

# Seleção do local de aplicação e do estágio fenológico do algodoeiro para inoculação do agente da ramulose

Ellen Noly Barrocas (1\*); José da Cruz Machado (1); Marcelo de Carvalho Alves (2)

(1) Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, 37200-000 Lavras (MG).

(2) Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 78060-900 Cuiabá (MT).

(\*) Autora correspondente: ellenoly@gmail.com

Recebido: 23/Jul./2010; Aceito: 3/nov./2010

## Resumo

A ramulose é uma importante doença do algodoeiro que causa danos na parte aérea e compromete a formação de capulhos. Os sintomas podem ser observados desde manchas necróticas nas folhas e pecíolo, morte da gema apical, nanismo e superbrotamento. Nesse trabalho, comparou-se alguns métodos de inoculação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* considerando a aplicação do inóculo em diferentes locais e estádios fenológicos da planta. O objetivo foi estabelecer um método de inoculação que reproduzisse, com segurança, os sintomas típicos da ramulose. A inoculação foi realizada em plantas da linhagem NU 15 nos estádios V0, V2 e B1. Aplicou-se a suspensão de conídios na concentração  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> em três locais na planta: toda a parte aérea; toda a parte aérea, exceto a gema apical, e somente a gema apical. Verificou-se que o método mais adequado para reproduzir os sintomas da ramulose foi a aplicação de inóculo em toda a planta no estágio fenológico V2. A inoculação somente na gema apical não foi suficiente para reproduzir os sintomas da doença.

**Palavras-chave:** *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Gossypium hirsutum* L, superbrotamento.

## Selection of the application site and phenological stage of cotton plants to ramulosis inoculation agent

### Abstract

Ramulosis, caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, is one of the most devastating diseases for cotton crops causing severe losses in Brazil. In addition to damping off and necrotic leaf spots, the disease also causes dwarfism, internodes shortening, apical blight and multiple sprouting of branches. In this study, the objective was to compare several methods of inoculating *C. gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton, considering different growth stages and locations of inoculum deposition, aiming to reproduce the typical symptoms of the disease under controlled conditions. Inoculation was performed by applying an inoculum suspension of  $10^6$  conidia mL<sup>-1</sup> on plants at phenological growth stages of V0, V2, and B1, placing the inoculum to the whole plant, to apical shoot, and to the whole plant except for the apical shoot. We verified that the most appropriate method for inoculation was in plants at the V2 growth stage with the application of inoculum to the whole plant. Inoculation of only the apical shoot was insufficient to reproduce the symptoms of ramulosis.

**Key words:** *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Gossypium hirsutum* L, brooming.

A ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A. S. Costa, é uma importante doença do algodoeiro que pode ser transmitida por sementes. Segundo ARAÚJO et al. (2009), campos de produção com incidência de ramulose acima de 5% podem induzir níveis elevados de infecção nas sementes. Pode também causar manchas e perfurações nas folhas, enrugamento da superfície do limbo, nanismo de plantas, encurtamento de entrenós e superbrotamento, os quais comprometem o crescimento da planta e a formação de capulhos (PIZZINATO e TANAKA, 1996; PIZZINATO e CIA, 1994; ZANDONÁ et al., 2006).

Alguns autores sugerem que a morte da gema apical induz ao superbrotamento e encurtamento de entrenós (COSTA e FRAGA JÚNIOR, 1937; TANAKA, 1995; CIA e SALGADO, 1997), mas as causas desses sintomas ainda não são bem esclarecidas (METHA et al., 2005). Sabe-se que a doença se desenvolve melhor em condições de umidade elevada e temperatura de 25 a 30 °C (GOULART, 2005).

O desenvolvimento de métodos de inoculação é de grande importância para a confirmação da etiologia de uma doença e na avaliação do nível de resistência das cultivares em programas de melhoramento genético.

Para o caso da ramulose, a inoculação artificial consistiu-se em um instrumento primordial para distinguir os sintomas da ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e da antracnose, causada por *Colletotrichum gossypii*, os quais são, morfologicamente, semelhantes.

