de inoculação "in vitro".

As sementes utilizadas foram deslintadas quimicamente pela adição de 10 ml de ácido sulfúrico concentrado em cerca de 300 sementes, com agitação com bastão de vidro por dois a três minutos, e lavagem em água corrente. Após imersão, por dez minutos, em solução de bicarbonato de sódio 1% procedeu-se uma nova lavagem em água corrente. As sementes foram selecionadas por densidade em água, eliminando-se a fração flutuante e foram secas posteriormente sobre papel de filtro. Em seguida à desinfestação superficial por imersão durante

um minuto em hipoclorito de sódio 1%, as sementes foram assepticamente transferidas para tubos de ensaio 3 x 20cm, contendo ágar-solução de Hoogland (1950) completa, diluída 10 vezes, esterilizados, colocando-se uma semente por tubo. As sementes de quarenta tubos foram inoculadas com *B. theobromae*, colocando-se sobre cada uma um disco de ágar, 5 mm diâmetro, retirado da periferia de colônia do fungo, com sete dias de idade, em meio BDA (extrato de 200g de batata, 20g de ágar purificado Merck e 20g de dextrose/l), desenvolvida a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 12 h, sob luz negra Silvania 30W. Em quarenta outros tubos, sobre cada semente colocou-se um disco de meio BDA autoclavado. Os tubos foram incubados no escuro por 72h, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ até a emissão da radícula pelas sementes e posteriormente mantidos sob lâmpada luz do dia Grolux 40w, com fotoperíodo de 12h, por 15 dias. O fungo *B. theobromae* utilizado como inóculo, foi isolado de sementes de algodoeiro cultivar IAC-20, produzidas na região do Triângulo, Estado de Minas Gerais.

2. Germinação de sementes de algodoeiro portadoras de inóculo natural de *B. theobromae*.

Amostras de três lotes de sementes, com incidência natural de *Botryodiplodia theobromae*, foram selecionadas através da análise sanitária de 50 amostras. Sementes destas amostras, parte com linter e parte deslinterada quimicamente foram submetidas simultaneamente aos testes de sanidade - incubação em papel de filtro, de germinação padrão - rolo de papel, e emergência em substrato composto por solo e areia (1:1), fumigado e individualizado em sacos plásticos de 5 x 10cm de tamanho. Em cada teste foram utilizadas 200 sementes em 8 repetições

de 25. O deslincamento químico das sementes foi feito com ácido sulfúrico concentrado, conforme procedimento adotado no estudo anterior.

As sementes não germinadas e as plântulas anormais infeccionadas, provenientes dos testes de germinação em papel e de emergência em solo, foram incubadas por sete dias em câmara úmida ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sob lâmpada de luz negra e fotoperíodo de 12h, para identificação dos fungos presentes em cada uma. As percentagens de sementes não germinadas e plântulas anormais infeccionadas, com incidência de *B. theobromae*, foram determinadas em relação ao número total de sementes utilizadas em cada teste.

Para o teste de sanidade, as sementes foram semeadas em placas de plástico transparentes, com diâmetro de 15 cm, contendo três folhas de papel de filtro umidecidas em solução de 2,4-Diclorofenoxiacetato de sódio, 10 ppm. Em cada placa foram semeados 25 sementes e estas foram incubadas por sete dias em câmara a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12h, sob luz negra e então observadas ao microscópio estereoscópico, preparando-se lâminas para identificação do fungo ao microscópio composto, quando necessário. Para cada amostra determinou-se o percentual de sementes com incidência de *B. theobromae*.

Para o teste de germinação utilizou-se papel Germitest de 28 x 34 cm, sendo colocada em cada rolo 25 sementes e a incubação foi conduzida por quatro dias em germinador a 25°C . A avaliação do percentual de germinação foi realizada seguindo-se procedimentos prescritos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

O substrato utilizado no teste de emergência em solo foi fumigado pela aplicação de 264 ml de brometo de metila por m^3 , cobertura por 48h e aeração por 72h. Em cada saco plástico semeou-se uma semente à profundidade de 3 cm; estes foram colocados em bandejas e mantidos

por sete dias em casa-de-vegetação telada. Plântulas anormais infeccionadas e sementes não emergidas, foram em laboratório, removidas e lavadas antes da incubação.

3. Padronização de metodologia para inoculação artificial de sementes de algodoeiro por *B. theobromae*.

As sementes utilizadas foram deslintadas com ácido sulfúrico e selecionadas por densidade em água, conforme procedimento adotado no item 1.

O fungo utilizado como inóculo foi reisolado de maçãs de algodoeiro infectadas e cultivado por sete dias em meio BDA, em câmara com temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, sob lâmpada luz negra, Silvania 30W. Para obtenção da suspensão de esporos, *B. theobromae* foi cultivado em secções de maçãs de algodoeiro autoclavadas e mantidas em câmara úmida. Os picnídios produzidos foram macerados em almofariz com água esterilizada e filtrados em gase, sendo a concentração de esporos na suspensão ajustada para 10^6 conídios/ml, com auxílio da câmara de Neubauer.

Foram testados os seguintes procedimentos de inoculação, com base em estudos de Tanaka (1990): 1 - imersão rápida das sementes em suspensão de conídios do fungo; 2 - imersão rápida e posterior incubação das sementes por 24h a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob luz negra, Silvania 30W, com fotoperíodo de 12h; 3 - rolagem das sementes sobre colônias do fungo em meio de cultura; e 4 - incubação das sementes por 15h, 24h e 48h, sobre colônias de *B. theobromae* em desenvolvimento. Quando colocadas sobre colônias de *B. theobromae*, as sementes foram dispostas em uma única camada ocupando toda superfície exposta das colônias em crescimento no meio BDA, contido em placas de petri.

Duzentas sementes, por método de inoculação, foram submetidas ao teste de sanidade em papel de filtro, para verificar a presença de *B. theobromae*, sendo metade submetida ao pré-tratamento pela imersão em hipoclorito de sódio 1%, durante 5 minutos e secagem em seguida, sobre papel de filtro, em capela de fluxo laminar. Utilizou-se o esquema fatorial com 6 procedimentos de inoculação x 2 tratamentos de desinfestação superficial. Cada parcela experimental foi constituída por uma placa com 15cm de diâmetro contendo 25 sementes para o teste de sanidade e cada tratamento foi repetido quatro vezes. O delineamento experimental foi de blocos casualizados.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

4. Efeitos de *B. theobromae* na emergência de sementes de algodoeiro artificialmente infectadas.

Neste estudo, conduzido em casa-de-vegetação telada, avaliou-se a emergência de plântulas em substrato constituído por solo e areia (1:1), fumigado, utilizando-se sementes artificialmente deslintadas com ácido sulfúrico e infectadas por *B. theobromae*, com base nos resultados do estudo anterior.

Os tratamentos foram constituídos por amostras de sementes com diferentes níveis de inoculação, sendo: 0, 20, 40, 60, 80 e 100%, obtidos através da semeadura das sementes inoculadas, casualizada entre sementes livres do patógeno. Cada parcela experimental foi constituída por uma bandeja plástica de tamanho 10 x 40 x 60cm, contendo 50 sementes, sendo cada tratamento repetido quatro vezes. O delineamento experimental foi de blocos casualizados.

As sementes infectadas foram obtidas através da inoculação com *B. theobromae* em que as sementes foram mantidas em incubação por 24 horas em contato com a colônia deste fungo. As sementes não inoculadas (nível 0), permaneceram por 24h sobre meio BDA esterilizado.

As sementes foram semeadas à profundidade de 3cm, sendo avaliada a emergência de plântulas aos 14 dias da semeadura.

Neste estudo e nos subsequentes, o inóculo de *B. theobromae* utilizado foi proveniente de reisolamentos de maçãs de algodoeiro infectadas e multiplicado em meio BDA, por sete dias em câmara a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12h, sob lâmpada Silvania 30W.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

5. Efeitos de *B. theobromae* na emergência de sementes de algodoeiro artificialmente infectadas, sob duas condições de temperatura.

As sementes utilizadas neste estudo foram deslintadas com ácido sulfúrico e selecionadas pela densidade em água, eliminando-se a fração flutuante.

Foram estabelecidos como tratamentos, 0, 20, 40, 60, 80 e 100% de sementes inoculadas, em esquema fatorial, incluindo-se duas temperaturas: $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em câmaras de incubação com fotoperíodo de 12h, sob lâmpadas Grolux 40W.

A parcela experimental, número de repetições, delineamento, inoculação para obtenção de sementes infectadas e metodologia para instalação foram os mesmos descritos para o estudo anterior.

A avaliação da emergência de plântulas foi feita diariamente, considerando-se o estande inicial aos 14 dias e estande final aos 25 dias da semeadura. O índice de velocidade de emergência foi determinado pela somatória dos índices diários até os 14 dias da semeadura, calculados pela divisão do número de plântulas emergidas pelo número de dias decorridos da semeadura.

Ao final do período de incubação, porções de plântulas mortas foram superficialmente desinfestadas por imersão em etanol 96% durante 1 minuto e em hipoclorito de sódio 1%, seguido de lavagem em água esterilizada e incubação em meio BDA, para verificar a presença de *B. theobromae*.

Os dados obtidos para os parâmetros avaliados foram submetidos a análises de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

6. Efeitos de *B. theobromae* na emergência de sementes de algodoeiro, artificialmente contaminados e sob duas condições de temperatura.

Este estudo foi conduzido em esquema fatorial com 6 tratamentos constando de diferentes níveis de sementes inoculadas: 0, 20, 40, 60, 80 e 100% e duas temperaturas de incubação $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e $28 \pm 2^\circ\text{C}$. As sementes deslintadas e selecionadas, provenientes da amostra utilizada no estudo anterior, foram contaminadas por rolagem sobre colônias de *B. theobromae*, desenvolvidas em meio BDA. A parcela experimental, número de repetições, delineamento e metodologia para instalação foram os mesmos descritos no item 4.

Os dados obtidos para os parâmetros avaliados foram submetidos a análises de variância, após transformação por $\log(x + 10)$.

Para apresentação dos resultados oriundos dos estudos descritos nos itens 4, 5 e 6, feitos com tratamentos de diferentes níveis de inoculação, procedeu-se à correção dos níveis de infecção e dos níveis de contaminação, utilizando-se o índice de 70%, com base nos resultados obtidos para os diferentes procedimentos de inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Efeitos de *B. theobromae* sobre a germinação de sementes através de inoculação "in vitro".

Das sementes inoculadas "in vitro" 30% emitiram radícula e apenas 17,5% emitiram parte aérea, enquanto as não inoculadas apresentaram taxa de germinação de 100%. As plântulas provenientes das sementes inoculadas não desenvolveram raízes secundárias, apresentaram rápido escurecimento na região do colo e posteriormente, secam totalmente. Todas as plantas resultantes de sementes não inoculadas desenvolveram-se normalmente.