A metodologia de inoculação atual para a ramulose em algodoeiro inclui a aplicação de suspensão de conídios, em toda a parte aérea das plantas com idade de 25 dias (SANTOS et al., 1993). A aplicação localizada de inóculo em diferentes locais das plantas ainda não foi estudada.

Objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de inóculo de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em diferentes locais e estádios fenológicos de plantas de algodão, buscando estabelecer um método seguro para reprodução dos sintomas típicos da ramulose.

Plantas da linhagem NU 15, suscetível à ramulose, foram crescidas em vasos de 8 dm<sup>3</sup> contendo mistura de areia, terra e esterco, na proporção 1,5:3:1,5 e adubadas a cada 20 dias com a mistura de um grama de sulfato de amônio, um grama de KCl e três grammas de superfosfato simples por vaso. O inóculo do patógeno, na concentração de 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, foi aplicado em plantas nos estádios fenológicos: V0 (emergência até a 1.<sup>a</sup> folha alcançar 2,5 cm), V2 (V1 até a terceira folha alcançar 2,5 cm) e B1 (primeiro botão floral visível) (ROSOLEM, 2006). Os estádios V1, V2 e B1 ocorreram aos 15, 28 e 41 dias após a emergência respectivamente. A inoculação foi direcionada a três locais distintos das plantas: 1 - parte aérea integral; 2 - parte aérea integral, exceto a gema apical e 3 - gema apical. A inoculação foi realizada pincelando a suspensão de conídios, preparada com 5% de ágar, nos três locais de

aplicação do inóculo nas plantas. Cada parte previamente estabelecida foi protegida com sacos de papel celofane durante todo o período de manejo do trabalho. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura variando de 20 a 30 °C.

As avaliações da severidade da doença nas folhas e nos caules e a queima da gema apical foram realizadas 10 dias após a inoculação. A severidade da redução de entrenós e o superbrotamento foram avaliados aos 35 dias após a inoculação. A escala de notas adotada foi descrita por METHA et al. (2005), considerando os seguintes graus: 0: ausência de sintomas, 1: lesões necróticas nas folhas, pecíolo e nervuras, 2: morte do ápice, hiperplasia, morte dos meristemas laterais, 3: redução no porte da planta (encurtamento dos entrenós) e 4: superbrotamento. Após a atribuição das notas, utilizou-se o índice de MCKINNEY (1923) para o cálculo do índice da doença.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema fatorial 3 × 3 com três repetições e as parcelas foram constituídas por três vasos com uma planta cada um. Os fatores estudados foram os três estádios fenológicos e três locais de inoculação. Plantas que receberam a pulverização de água destilada em todos os estádios fenológicos e locais avaliados serviram como testemunha e foram tratadas da mesma forma que as plantas submetidas à inoculação.

A queima do ápice e as lesões nas folhas foram avaliadas por meio de escala de severidade com notas entre 0 e 3 em que: 0 = sem sintomas; 1 = área foliar necrosada < 10 % da área foliar total; 2 = área foliar necrosada entre 11% e 25% da área foliar total e 3 = área foliar necrosada > 25% da área foliar total. A severidade da redução do porte da planta (encurtamento de entrenós) foi avaliada pela escala de 0 a 3, em que: 0 = nenhuma redução das plantas em relação à média do tamanho das plantas não inoculadas; 1 = redução < 10%; 2 = redução entre 11 %-25% e 3 = redução > 26%. Os dados foram ponderados aplicando-se a fórmula descrita por MCKINNEY (1923).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Quando significativos os efeitos dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Pelo teste de F (p < 0,01), houve efeito da interação entre posições de inoculação e estádios fenológicos do algodoeiro sobre o índice da ramulose (Tabela 1). A maior severidade da ramulose, representada pelo índice de doença, ocorreu em plantas no estádio V2, seguida de plantas no estádio B1 e V0. Os sintomas típicos da ramulose somente foram observados em plantas cuja inoculação foi feita em toda a parte aérea nos estádios fenológicos V2 e B1. Nas plantas submetidas à inoculação no estádio fenológico V0, o desenvolvimento posterior foi comprometido em razão da inoculação. SANTOS et al. (1993) atribuem também à idade das plantas entre 25 e 35 dias como a mais favorável para inoculação com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