2. Germinação de sementes portadoras de inóculo natural de *B. theobromae*.

Os resultados da Tabela 1, mostram que os percentuais de sementes não germinadas e plântulas anormais infeccionadas, com incidência de *B. theobromae*, detectados no teste de germinação em papel (TPG), nas três amostras estudadas, exceto para sementes com linter da amostra 1, são razoavelmente aproximados aos percentuais de sementes portadoras do fungo, detectados através do teste de sanidade (TS) nas respectivas amostras. Estes resultados

evidenciam provável atuação de *B. theobromae* na deterioração das sementes de algodoeiro, como verificado também através da inoculação das sementes em tubos de ensaio.

TABELA 1. Níveis de incidência de *B. theobromae* em três amostras de sementes de algodoeiro, determinados pelo teste de incubação em papel de filtro, teste padrão de germinação em papel e teste de emergência em solo. ESAL - Lavras, 1994.

Amostras de sementes		Incidência de <i>Botryodiplodia theobromae</i> (%) ¹		
		TS	TPG ¹	TES ¹
1	s/linter	14.0	18.5	11.0
	c/linter	6.5	16.5	10.0
2	s/linter	22.0	24.5	21.5
	c/linter	20.0	19.0	10.0
3	s/linter	16.5	16.5	9.5
	c/linter	9.0	7.0	5.0

(1) - Valores relativos a sementes não germinadas e plântulas anormais infeccionadas. TS = Teste de sanidade; TPG = Teste padrão de germinação e TES = Teste de emergência no solo.

De forma semelhante, estudos realizados por Roncadori et al (1971) nos E.U.A. revelaram uma correlação significativa entre o nível de germinação das sementes de algodoeiro e os níveis de incidência, nestas amostras, de *Fusarium* sp e *B. theobromae*.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram também que os percentuais de sementes não germinadas e plântulas anormais infeccionadas, apresentando incidência de *B. theobromae*, detectados pelo teste de emergência em solo, foram em geral mais baixos que os percentuais de incidência do fungo detectados através dos testes de sanidade e de germinação padrão. Estes resultados podem ser atribuídos a diversos fatores, dos quais, posição do inóculo em relação aos tecidos das sementes, velocidade de emergência e maior proximidade física das sementes no teste de germinação (rolo de papel) devem ser considerados como os principais. Ainda a rápida emergência das sementes, quando se trata de contaminação, no solo, pode evitar o contato direto

das hifas fúngicas com os tecidos embrionários fazendo com que haja retardamento da morte de plântulas na fase inicial de desenvolvimento.

Fica evidenciado também que a incidência de *B. theobromae* em sementes com linter pode em alguns casos apresentar valores menores comparado com sementes sem linter. Neste sentido percebe-se que as informações de literatura são de certa forma discordantes decorrendo provavelmente da falta de conhecimento sobre fatores que interferem nessas circunstâncias como por exemplo a ação de organismos antagônicos a *B. theobromae*.

3. Padronização de metodologia de inoculação artificial de sementes de algodoeiro por *B. theobromae*.

Os resultados deste estudo estão contidos na Tabela 2.

TABELA 2. Incidência de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro inoculadas por diferentes métodos e detectada através da incubação em papel de filtro. ESAL - Lavras, 1994.

Métodos de inoculação	Incidência de <i>B. theobromae</i> (%)	
	Sementes desinfestadas	Sementes não desinfestadas
Sementes sobre colônia por 15h	30 b B	92 a A
Sementes sobre colônia por 24h	71 a B	100 a A
Sementes sobre colônia por 48h	84 a A	100 a A
Imer/susp.esporos, s/incubação	6 c B	86 a A
Imer/susp.esporos+incub.24h	61 a B	98 a A
Rolagem de sementes sobre colônia	5 c B	70 a A

CV= 5,1%. Médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O tratamento das sementes com hipoclorito de sódio teve como objetivo conhecer o nível de incidência de *B. theobromae* no interior das sementes, caracterizando a condição de infecção, conforme é assumido na patologia de sementes (Neergaard, 1979 e Machado, 1988). Por outro

lado, nos métodos de inoculação pela imersão das sementes em suspensão de esporos e de rolagem das mesmas sobre colônia de *B. theobromae*, a desinfestação imediata eliminou, como se previa, a possibilidade do crescimento do fungo e sua penetração nas sementes, caracterizando neste caso a condição de contaminação.

Os métodos de inoculação que permitiram o contato das sementes com o fungo por 24 e/ou 48h não diferiram significativamente entre si e promoveram um alto nível de infecção das sementes.

Quando se utilizou suspensão de esporos como inóculo, as sementes submetidas à análise sanitária apresentaram apenas crescimento micelial do fungo, no período de incubação estabelecido, sendo necessária a incubação por mais sete dias para permitir sua frutificação e identificação final. A utilização de micélio como inóculo propiciou o crescimento abundante e frutificação do fungo no período normal de incubação das sementes.

A exposição das sementes por 48h sobre a colônia fúngica, embora efetiva para obtenção de infecção constitui um tempo excessivamente longo, permitindo o início do processo germinativo, comprometendo a qualidade das sementes e causando transtornos ao seu manejo adicional. Desta forma, o método de exposição das sementes por 24h sobre colônia foi considerado como mais adequado para infecção artificial das sementes. Por sua vez, o método de rolagem das sementes sobre a colônia fúngica foi considerado adequado para contaminação pelo patógeno, em razão de sua simplicidade de execução e equiparidade de sua eficiência em termos de propiciar índice percentual de incidência do fungo pelo método de infecção. Em estudos semelhantes, visando a obtenção de sementes de algodoeiro infectadas por *Colletotrichum*

gossypii, Tanaka (1990) verificou que a exposição das sementes por 24h sobre colônias deste fungo foi também um método eficiente para garantir a sua infecção.

4. Efeitos de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro artificialmente infectadas.

Neste estudo, verificou-se morte em pré-emergência para a maioria das sementes, quando estas foram semeadas em substrato solo e areia sob condições de casa-de-vegetação telada (Figura 1).

As sementes não inoculadas (nível 0 de infecção), que permaneceram por 24h sobre meio BDA esterilizado, isento de *B. theobromae* apresentaram emergência média de 48% e à medida em que se aumentou a proporção de sementes infectadas houve aumento significativo na redução da emergência. Considerando-se o percentual de emergência das sementes não infectadas, como baixo, era de se esperar que a emergência nesse caso fosse nula no tratamento 70% de infecção. Entretanto, deve-se considerar que durante o período de inoculação o fungo pode ter infectado também sementes da fração inviável.

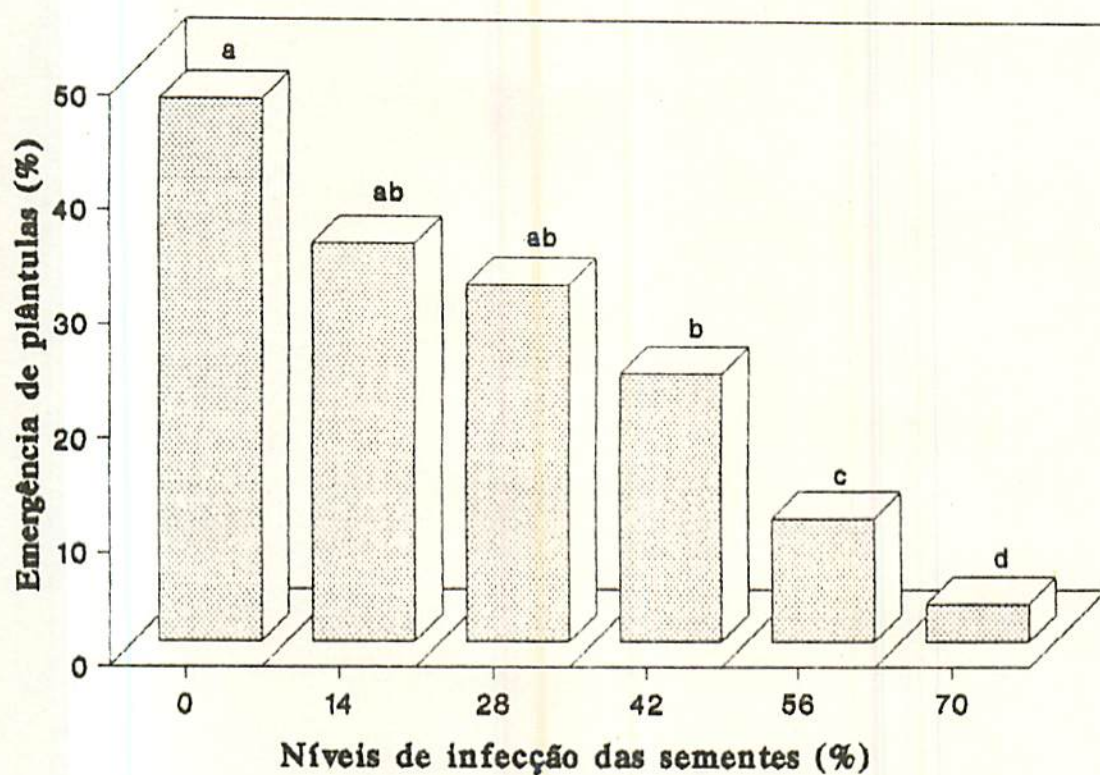


FIGURA 1. Efeitos de diferentes níveis de infecção de sementes de algodoeiro com *B. theobromae*, sobre a emergência de plântulas em substrato solo-areia (1:1), aos 14 dias da semeadura, sob condições de casa-de-vegetação telada. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV = 5,2%. ESAL - Lavras, 1994.

5. Efeitos de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro artificialmente infectadas ou artificialmente contaminadas, sob duas condições de temperatura.

A inoculação das sementes de algodoeiro com *B. theobromae* em duas condições de temperatura, fez com que houvesse morte em pré-emergência (estande inicial) e morte de plântulas emergidas (estande final), sendo estes efeitos em geral mais drásticos para as sementes infectadas em relação às contaminadas (Tabelas 3, 4 e 5).

Um dos aspectos que chamou a atenção no presente estudo foi que as sementes com maior densidade apresentaram maiores índices de viabilidade, conforme já demonstrado por Hofmann, Kittock e Alemayehu (1988). Como esta seleção, realizada com base na densidade em água, foi feita da mesma forma para as sementes utilizadas no experimento sobre desenvolvimento de métodos de inoculação (Tabela 2), estima-se que também neste caso as taxas de infecção e de contaminação tenham sido da ordem de 70%, de acordo com os métodos utilizados, constando de exposição sobre colônias do fungo por 24h e rolagem das sementes sobre colônias. Como foi discutido para o estudo de emergência de sementes infectadas, em casa-de-vegetação telada, deve-se considerar a possibilidade de presença do fungo em sementes já inviáveis, o que explicaria algumas diferenças entre os percentuais de sementes infectadas e reduções obtidas na emergência.

Em ambos os estudos 5 e 6, a presença de *B. theobromae* nos tecidos das plântulas mortas, foi confirmada pelos reisolamentos realizados em meio BDA.

Em termos comparativos entre as duas temperaturas utilizadas, com sementes infectadas, verificaram-se reduções significativas no estande inicial e no índice de velocidade de emergência, determinadas pela temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e pelos níveis mais altos de infecção pelo fungo. Deve-se considerar que esta temperatura é inadequada para a germinação das sementes de

TABELA 3. Efeitos de *B. theobromae* sobre o desempenho de sementes de algodoeiro em substrato solo, sob duas condições de temperatura (22 e 28°C). Sementes artificialmente infectadas. ESAL - Lavras, 1994.

Nível de infecção da amostra (%)	Estande inicial (%)		Estande final (%)		Ind. vel. emerg.	
	22°C	28°C	22°C	28°C	22°C	28°C
0	68.5 a	80.0 a	68.0 a	80.0 a	33.8 a	46.6 a
14	64.5 a	72.5 a	62.5 ab	44.0 ab	29.4 a	39.9 a
28	52.5 ab	69.5 ab	43.5 ab	61.5 ab	25.5 a	39.6 a
42	46.5 b	61.0 b	40.0 bc	47.0 bc	26.2 a	33.1 a
56	39.0 c	44.5 c	28.0 cd	34.5 cd	20.2 b	23.5 b
70	10.5 d	22.5 d	4.0 d	5.5 d	5.6 c	11.6 c
MÉDIAS	46.9 B	58.3 A	41.0 A	45.4 A	23.5 B	32.4 A
CV (%)	4,1		3,8		3,4	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, para cada determinação, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 4. Efeitos de *B. theobromae* sobre o desempenho de sementes de algodoeiro em substrato solo, sob duas condições de temperatura ambiente (22 e 28°C). Sementes artificialmente contaminadas. ESAL - Lavras, 1994.

Nível de contaminação da amostra (%)	Estande inicial (%)		Estande final (%)		Ind. vel. emerg.	
	22°C	28°C	22°C	28°C	22°C	28°C
0	78.0 abA	89.0 aA	78.0 a A	89.0 a A	41.4 abA	49.5 aA
14	83.5 a A	85.0 aA	76.0 a A	67.5 abA	44.4 a A	45.8 aA
28	77.0 abA	89.0 aA	66.5 abA	75.5 abA	41.9 abA	46.4 aA
42	74.0 abA	90.5 aA	56.0 abA	59.0 bcA	29.0 b B	48.4 aA
56	62.5 b B	79.5 aA	51.0 b A	43.0 c A	32.1 abB	44.2 aA
70	82.0 a A	73.0 aA	69.5 abA	23.5 d B	46.6 a A	36.9 aA
MÉDIAS	76.2 B	84.3 A	66.2 A	59.6 B	39.1 B	45.2 A
CV (%)	2,4		3,8		3,4	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, para cada parâmetro avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 5. Percentuais de redução na taxa de emergência em função dos níveis de inoculação e percentuais de plântulas mortas, obtidas pela comparação do estande inicial e estande final, em cada nível de inoculação, das sementes, sob as temperaturas de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (T_1) e $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (T_2). ESAL - Lavras, 1994.

Nível de infecção/ contaminação das sementes (%)	Redução na emergência (%)				Plântulas mortas (%)			
	Sementes infectadas		Sementes contaminadas		Sementes infectadas		Sementes contaminadas	
	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2
0								
14	0.0	9.4	0.0	4.5	3.1	39.3	9.0	20.6
28	23.0	13.1	1.3	0.0	17.1	11.5	13.6	15.2
42	32.1	23.8	5.1	0.0	14.0	22.9	24.3	34.9
56	43.1	44.4	19.9	10.7	28.2	22.5	18.4	45.9
70	84.6	71.0	0.0	18.0	61.9	75.6	15.2	67.8

algodoeiro, que de acordo com as Regras para Análise de Sementes apresentam um ótimo entre 25 e 30°C (Brasil, 1992). O estande final foi reduzido apenas em função do aumento nos níveis de infecção das sementes.

As sementes contaminadas apresentaram menores índices de morte em pré-emergência em relação às infectadas (Tabela 5). É provável que a contaminação superficial tenha dificultado o contato direto do fungo com os tecidos embrionários, devido à rápida germinação e à retenção mais frequente dos tegumentos no solo. Entretanto, a contaminação dos tecidos das plântulas emergidas, resultou em sua morte posterior.

No estudo utilizando sementes contaminadas, sob duas condições de temperatura, foram verificadas interações significativas entre os níveis de contaminação e temperaturas estudadas, para todos os parâmetros avaliados (Tabela 4). Reduções significativas na emergência, em função dos níveis de contaminação, ocorreram apenas na temperatura de 22°C. Este efeito pode ser atribuído ao atraso ocorrido na germinação das sementes nesta temperatura, permitindo provavelmente tempo suficiente para o contato do fungo com os tecidos embrionários e refletiu-se também nos resultados de índice de velocidade de emergência. A morte de plântulas pós-emergência foi significativamente favorecida pela temperatura mais elevada.

O efeito da temperatura de 22°C, favorecendo o contato do fungo com o embrião e morte em pré-emergência pode também ser verificado para as sementes infectadas, em que a redução de 84,6% na emergência extrapolou o índice esperado de 70%.

Considerando-se os tratamentos extremos para os níveis de inoculação: 0% e 100% de sementes inoculadas e real a taxa de 70% de infecção ou contaminação, ressaltando-se o efeito de aumento neste nível a 22°C, verifica-se que ao infectar as sementes, *B. theobromae* foi capaz de

causar sua morte pré-emergente na proporção de 1:1 (sementes infectadas e morte em pré-emergência, respectivamente). Quando presente apenas como contaminante superficial, esta taxa foi variável, em função do tempo necessário para emergência, temperatura e possivelmente da localização do inóculo na superfície das sementes que também pode favorecer a contaminação dos tecidos vivos.

CONCLUSÕES

1 - O fungo *B. theobromae* é capaz de causar morte de sementes e plântulas de algodoeiro, por ocasião do teste de germinação, em substrato de papel.

2 - A infecção artificial de sementes de algodoeiro, por *B. theobromae*, pode ser obtida em nível de 70% através da exposição das sementes, por 24h, sobre colônias do fungo em desenvolvimento em meio BDA com incubação em torno de 21°C e fotoperíodo de 12 horas.

3 - A contaminação superficial de sementes de algodoeiro por *B. theobromae*, em taxa de 70%, pode ser obtida mais rapidamente pelo rolamento das sementes sobre colônias do fungo em desenvolvimento em meio de cultura.

4 - A infecção de sementes de algodoeiro por *B. theobromae* causa morte em pré-emergência, na proporção de 1:1.

5 - A contaminação superficial de sementes de algodoeiro, por *B. theobromae*, permite a emergência de plântulas no solo e pode causar morte em pré-emergência, em taxas variáveis em função da temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGGA, H.S. Pathogenicity studies of organisms involved in the cotton bold-rot complex. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, n.1, p.158-160, Jan. 1970
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- BUENO, J.T. **Influência de genótipo e local de produção na incidência de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado do Paraná**. Piracicaba: ESALQ, 1986. 99p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, Problemas na avaliação da germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília v.2, n.3, p.9-22, 1980.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Expt. Sta Cir.**, 1950.
- HOFMANN, W.C.; KITTOCK, D.L.; ALEMAYEHU, M. Planting seed density in relation to cotton emergence and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v.80, p.834-837, Sep./Oct. 1988.
- MACHADO, J.C. **Patologia de Sementes** - Fundamentos e aplicações. Lavras: Ministério da Educação, 1984. 105p.
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. Londres, Macmillan Press, 1979. v.1, 839p.
- RONCADORI, R.W.; Mc CARTER, S.M.; CRAWFORD, J.L. Influence of fungi on cotton seed deterioration prior to harvest. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, p.1326-1328, Nov. 1971.

- SOBREIRA, D.G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais.** Lavras: ESAL, 1988. 70 p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro.** Piracicaba: ESALQ, 1990. 111 p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- TANAKA, M.A.S. & PAOLINELLI, G. de P. Avaliação sanitária e fisiológica de sementes de algodão produzidas em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.6, n.1, p.71-81, jan./abr. 1984.
- WANG, S.C. & PINCKARD, J.A. Pectics enzymes produced by *Diplodia gossypina* in vitro and in infected cotton bolls. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.8, p.1118-1124, Aug. 1971.
- WANG, S.C. & PINCKARD, J.A. Some biochemical factors associated with the infection of cotton fruit by *Diplodia gossypina*. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, n.4, p.460-465, Apr. 1972.

**Capítulo 6. SOBREVIVÊNCIA DE *Botryodiplodia theobromae* Pat.
ASSOCIADA A SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium
hirsutum* L.) NO SOLO.**

SOBREVIVÊNCIA DE *Botryodiplodia theobromae* Pat. ASSOCIADA A SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.) NO SOLO.

RESUMO

Sementes de algodoeiro, com incidência natural de *B. theobromae*, constatada através da incubação em papel de filtro, foram transferidas para solo e aí mantidas pelo período de um ano. As sementes inteiras ou em fragmentos, foram mensalmente removidas do solo e incubadas em meio batata-dextrose-ágar, avaliando-se a viabilidade do fungo. Em condições de laboratório foi utilizado solo autoclavado e não autoclavado, com umidades gravimétricas de 5 e 20%, contido em recipientes plásticos. Em condições de campo, as sementes contendo o fungo foram colocadas em sacos de tela plástica e enterradas à profundidade de 3cm. O estudo teve início em época coincidente com o período de plantio do algodoeiro no Estado de Minas Gerais. A sobrevivência do fungo foi constatada até o final do período de avaliação, 1 ano, sob todas as condições estudadas, embora tenha sido registrada redução quantitativa desta sobrevivência em função do tempo. Em laboratório, a sobrevivência foi favorecida pela umidade de 20%. Os resultados obtidos permitem concluir que sementes infectadas levadas ao campo, constituem um dos mecanismos importantes de sobrevivência do fungo no solo, entre períodos consecutivos de cultivo do algodoeiro.

SUMMARY

Survival of *Botryodiplodia theobromae* Pat associated with cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds in soil.

Cotton seeds with natural incidence of *B. theobromae* detected by blotter test, were transferred to soil with different moisture contents and there maintained during for one year. The whole seeds or fragments of them were monthly removed from soil and aseptically incubated on potato-dextrose-agar medium for the evaluation of viability of that fungus. Under laboratory conditions the substrate consisted of natural and autoclaved soil, having 5 and 20% of moisture content, in plastic bags. Under field conditions the infected seeds were placed in net plastic bags and these buried at 3cm depth. This study was set up at the cotton sowing time in the State of Minas Gerais, Brazil. The results showed that *B. theobromae* survived throughout the storage period at all conditions studied, although the amount of inoculum had quantitatively declined in the course of the storage period. At laboratory, the survival was longer in soil with higher moisture content compared with lower moisture content. These results lead to the conclusion that seeds infected by *B. theobromae* sown in the cropping field constitute an important survival mechanism to this fungous between planting seasons.

INTRODUÇÃO

O fungo *Botryodiplodia theobromae* é um patógeno com ampla gama de hospedeiros, ocorrendo em mais de 500 espécies vegetais, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo reconhecido como agente importante de apodrecimento dos órgãos que ataca (Punithaligan, 1976). O apodrecimento dos frutos do algodoeiro, causado por *B. theobromae*, pode tanto impedir sua deiscência como permitir sua abertura, fazendo com que fibras de má qualidade e sementes portadoras do patógeno sejam produzidas (Lagiere, 1968; Bagga, 1970; Oliveira et al., 1993). Quando o fungo ocorre nas sementes desta cultura, seu inóculo pode ser encontrado nos tecidos embrionários (Roncadori et al., 1971). As sementes infectadas morrem em fase de pré-emergência e quando tecidos das plântulas emergidas são atingidos, estas sofrem seca total (Oliveira, Machado e Andrade, 1993). Vários estudos têm mostrado que este patógeno não causa danos significativos às partes vegetativas de plantas adultas inoculadas, embora possa sobreviver por várias semanas confinado em pequenas lesões nos tecidos destas plantas (Pizzinatto, Soave e Cia, 1983; Oliveira et al., 1993).

Estudos sobre a disseminação do fungo através de esporos pelo ar e avaliações simultâneas da ocorrência de podridão das maçãs em cultivos de algodoeiro, têm revelado que *B. theobromae* encontra-se entre as espécies mais frequentemente disseminadas por esta via e que, entretanto, a massa de inóculo inicial não provém de frutos infectados, sendo sua origem sugerida a partir de detritos de plantas de algodoeiro remanescentes no solo (Sanders e Snow, 1978). De acordo com Tu e Cheng (1970) *B. theobromae* sobreviveu seis meses em associação com frutos de algodoeiro na superfície do solo ou enterrados. Ainda, de acordo com estes autores, plantas

daninhas e várias espécies cultivadas mostraram-se susceptíveis a isolados de *B. theobromae* do algodoeiro, sugerindo serem estas possíveis fontes de inóculo para disseminação do patógeno em áreas cultivadas. Outros estudos mostram que *B. theobromae* é capaz de sobreviver no solo, isoladamente ou em associação com tecidos vegetais hospedeiros, por vários meses (Aderiye e Ogunda, 1986; Lo e Clark, 1988).

Do ponto de vista epidemiológico o papel de sementes não germinadas, infectadas por este patógeno, no solo é desconhecido.

Neste estudo o objetivo foi avaliar a sobrevivência de *B. theobromae* associada a sementes de algodoeiro em solo natural e esterilizado, mantidos sob duas condições controladas de umidade e em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de algodoeiro com incidência natural de *Botryodiplodia theobromae* foram colocadas em solo sob condições de campo e em solo contido em recipientes plásticos, mantidos em ambiente de laboratório. Durante o período de um ano e a cada 30 dias, frações dessas amostras, foram assepticamente transferidas para meio batata-dextrose-ágar, com a finalidade de avaliar a sobrevivência do fungo neste material.

Em laboratório utilizou-se solo natural e solo autoclavado a 121°C, 1,5 atm, durante duas horas, com umidades gravimétricas mantidas em 5 e 20%, utilizando-se como recipientes sacos plásticos de 5 x 10cm. As porções de solo autoclavado e de solo não autoclavado foram inicialmente secas à sombra e os teores de água foram determinados pelo método de pesagem de

uma amostra composta, antes e após secagem em estufa a 60°C. A quantidade de solo colocada em cada saco plástico foi pesada. Mensalmente, através de pesagens, procedeu-se à correção da umidade pela adição de água, quando necessário. Em cada saco plástico colocou-se uma semente contendo *B. theobromae*, à profundidade de 3cm e estes foram colocados em bandejas plásticas, devidamente identificados. Cada tratamento foi repetido doze vezes, em duas parcelas de sete sementes, totalizando 672 sacos plásticos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Para determinação da sobrevivência em condições de campo, as sementes com o fungo foram individualmente colocadas em sacos de 3 x 10cm, confeccionados com tela plástica contendo 16 orifícios por cm² e estes foram enterrados à profundidade de 3cm, em canteiros, em área experimental da Escola Superior de Agricultura de Lavras. Foram semeadas 120 sementes sendo utilizadas dez em cada avaliação mensal.

As sementes com incidência de *B. theobromae* foram selecionadas através do teste de sanidade em papel de filtro, sendo estas pertencentes à cultivar IAC-20 e produzidas na região do Triângulo, Estado de Minas Gerais. As sementes foram deslintadas utilizando-se ácido sulfúrico na base de 10 ml de uma solução concentrada em cerca de 300 sementes, sob agitação com bastão de vidro durante dois a três minutos e lavagem em água corrente. Em seguida as sementes, deslintadas, foram imersas em solução de bicarbonato de sódio 1%, durante dez minutos, novamente lavadas em água corrente e secas sobre papel de filtro. Em cada placa de petri de plástico transparente, diâmetro de 15cm, contendo três folhas de papel de filtro umedecidas em 2,4-Diclorofenoxiacetato de sódio, 10 ppm, foram semeadas 25 sementes. As placas foram incubadas por sete dias em câmara com temperatura $21 \pm 2^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 12h utilizando-se

lâmpada de luz negra, Silvania 30W. As sementes foram examinadas sob microscópio, para identificação dos fungos presentes e aquelas com incidência de *B. theobromae* foram transferidas para placas de petri de vidro e armazenadas a 10°C, até sua utilização.

Para avaliação da sobrevivência do fungo associada às sementes mantidas em solo, estas foram individualmente transferidas, íntegras ou em fragmentos, para placas de petri de vidro, diâmetro de 9cm, contendo meio batata-dextrose-ágar, esterilizado, sendo incubadas por 15 dias, sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade utilizadas nos teste de sanidade. Em cada placa de petri colocou-se a semente (ou fragmentos) proveniente de um saco ou tela plástica e verificou-se a presença ou ausência do fungo. Mensalmente determinou-se em cada parcela experimental o número de sementes em que o fungo se encontrava sobrevivente.

Este estudo teve início no mês de outubro de 1991, época coincidente com a época de plantio de algodoeiro, no Estado de Minas Gerais, sendo finalizado em outubro de 1992.

As médias de temperatura e umidade relativa mensais, obtidas em determinações diárias feitas na Estação Climatológica no campus da Escola Superior de Agricultura de Lavras, durante o período de condução do estudo, encontram-se na Figura 1.

Os dados obtidos para a sobrevivência sob condições de laboratório foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos a análises de variância e regressão polinomial. Os dados obtidos em campo foram submetidos à análise de regressão.

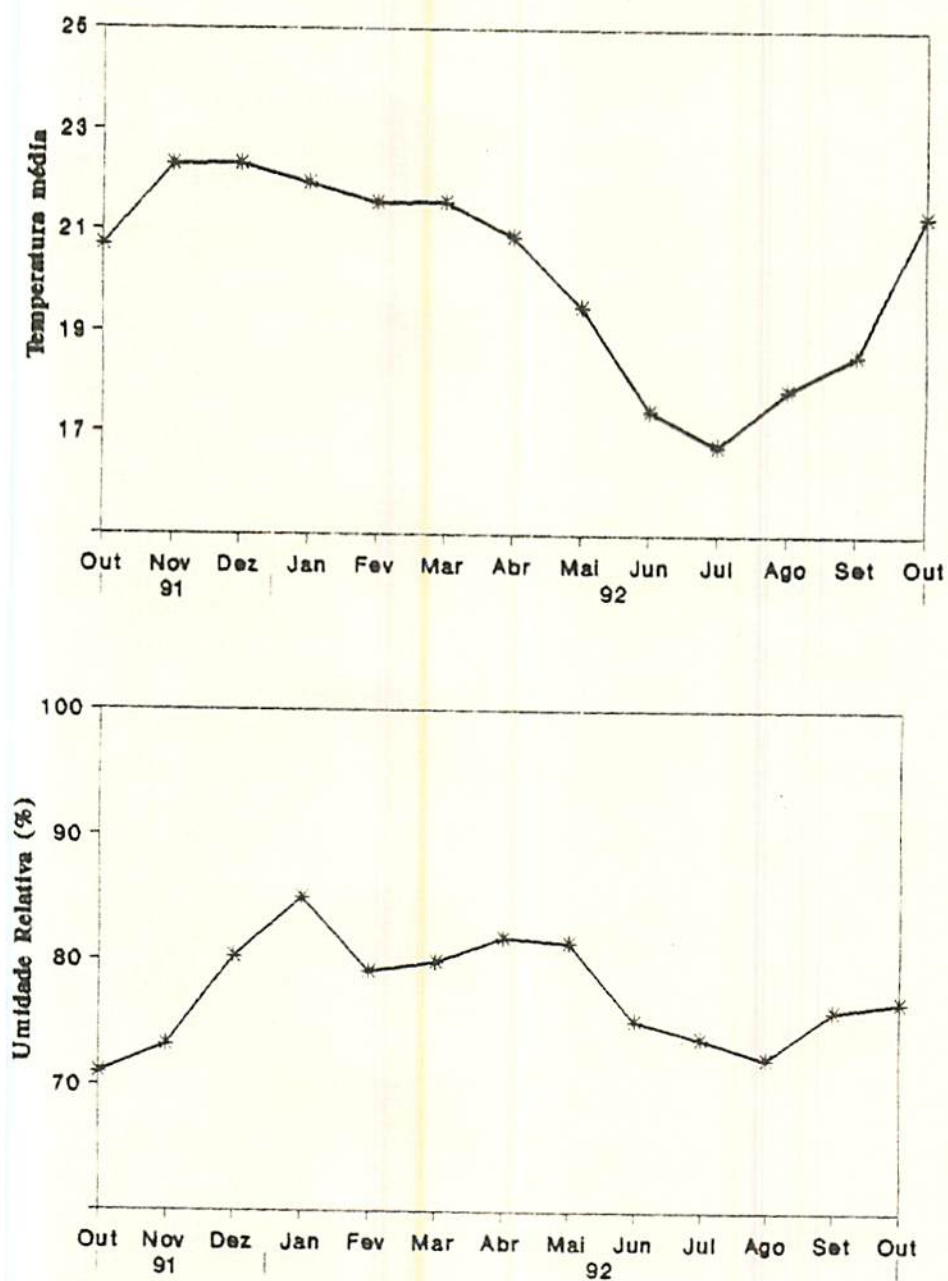


FIGURA 1. Temperaturas e umidades relativas médias mensais, obtidas por determinações diárias na Estação Climatológica, do campus da Escola Superior de Agricultura de Lavras. ESAL - Lavras, 1994.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Colônias de *B. theobromae* foram desenvolvidas em meio BDA a partir das sementes ou fragmentos das sementes recuperadas do solo, em todas as avaliações e condições estudadas. Entretanto, este crescimento nem sempre ocorreu em todas as sementes ou fragmentos examinados, verificando-se redução na sobrevivência em função do tempo (Figuras 2 e 3).

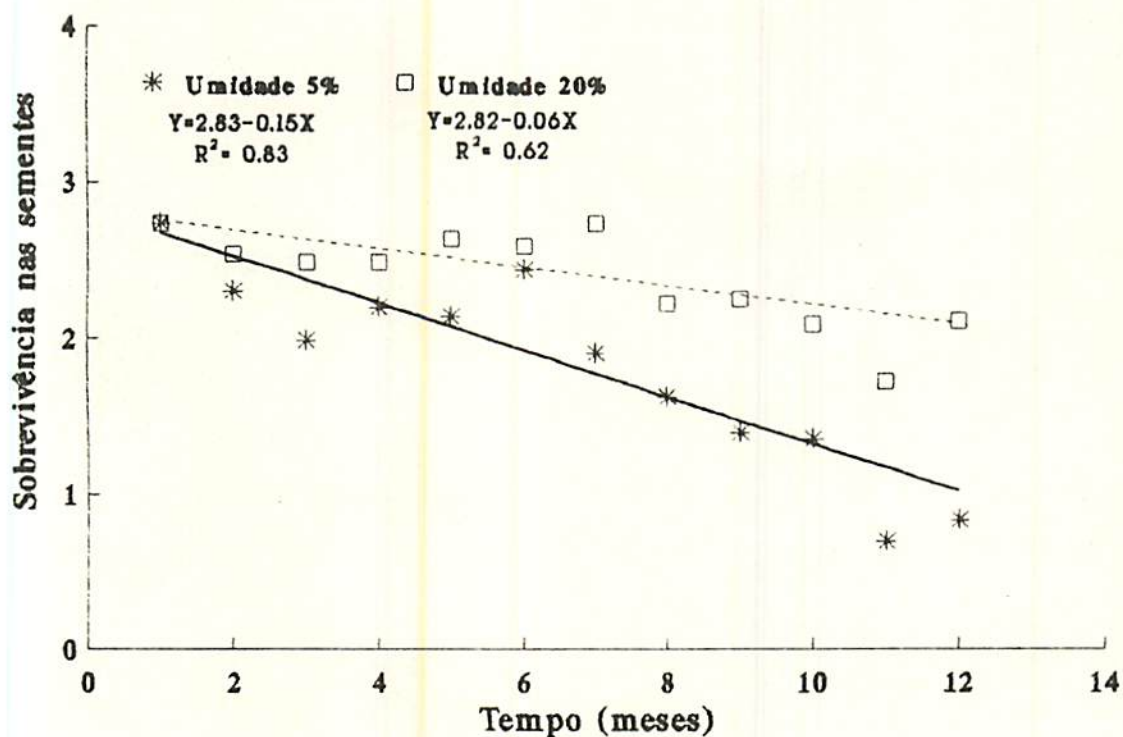


FIGURA 2. Sobrevivência de *B. theobromae* associada a sementes de algodoeiro em solo esterilizado e não esterilizado, com umidades gravimétricas de 5 e 20%, durante um ano, em condições de laboratório. ESAL - Lavras, 1994

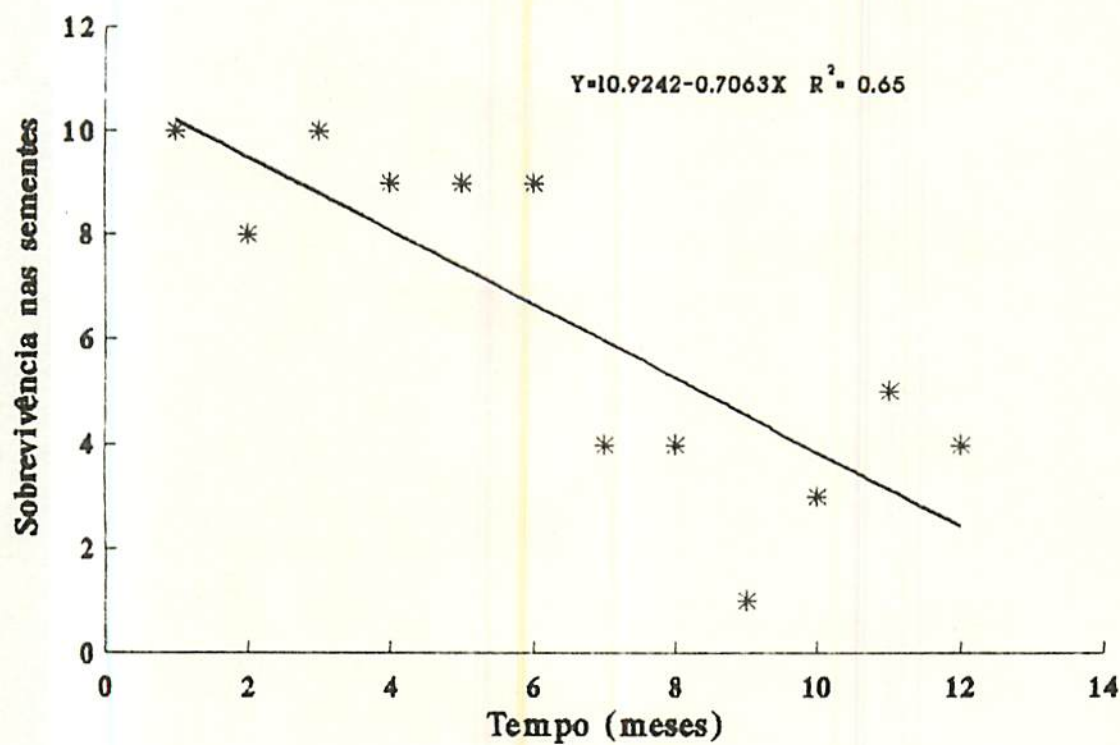


FIGURA 3. Sobrevivência de *B. theobromae* associada a sementes de algodoeiro, em solo, no campo, durante um ano. ESAL - Lavras, 1994.

No presente estudo a autoclavagem do solo não exerceu efeito sobre o nível de ocorrência de *B. theobromae*, sendo evidenciado que a sobrevivência de *B. theobromae* não sofreu influência de outros microorganismos, possivelmente presentes no solo não autoclavado. Nos reisolamentos feitos em meio BDA observou-se muitas vezes o crescimento de *Fusarium* spp. e de *Trichoderma* sp. em placas com crescimento de *B. theobromae*, não sendo observados efeitos indicativos de antagonismo entre estes fungos. Em termos comparativos, determinou-se que a umidade

gravimétrica de 20% do solo, foi favorável à sobrevivência do fungo, em relação à umidade gravimétrica de 5%.

Relatos de outros autores, considerando *Botryodiplodia theobromae* e outros hospedeiros, têm focado a sobrevivência deste fungo sob circunstâncias variadas. Por exemplo, Aderye e Ogunda 1986 verificaram que *B. theobromae* foi capaz de sobreviver até cinco meses no solo, na forma de conídios incorporados a substrato composto de pó de inhame e areia. Observaram esses autores que o fungo sobrevivia através de formações de clamidosporos e microconídios. Lo e Clark (1988), verificaram também que *B. theobromae*, patogênico à batata doce, sobreviveu no solo por um ano, na forma de conídios. Neste estudo, com sementes de algodoeiro, considera-se possível que a sobrevivência do fungo tenha sido assegurada na forma de micélio dormente e clamidosporos, associados aos tecidos internos das sementes e/ou na forma de conídios, no interior dos picnídios subestromáticos que haviam sido formados nas sementes.

A viabilidade do inóculo de *B. theobromae* mantida em associação com os tecidos das sementes de algodoeiro no solo, constatada neste trabalho, permite inferir que as sementes infectadas, quando levadas ao campo e que morrem em pré-emergência (Oliveira, Machado e Andrade, 1993), podem constituir fonte de inóculo primário para infecção dos frutos na época de sua formação e maturação. O algodoeiro herbáceo possui um ciclo reprodutivo de cinco a seis meses e assim, a permanência do fungo por um ano no solo, é um período suficiente para seu retorno às plantas. É previsível admitir que as sementes enterradas no solo possam ser retornadas à superfície pela ação da chuva e de implementos utilizados durante o cultivo. Nestas circunstâncias, o fungo poderia retornar à planta em sua forma conidial, pela ação do vento, ou poderia ser transportado por algum vetor casual, como contaminante.

Considerando-se estes aspectos, a prática de erradicação de soqueira, em áreas de cultivo de algodoeiro, pode ser particularmente importante, como medida para redução do inóculo primário deste patógeno.

CONCLUSÕES

1 - *B. theobromae* foi capaz de sobreviver durante o período de 12 meses em sementes de algodoeiro no solo, sendo esta sobrevivência reduzida em função do tempo e favorecida pela umidade gravimétrica de 20%, em relação à de 5%.

2 - A utilização de sementes de algodoeiro, infectadas por *B. theobromae*, para semeadura no campo de cultivo, pode constituir um meio de sobrevivência do fungo e tornar-se uma fonte de inóculo primário para o cultivo subsequente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERIYE, B.I. & OGUNDA, S.K. Form of survival of *Botryodiplodia theobromae* in the soil. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.39, n.2, p.249-252, June 1986.

BAGGA, H.S. Pathogenicity studies of organisms involved in the cotton boll-rot complex. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, n.1, p.158-160, Jan. 1970.

LAGIÈRE, R. **El Algodon**. Barcelona, Editorial Blume, 1968. 292 p.

LO, J.Y.; CLARK, C.A. Sources of inoculum and infection courts of *Diplodia gossypina* on sweet potato. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.11, p.1442-1446, Nov.1988.

- OLIVEIRA, E.; MACHADO, J.C. & ANDRADE, G.A.F. Patogenicidade de *Botryodiplodia theobromae* a sementes de algodoeiro. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.3, n.3, p.93, jun 1993.
- OLIVEIRA, E.; MACHADO, J.C.; PEREIRA, L.A.A.; ALVES, W.L. Patogenicidade de *Botryodiplodia theobromae* a plantas de algodoeiro e transmissão para as sementes. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.3, n.3, p.88, jun 1993.
- PIZZINATTO, M.A.; Soave, J. & CIA, E. Patogenicidade de *Botryodiplodia theobromae* Pat. a plantas de diferentes idades e maçãs de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, n.2, p.223-228, jun. 1983.
- PUNITHALINGAN, E. *Botryodiplodia theobromae*. s.l, 1976. (CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 519).
- RONCADORI, R.W.; Mc CARTER, S.M.; CRAWFORD, J.L. Influence of fungi on cotton seed deterioration prior to harvest. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, p.1326-1328, Nov, 1971.
- SANDERS, D.E.; SNOW, J.P. Dispersal of airborne of boll-rotting fungi and the incidence of cotton boll rot. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, n.10, p.1438-1441, Out. 1978.
- TU, C.C.; CHENG, Y.H. Studies on the sources of *Diplodia gossypina* Cooke for primary infection on cotton. **Pl. Prot. Bull. Taiwan**, v.12, n.4, p.147-151, 1971. In: REVIEW OF PATHOLOGY, London v.51, n.9, p.596, abst. 3384, Set. 1972.

**Capítulo 7. SENSIBILIDADE DE *Botryodiplodia theobromae* Pat. A
FUNGICIDAS “IN VITRO” E INCORPORADOS A
SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.).**

SENSIBILIDADE DE *Botryodiplodia theobromae* Pat. A FUNGICIDAS "IN VITRO" E INCORPORADOS A SEMENTES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.).

RESUMO

O presente trabalho visou avaliar o comportamento de *B. theobromae* na presença dos fungicidas benomil, thiabendazol, carbendazim, carboxin, iprodione, thiram e mistura de carboxin e thiram, em meio de cultura e em sementes de algodoeiro infectadas pelo patógeno. Em meio de cultura a eficácia dos produtos foi comparada nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 ppm, sendo o crescimento micelial do fungo avaliado até 15 dias de incubação. Após 48h de incubação, apenas thiram não apresentou efeito repressor sobre o crescimento micelial de *B. theobromae*. Dentre os fungicidas sistêmicos, thiabendazol, benomil e carbendazim exerceram os efeitos mais acentuados no crescimento das colônias fúngicas. Apenas carbendazim foi capaz de manter o efeito inicial sobre o fungo durante 15 dias de incubação. Os fungicidas benomil e carbendazim destacaram-se no controle de *B. theobromae* em sementes, possibilitando maior germinação, emergência e sobrevivência de plântulas. Sementes com incidência natural de fungos patogênicos e saprófitas foram tratadas com carbendazim 10%, em dosagem de 20g i.a./100kg de sementes. Este tratamento foi efetivo em erradicar os fungos nas sementes submetidas ao teste de sanidade, promoveu maior taxa de germinação, em substrato papel, e de emergência em solo, sendo porém ineficaz no controle de *Colletotrichum gossypii*.

SUMMARY

Sensitivity of *Botryodiplodia theobromae* Pat. to fungicides "in vitro" and in cotton seeds.

The purpose of this study was to evaluate *B. theobromae* behaviour in the presence of the fungicides benomil, thiabendazol, carbendazin, carboxin, iprodione, thiram and mixture of carboxin and thiram, all incorporated to medium culture and on the cotton seeds infected with this pathogen. The effectiveness of these products 'in vitro' was compared at 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 and 8,0 ppm concentrations. Mycelial growth of *B. theobromae* was evaluated during 15 days incubation. After 48h incubation, only thiram did not present any repressing effect on the *B. theobromae* mycelial growth. Among the sistemic fungicides, thiabendazol, benomil and carbendazin presented higher reduction on the fungal colony. Only carbendazin was able to keep the repressing effect on the fungal growth during 15 days of incubation. The fungicides benomil and carbendazin were the most effective treatments in the control of *B. theobromae* on cotton seeds and provided better conditions for higher germination, emergence and seedling development. Cotton seeds with natural incidence of pathogenic fungi were treated with carbendazin 10% at 20g a.i./100kg seeds. This treatment was effective to eradicate the fungi present in the seeds when they were submitted to blotter test. Higher germination rate on paper and better emergence in soil were also observed in that treatment.

INTRODUÇÃO

O controle preventivo de doenças vegetais, através da exclusão de seus agentes etiológicos, é certamente uma das medidas mais efetivas para garantir o bom desenvolvimento e performance das plantas no campo. Sob este aspecto, a utilização de sementes sadias, livres de patógenos, pode contribuir em grande parte para evitar o surgimento de doenças já nas fases iniciais de germinação e crescimento da cultura. Entretanto, nem sempre é possível conseguir a total isenção de patógenos nestes propágulos vegetais e além disto, deve-se considerar a possível presença do inóculo no solo e em plantas presentes nas proximidades da área de cultivo. Assim, recorre-se frequentemente ao tratamento químico das sementes, visando não apenas o controle de patógenos nelas presentes, mas também sua proteção para aqueles que possam atingi-las e às plântulas emergidas, após a semeadura (Jeffs, 1986).

Vários fungicidas são recomendados para o tratamento de sementes de algodoeiro (Organização Andrei, 1987) porém, os fungos sensíveis à sua ação, relacionados pelos fabricantes, não incluem *B. theobromae*. Este patógeno causa o apodrecimento de frutos do algodoeiro (Bagga, 1970) e quando presente nas sementes, causa sua morte em pré-emergência ou a morte de plântulas emergidas, (Oliveira, Machado e Andrade, 1993). Sua presença em amostras de sementes de algodoeiro é frequente, podendo atingir níveis de ocorrência da ordem de 78% de sementes contaminadas e ou infectadas (Sobreira, 1988).

O objetivo deste estudo foi avaliar a reação de *Botryodiplodia theobromae* a fungicidas "in vitro" e quando incorporados a sementes de algodoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Como fonte de fungicidas selecionados para este estudo foram utilizados os produtos indicados na Tabela 1.

TABELA 1. Produtos utilizados nos estudos sobre sensibilidade de *Botryodiplodia theobromae* a fungicidas "in vitro" e no tratamento de sementes de algodoeiro infectadas por este patógeno. ESAL - Lavras, 1994.

Nome comercial dos fungicidas	Nome técnico (i.a.)	Concentração i.a. (%)	Fabricante
Benlate PM	benomil	50	Du Pont
Tecto 100 PM	thiabendazol	10	Merck Sharp & Rohme
Carbendazim PM	carbendazim	10	Du Pont
Vitavax PM	carboxin	75	Uniroyal
Rovral PM	iprodione	50	Rhodia
Rhodiauram PM	thiram	70	Rhodia
Vitavax-thiram PM	carboxin + thiram	75	Uniroyal

1. Crescimento de *B.theobromae* em meio de cultura contendo fungicidas.

Os fungicidas foram incorporados ao meio de cultura em concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 ppm de ingrediente ativo (i.a.). Utilizou-se o meio BDA (extrato de 200g de batata, 20g de agar purificado Merck e 20g de dextrose/l) e a incorporação foi feita após a autoclavagem, quando o meio atingiu temperatura de cerca de 50°C, em câmara asséptica de fluxo laminar. Após adição dos fungicidas, os meios foram distribuídos em placas de petri com diâmetro de 9cm, em quantidades de 20ml por placa. Ao centro de cada placa contendo meio colocou-se um disco de meio BDA, 5mm de diâmetro, com crescimento de *B. theobromae*, face voltada para a superfície

do meio. Estes discos foram retirados da margem de colônia do fungo, cultivado por cinco dias em meio BDA, após reisolamento de maçã de algodoeiro infectada. As placas semeadas e vedadas com parafilme, foram incubadas em câmara com temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo de 12h sob lâmpada de luz negra Silvania 30W. Cada tratamento foi repetido quatro vezes, sendo a parcela experimental constituída por uma placa. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados.

O diâmetro médio das colônias de *B. theobromae* foi determinado em cada placa, a intervalos de 24h, a partir do início da incubação. Para isto, foram consideradas duas linhas ortogonais no verso de cada placa, efetuando-se as medições nestas direções e descontando-se o diâmetro de 5mm, do inóculo inicial.

Os dados de crescimento obtidos em 48h de incubação foram submetidos a análises de variância, após transformação por $\sqrt{x + 5}$.

As placas foram mantidas sob incubação por 15 dias, avaliando-se diariamente o crescimento de *B. theobromae* nos tratamentos em que o micélio não atingiu as margens das placas em 48 horas.

2. Tratamento fungicida de sementes artificialmente infectadas por *B. theobromae*.

Neste estudo foram utilizadas sementes de algodoeiro cultivar IAC-20, provenientes de uma amostra isenta de *B. theobromae* e com incidência de 10% de *Fusarium* spp., determinada pelo teste de incubação em papel de filtro.

As sementes foram inicialmente deslintadas por processo químico, utilizando-se ácido sulfúrico concentrado em quantidade de 10ml por cerca de 300 sementes. Após remoção do linter as sementes foram lavadas em água corrente, e imersas por 10 minutos em solução de bicarbonato de sódio 1%, e novamente lavadas em água corrente. A fração de sementes flutuante em água foi descartada, considerando-se que sementes de maior densidade permitem a obtenção de maiores percentuais de emergência (Hofmann et al., 1988). Após a seleção dessas sementes, procedeu-se a sua inoculação, colocando-as sobre colônias de *B. theobromae* em meio BDA, seguido de incubação por 24h, conforme procedimento utilizado por Oliveira, Machado e Andrade (1993). Estas colônias, com sete dias de idade, foram obtidas após reisolamento de *B. theobromae* de maçãs de algodoeiro infectadas. Parte das sementes não inoculadas foi igualmente mantida incubada por 24h sobre meio BDA isento de crescimento fúngico. As sementes inoculadas, tratadas e não tratadas com fungicidas e as sementes não inoculadas, foram submetidas aos testes de sanidade, germinação em substrato papel e emergência em solo. Como tratamentos experimentais foram utilizadas sementes não inoculadas e não tratadas; sementes inoculadas e não tratadas; sementes tratadas com os fungicidas relacionados na Tabela 1. Para os fungicidas benomil, thiabendazol, iprodione, thiram e carboxin + thiram, foram utilizadas dosagens recomendadas pelos fabricantes: 100; 20; 100; 350; 150 + 150 g i.a. por 100 kg de sementes, respectivamente. Os fungicidas carbendazim e carboxin foram utilizados em dosagens de 20 e 150 g i.a. por 100 kg de sementes, respectivamente.

Para a análise de sanidade, as sementes foram colocadas em placas de petri de plástico, com diâmetro de 15cm, contendo três folhas de papel de filtro umedecidas em solução de 2,4-Diclorofenoxiacetato de sódio na concentração de 10 ppm. Em cada placa foram semeadas 25

sementes, sendo preparadas 8 placas por tratamento. As placas foram incubadas por sete dias em câmara com temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, sob lâmpada de luz negra Silvania 30W e posteriormente examinadas ao estereomicroscópio.

Para a análise de germinação, as sementes foram colocadas em rolos de papel Germitest e mantidas por quatro dias em germinador à temperatura de 25°C . A determinação da germinação foi feita de acordo com metodologia prescrita nas Regras para análise de sementes (Brasil, 1992). Para cada tratamento foram analisadas 200 sementes em oito repetições de 25. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Para avaliação de emergência, utilizou-se como substrato solo e areia na proporção de 1:1, fumigado pela aplicação de 264 ml de brometo de metila por m^3 , com cobertura por 48h e aeração por 72h. O substrato foi colocado em bandejas plásticas de 10 x 40 x 60cm e em cada uma foram semeadas 50 sementes à profundidade de 3cm. Cada parcela experimental foi constituída por uma bandeja e cada tratamento foi repetido quatro vezes, em delineamento em blocos ao acaso. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal com temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo de 12h, sob lâmpadas luz do dia Grolux 40W. O número de plantas emergidas foi determinado diariamente até a estabilização, sendo o estande inicial considerado aos 14 dias após a semeadura. O índice de velocidade de emergência foi obtido pela somatória dos índices diários, até 14 dias da semeadura, calculados pela divisão do número de plantas emergidas pelo número de dias decorridos da semeadura. O estande final foi determinado aos 25 dias da semeadura.

Os resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas de variância, após transformação por $\text{sen}\sqrt{\frac{x}{100}}$.

3. Tratamento fungicida de amostras de sementes com ocorrência natural de *B. theobromae* e outros fungos.

Neste estudo foram utilizadas três amostras de lotes de sementes de algodoeiro, cultivar IAC-20, e o fungicida carbendazim, na dosagem de 20g i.a. por 100kg de sementes, com base nos resultados do estudo anterior. A avaliação de efeitos do tratamento fungicida foi feita através de análise sanitária, germinação padrão em papel e emergência em solo. As sementes utilizadas foram deslintadas com ácido sulfúrico, da forma descrita no item anterior.

A análise sanitária foi feita pelo método de incubação em papel de filtro, sendo utilizadas para cada uma das três amostras, 200 sementes sem tratamento, 200 com tratamento em hipoclorito de sódio 1% durante cinco minutos e 200 tratadas com o fungicida.

A análise de germinação foi feita em rolo de papel, utilizando-se para cada amostra, 200 sementes não tratadas e 200 tratadas com carbendazim. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

A emergência em solo foi avaliada em canteiros de alvenaria, no campo, contendo como substrato solo e areia não desinfestado, na proporção de 1:1. Foram estabelecidos seis tratamentos, constituídos de três amostras de sementes com e sem o tratamento fungicida. Cada parcela experimental foi composta por uma fileira de 100 sementes no canteiro e cada tratamento foi repetido quatro vezes, em delineamento de blocos ao acaso. O estande inicial foi determinado aos 14 dias e o estande final, aos 25 dias da semeadura.

Os dados obtidos foram submetidos a análises de variância, após transformação por

$$\text{sen} \sqrt{x/100}.$$

A germinação potencial das sementes das três amostras foi previamente determinada pelo teste de tetrazólio. Para isto, sementes com linter, imersas em água destilada foram incubadas a 25°C por 12 horas. Posteriormente, retirou-se o embrião de 100 sementes, de cada uma das amostras e estes foram transferidos para uma solução de 3,5 trifenil cloreto de tetrazólio 1%, pH 6,5 a 25°C onde permaneceram por quatro horas. Os embriões foram seccionados longitudinalmente, com lâminas de aço e observados sob microscópio estereoscópico, sendo a viabilidade e nível de vigor das sementes determinados de acordo com a metodologia recomendada pelas Regras para análise de sementes (Brasil,1992). Determinou-se também o percentual de danos mecânicos presentes nas sementes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Crescimento de *B. theobromae* em meio de cultura contendo fungicidas.

Os resultados (Tabela 2) indicam que apenas o fungicida thiram não reduziu significativamente o crescimento de *B. theobromae*, em relação ao tratamento testemunha, em todas as concentrações utilizadas. Por outro lado, os fungicidas sistêmicos do grupo benzimidazol, carbendazim, benomil e thiabendazol, reduziram acentuadamente o crescimento do fungo, mesmo a partir de baixas concentrações no meio. O efeito de carboxin, sobre o crescimento de *Botryodiplodia theobromae*, somente foi perceptível, estatisticamente, na concentração mais elevada. A redução de cerca de 40% no crescimento de *B. theobromae*, causada no tratamento com iprodione, reafirma de certa forma resultados de Machado e Langerak

(1993), quando este produto, testado na concentração de 0,5 ppm em substrato de papel impregnado com meio, causou redução no crescimento micelial da ordem de 50%.

TABELA 2. Crescimento micelial de *B. theobromae* (cm) na presença de fungicidas incorporados em meio de cultura (BDA), determinado 48h após o início da incubação. ESAL - Lavras, 1994.

Fungicida	Concentração				
	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Testemunha	6.3 aA	6.3 ab	6.3 aA	6.3 aA	6.3 aA
Thiram	6.2 aAB	7.5 aA	6.9 aAB	6.5 aAB	6.1 aB
Carboxin	6,9 aA	7.2 abAB	5.9 aBC	5.5 acD	4.8 bD
Carboxin + Thiram	6.9 aA	6.2 bA	6.5 aA	6.1 aA	4.2 bB
Iprodione	3.7 bA	2.6 cB	2.2 bB	0.5 bC	0.0 dC
Carbendazim	0.9 cdA	0.7 dA	0.7 cA	0.6 bA	0.6 cA
Benomil	0.5 dA	0.9 dA	0.7 cA	0.6 bA	0.7 cA
Thiabendazol	1.2 cA	0.4 dB	0.6 cB	0.4 bB	0.4 cB

CV=5,7%. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Chama atenção no presente estudo a baixa ação dos fungicidas thiram e carboxin sobre o crescimento de *B. theobromae*, tanto nas suas aplicações isoladas, como em mistura. Melhor desempenho de carboxin, provavelmente seja conseguido através de dosagens mais elevadas do mesmo, conforme revela a tendência evidenciada a partir da concentração de 8ppm.

Uma informação importante, observada no presente estudo, foi que apenas carbendazim, em todas as concentrações, foi capaz de manter durante todo o período de 15 dias de incubação, o mesmo efeito repressor inicial sobre o crescimento do fungo, determinado após 48h de incubação, evidenciando sua característica de maior estabilidade nessas circunstâncias. Por outro lado, para os demais fungicidas, essa estabilidade não foi mantida no mesmo período de incubação considerado.

2. Tratamento fungicida de sementes artificialmente infectadas por *B. theobromae*.

O tratamento fungicida das sementes de algodoeiro foi de maneira geral variável, benéfico em termos de controle de *B. theobromae* (Tabelas 3 e 4). Para todos os parâmetros em consideração, os fungicidas permitiram valores médios, com poucas excessões, diferentes do tratamento cujas sementes estavam infectadas e não receberam tratamento com produto algum.

Pela Tabela 4 vê-se que, benomil e carbendazim, foram capazes de promover um maior controle de *B. theobromae*, possibilitando maior emergência das sementes, sobrevivência de plântulas e maior índice de velocidade de emergência, em relação aos demais fungicidas testados. A efetividade de benomil no controle do patógeno associado a outras espécies vegetais já é de conhecimento prévio (Gonzáles, Vazquez e Hepperlyl, 1990; Ram e Leal, 1990). Este fungicida já é recomendado para o tratamento de sementes de algodoeiro, com a finalidade de controlar outros patógenos, tanto associados às sementes como presentes no solo de cultivo (Organização Andrei, 1987).

TABELA 3. Efeitos do tratamento fungicida de sementes de algodoeiro, infectadas com *B. theobromae*, sobre a germinação, em substrato papel e sobre a incidência do fungo, detectada pelo teste de incubação em papel de filtro. ESAL - Lavras, 1994.

Tratamentos fungicidas	Germinação (%)	Incidência de <i>B. theobromae</i> (%)
Benomil	57.0 a	0.5
Test. não inoculada	52.0 a	0.0
Carbendazim	51.0 a	0.5
Carboxin	27.5 b	77.5
Carboxin + Thiram	21.5 bc	31.5
Iprodione	20.0 bc	34.5
Thiabendazol	10.5 cd	15.5
Thiram	8.5 cd	10.5
Test. inoculada	4.3 d	98.5

CV=15,9%. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 4. Efeitos do tratamento fungicida de sementes de algodoeiro inoculadas com *B. theobromae* sobre a emergência em solo e sobrevivência de plântulas. ESAL - Lavras, 1994.

Tratamentos fungicidas	Parâmetros avaliados		
	Estande inicial	Estande final	Índ. de veloc. de emerg.
Carbendazim	77.0 a	75.0 a	33.7 ab
Benomil	77.0 a	73.0 a	35.0 a
Test. não inoculada	72.5 ab	68.5 a	30.3 abc
Thiram	61.0 bc	52.5 b	27.9 bcd
Carboxin + Thiram	57.5 c	46.0 bc	25.4 cd
Carboxin	57.0 cd	42.0 bcd	23.6 de
Iprodione	53.5 cd	41.5 bcd	24.2 cde
Thiabendazol	49.5 cd	32.0 cd	21.7 de
Test. inoculada	42.0 d	30.0 d	17.8 e
CV(%)	7,2	8,6	10,2

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. Tratamento fungicida de sementes com ocorrência natural de *B. theobromae* e outros fungos.

Os efeitos do tratamento de sementes com carbendazim e hipoclorito de sódio, na redução dos índices de ocorrência de todos os fungos presentes nas sementes em teste, foi notório neste estudo (Tabela 5). Os resultados referentes ao tratamento com hipoclorito de sódio evidenciam que apenas os propágulos dos fungos localizados na superfície externa das sementes foram atingidos, indicando por outro lado, a presença de grande parte dos fungos no interior dos tecidos das sementes.

De maneira geral, os resultados da Tabela 5 confirmam a atuação efetiva de carbendazim em reduzir e às vezes erradicar totalmente, o inóculo da maioria dos fungos presentes nas sementes utilizadas.

TABELA 5. Incidência de fungos em amostras de três lotes de sementes de algodoeiro não tratadas (NT), tratadas com hipoclorito de sódio (HP), tratadas com carbendazim (CB) e submetidas ao teste de sanidade pela incubação em papel de filtro. ESAL - Lavras, 1994.

Fungos detectados	Percentual de ocorrência								
	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	NT	HP	CB	NT	HP	CB	NT	HP	CB
<i>Aspergillus glaucus</i>	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0
<i>A. niger</i>	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0
<i>B. theobromae</i>	14.0	10.0	0	12.0	9.0	0	25.0	14.0	0
<i>Cladosporium</i> sp.	11.0	0.5	0	7.0	0	0	0.5	0	0.5
<i>Colletotrichum. gossypii</i>	19.5	11.0	0	32.0	11.5	0	28.0	19.0	1.0
<i>Fusarium</i> spp.	31.0	31.0	0	58.5	30.5	6.5	55.0	37.0	2.0
<i>Gonatobotris</i> sp.	0.5	0	0	0.5	0	0	0	0	0
<i>Olpitrichum</i> sp.	2.5	1.0	0	1.5	1.5	0	1.5	4.0	0
<i>Penicillium</i> spp.	2.0	2.0	0	6.0	0.5	0	3.0	0	0.5
<i>Pestalotia</i> sp.	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0

O teste de tetrazólio mostrou para os lotes, 1, 2 e 3, germinação potencial de 57, 68 e 51%; nível de vigor de 48, 63 e 51% e presença de danos mecânicos nas sementes viáveis, de 21, 42 e 38%, respectivamente, evidenciando a baixa qualidade fisiológica das sementes utilizadas. Considerando-se estes resultados do teste de tetrazólio, os aumentos na germinação e emergência de plântulas, proporcionados pelo tratamento com carbendazim (Tabela 6), podem ser considerados relativamente altos. A presença de danos mecânicos nas sementes viáveis, pode ter contribuído para a obtenção de percentuais de germinação e emergência das sementes tratadas, inferiores aos percentuais de germinação potencial verificados.

De forma semelhante, em substrato papel e nas condições de canteiro, carbendazim possibilitou aumentos significativos na germinação, emergência e sobrevivência de plântulas (Tabela 6). Os menores percentuais de germinação, obtidos em substrato papel, quando comparados aos de emergência em solo, sugerem efeitos de fungos que, no rolo de papel, sob condições ótimas, podem deteriorar sementes e danificar plântulas, que de acordo com as Regras para análise de sementes (Brasil, 1992) são excluídas da contagem de plântulas normais.

A morte de plântulas, embora significativamente menor quando as sementes foram tratadas, pode ser considerada elevada. Neste sentido, deve-se considerar a alta incidência de *C. gossypii* nas plântulas, comprovada pelos sintomas típicos do mesmo nas folhas e caule. Embora tenha sido observada a ação acentuada de carbendazim sobre *C. gossypii*, nas sementes submetidas ao teste de sanidade (Tabela 5), deve-se considerar que sua proliferação nas plântulas em solo, foi provavelmente devida à baixa dosagem deste fungicida utilizada para o tratamento das sementes.

TABELA 6. Percentual de germinação (TPG), emergência em solo e sobrevivência de plântulas para sementes de algodoeiro tratadas com carbendazim. ESAL - Lavras, 1994.

Amostras	Percentual de plântulas normais							
	TPG			Estande inicial			Estande final	
	T	NT	Médias	T	NT	Médias	T	NT
Lote 1	45.5	27.5	24.3 a	50.0	42.0	46.0 a	22.5	15.5 a
Lote 2	47.5	27.0	37.3 a	50.0	45.5	47.8 a	24.5	11.3 a
Lote 3	28.5	6.0	17.3 b	42.5	34.5	38.5 b	21.0	10.3 a
Médias	40.5 A	20.2 B		47.5 A	40.7 B		22.7 A	12.4 B
CV (%)	19,3			6,2			19,1	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha, para cada parâmetro avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. T = tratadas, NT = não tratadas.

CONCLUSÕES

1 - *Botryodiplodia theobromae* apresenta sensibilidade variável, "in vitro", em relação a um grupo de fungicidas comumente recomendados para tratamento de sementes de algodoeiro.

2 - O tratamento de sementes de algodoeiro, infectadas artificialmente por *B. theobromae*, mostrou maior efetividade relativa por parte dos produtos benomil e carbendazim.

3 - O crescimento de fungos patogênicos e saprófitas, associado a sementes de algodoeiro, foi eficientemente controlado pela aplicação de carbendazim 10%, na dosagem de 20g i.a./100kg de sementes, possibilitando maior taxa de germinação e de emergência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGGA, H.S. Pathogenicity studies of organisms involved in the cotton bold-rot complex. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, n.1, p.158-160, Jan. 1970.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- GONZÁLEZ, O.;VAZQUEZ, F.; HEPPELY, P. Symptomatology and control of scion dieback in graft - propagated cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, v.74 n.2, p.207-208, 1990. In: REVIEW OF PLANT PATHOLOGY, London, v.71, n.11, p.878, abst. 7254, Nov. 1992.
- JEFFS, K.A. **Seed treatment**. The British Crop Protection Council, The Lavenham Press Limited, Laveham, 1986. 332p.

- HOFMANN, W.C.; KITTOCK, D.L. & ALEMAYEHU, M. Planting seed density in relation to cotton emergence and yield. **Agronomy Journal**, v.80, p.834-837, Sep./Oct. 1986.
- MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J. Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton. In: SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, Ottawa, 1993. **Proceedings...** Ottawa: ISTA, 1993. p.48-53.
- OLIVEIRA, E.; MACHADO, J.C.; ANDRADE, G.A.F. Patogenicidade de *Botryodiplodia theobromae* a sementes de algodoeiro. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.3, n.3, p.93, jun. 1993.
- ORGANIZAÇÃO ANDREI. **Compêndio de defensivos agrícolas; guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 2. ed. rev. atual. São Paulo, 1987. 492p.
- RAM, C.; LEAL, E.C. Determinação da época e do número de aplicações de fungicidas no controle da queima do coqueiro (*Cocos nucifera*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.3, p.229-231, set. 1990.
- SOBREIRA, D.G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais**. Lavras: ESAL, 1988. 70 p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).

Capítulo 8. DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

A extensão dos prejuízos causados por fungos patogênicos a plantas cultivadas, aliada aos seus mecanismos de sobrevivência e dispersão na natureza, são determinantes de sua importância e necessidade de controle. A transmissão desses fungos, das plantas às sementes e destas às plantas da geração seguinte, constitui um dos mecanismos mais eficientes que garantem sua perpetuação indefinidamente. O conhecimento desta associação patógeno-semente e suas implicações, é essencial à adoção de possíveis medidas de controle, sejam preventivas ou curativas. Alguns desses aspectos estudados para o fungo *B. theobromae*, em relação a sementes e plantas de algodoeiro, no presente trabalho, mostram sua importância como patógeno desta cultura e o papel das sementes como veículo para sua sobrevivência e dispersão. Até então, o referido organismo não era enquadrado como um patógeno de importância ao algodoeiro, sendo apenas citado entre inúmeros outros, como um fungo de natureza secundária. Deve-se levar em consideração o fato de que este patógeno quase sempre ocorre em sementes de algodoeiro ao lado de outros fungos de reconhecida relevância a esta cultura.

O fungo *B. theobromae* mostrou ser patogênico ao algodoeiro no início do ciclo, causando morte de plântulas, e ao final, causando seca de ramos e apodrecimento de frutos, efeitos que não dependem da presença de ferimentos nos tecidos vegetais. Ao final do ciclo, pode causar em média, a perda de 17% na colheita do algodoeiro, equivalente ao percentual de frutos que apodrecem e não completam a deiscência (capítulo 4). Além disto, a transmissão deste patógeno para as sementes, em taxa média de 15% (capítulo 4), pode corresponder ao mesmo percentual de redução no estande, após a semeadura, causando morte em pré-emergência

(capítulo 5). Estes índices de perdas podem ser expressivos tanto na produção de fibras, quanto na produção de sementes.

Quando *B. theobromae* infecta as sementes, determina a morte em pré-emergência e quando encontra-se apenas como contaminante superficial, pode permitir a emergência das plântulas. Esta emergência ocorre devido à frequente retenção do tegumento no solo, determinado pelo tipo epígeo de germinação das sementes, porém se o fungo atinge os tecidos das plântulas, estas morrem posteriormente. O índice de morte em pré-emergência é maior à temperatura ambiente em torno de 22°C que em torno de 28°C, enquanto a morte de plântulas infectadas pelo patógeno é maior nesta última condição de temperatura. A presença deste fungo nas sementes de algodoeiro, pode também influenciar o resultado do teste padrão de germinação, em substrato de papel, causando a morte de sementes e infecção de plântulas (capítulo 5).

Em termos de sobrevivência, constatou-se que *B. theobromae* é capaz de permanecer viável em associação com as sementes mortas do algodoeiro, no solo do campo de cultivo, entre plantios consecutivos desta cultura. A sobrevivência é maior quando a umidade do solo é mais favorável ao crescimento de plantas (20% de umidade gravimétrica), que em solo seco (5% de umidade gravimétrica) (capítulo 6). Assim, o plantio de sementes portadoras deste patógeno, pode permitir a casualização de focos de inóculo primário, para a infecção posterior dos frutos do algodoeiro. No capítulo 4 foi demonstrado também que o referido fungo é capaz de sobreviver em tecidos vegetativos das plantas, até a época de produção.

A ocorrência de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro produzidas no Estado de Minas Gerais, safra 90/91, foi maior em relação aos índices relatados para este Estado por Tanaka e Paolinelli (1984) e por Sobreira (1988), em safras anteriores (capítulo 3). Esta ocorrência foi

também maior na região do Triângulo, que apresenta maior pluviosidade, em relação à região Norte do Estado de Minas Gerais. Este aumento na ocorrência do patógeno, ao longo dos últimos anos, pode ser atribuída possivelmente, ao acúmulo de inóculo nas áreas de cultivo. A quantidade de inóculo de *B. theobromae*, presente nas sementes, pode ser considerada elevada, o que aumenta a probabilidade do mesmo atingir os tecidos das plântulas, por ocasião da germinação e também de sua sobrevivência no solo.

O armazenamento de sementes de algodoeiro em câmara fria, condição recomendada para melhor preservação de sua viabilidade, preserva também a viabilidade do patógeno, permitindo o seu retorno ao campo de cultivo (capítulo 3).

Desta forma, percebe-se que a associação de *B. theobromae* com as sementes de algodoeiro é importante, não apenas pela redução que causa na germinação, mas também por contribuir efetivamente para sua disseminação. Face aos prejuízos que este patógeno pode causar ao cultivo algodoeiro, há necessidade do estabelecimento de padrões de tolerância para sua ocorrência em sementes básicas e certificadas/fiscalizadas. Com base nestes resultados e em observações regionais de alguns pesquisadores, índices de tolerância de 15 e 25% para classes de sementes básicas e certificadas/fiscalizadas respectivamente, fazem parte de uma proposta do Comitê de Patologia de Sementes da Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, a ser submetida ao Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, em apoio aos atuais Programas de Sementes no país (Machado, comunicação pessoal).

Algumas alternativas viáveis para controle de *B. theobromae* em sementes de algodoeiro, foram também evidenciadas neste estudo. Na região Norte do Estado de Minas Gerais, observa-se que há condições climáticas favoráveis para produção de sementes com menores níveis de

incidência deste patógeno. Por outro lado, o armazenamento de sementes de algodoeiro, pelo menos por 6 meses, em ambiente com temperatura média de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa média de $76 \pm 5\%$, pode reduzir acentuadamente o nível de ocorrência de *B. theobromae* e em consequência aumentar as chances para um maior percentual de germinação das sementes (capítulo 3). Ainda, o tratamento fungicida de sementes, utilizando-se produtos a base de carbendazim ou benomil, pode controlar os efeitos do patógeno sobre a germinação das sementes (capítulo 7). A adoção da prática de erradicação de soqueira, em áreas de cultivo de algodoeiro, poderia também ser uma alternativa importante de controle, permitindo a redução do inóculo primário do patógeno, nestas áreas (capítulo 6).

Finalmente, a susceptibilidade dos genótipos de algodoeiro atualmente cultivados no Estado de Minas Gerais, IAC-20 e Redenção, além de outros, à infecção por *B. theobromae* (capítulo 4) e a existência de genótipos resistentes (Cauquil e Follin, 1970) sugerem que *Botryodiplodia theobromae* é um patógeno que poderia também ser incluído em programas de melhoramento visando resistência a doenças. Neste sentido, torna-se entretanto necessário um estudo detalhado sobre o gênero e a natureza da variabilidade do referido patógeno, uma vez que este conhecimento é essencial como alicerce de qualquer programa de melhoramento visando resistência a doenças.

Com base portanto nos resultados deste estudo vê-se que *B. theobromae* é importante ao algodoeiro, merecendo por parte dos Programas de Sementes um tratamento cauteloso, sendo porém, passível de controle satisfatório através da aplicação de algumas medidas que, de maneira geral, devem fazer parte do controle integrado de doenças na cultura em apreço.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAUQUIL, J.; FOLLIN, J. C. Étude de l'action de quelques caractères morphologiques ou génétiques sur le comportement du cotonier à l'égard des pourritures de capsules. I. La resistance à la bacteriose. **Cotton Fibr. Trop.**, v.25, n.3, p.375-380, 1970. In: REVIEW OF PLANT PATHOLOGY, London, v.50, abst. 1250, 1971.
- SOBREIRA, D. G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais.** Lavras: ESAL, 1988. 70p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- TANAKA, M. A. S.; PAOLINELLI, G. de P. Avaliação sanitária e fisiológica de sementes de algodão produzidas em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.6, n.1, p.71-81, jan/abr. 1984.