**Tabela 1.** Índices de doença em função dos estádios fenológicos e dos locais de inoculação nas plantas de algodoeiro da linhagem NU-15

Locais de inoculação nas plantas	Estádios fenológicos			
	V0	V2	B1	Média
Testemunha	0 dA	0 dA	0 dA	0 d
Toda a planta, exceto a gema apical	6 cB	19 cA	17 cA	14 c
Gema apical	40 bA	30 bB	30 bB	33 b
Toda a planta	59 aC	90 aA	80 aB	76 a
Média	0,26 C	0,34 A	0,31 B	

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

A maior severidade da ramulose do algodoeiro no estágio V0 pode ser atribuída ao método de inoculação usado, que difere das aplicações tradicionais, nas quais se utiliza a suspensão de conídios preparadas somente com água. Neste trabalho, a adição de 5% de agar à suspensão de conídios e a aplicação do inóculo por meio de pincelamento podem ter favorecido a maior adesão dos conídios aos tecidos e ao maior índice de germinação desses. Esse processo se deve à manutenção mais prolongada da umidade nestas circunstâncias. Consta-se na prática que os trabalhos realizados com inoculações para se obter sintomas típicos da ramulose não têm levado em consideração o estágio fenológico da planta e a concentração de conídios. NASCIMENTO et al. (2006) e SILVA-MANN et al. (2002) quando avaliaram a patogenicidade de isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em diferentes genótipos, fizeram uso de pulverizações de plantas no estágio V0 com suspensão na concentração de  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> e conseguiram reproduzir os sintomas da ramulose. Por sua vez, LIMA et al. (1984) observaram os mesmos sintomas da ramulose em plantas submetidas à inoculação no estágio V2. BÜRKLE et al. (1999) conseguiram os mesmos resultados com a inoculação das plantas de algodão no estágio V1 com suspensão na concentração de  $10^3$  conídios mL<sup>-1</sup>.

Em relação ao local na planta mais apropriado para efetuar a inoculação do agente da ramulose, a maior severidade ocorreu quando toda a parte aérea das plantas foi inoculada (Tabela 1). Embora as plantas inoculadas somente na gema apical tiveram maior severidade, os sintomas típicos da ramulose, na forma de superbrotamento ou encurtamento dos internódios, não foram predominantes (Tabela 1). Ainda que tenha havido morte das gemas apicais das plantas, esse fato não ocasionou a formação dos sintomas de superbrotamento ou encurtamento dos entrenós. Essas plantas continuaram seu desenvolvimento normal com modificação da arquitetura e produziram flores e capulhos. De modo geral, postula-se que a inoculação deva ser direcionada para atingir o ápice da planta (NASCIMENTO et al., 2006; SANTOS et al., 1994; TANAKA e MENTEN, 1992). No entanto, neste trabalho ficou evidenciado que a morte da gema apical pode ser apenas um componente para o desenvolvimento da doença e não o principal responsável pelo desenvolvimento dela.

Segundo METHA et al. (2005), os sintomas da ramulose em algodoeiro é um caráter governado por diferentes genes. Há especificidade destes de acordo com os sintomas, seja nas folhas seja em relação ao superbrotamento. Da mesma forma, é possível postular que os sintomas de morte apical possam ser governados também por genes específicos, distintos dos demais referenciados. Ainda segundo METHA et al (2005), o sintoma de superbrotamento pode ser provocado por metabólitos secundários produzidos pelo patógeno. Ressalta-se que sintomas como hipertrofia, hiperplasia, formação de galhas, nanismo, crescimento excessivo de raízes, entre outros, geralmente, são atribuídos a variações nos níveis hormonais das plantas (AGRIOS, 2005). Doenças como a vassoura de bruxa em cacauzeiro, causada por *Monilophthora pernicioso* e a malformação da mangueira, causada por espécies de *Fusarium*, apresentam sintomas de envasouramento semelhantes à ramulose. Para estes casos, o nível de entendimento é ainda incipiente (STADEN e NICHOLSON, 1989).

A inoculação das plantas com a proteção da gema apical também não promoveu os sintomas típicos da ramulose em nenhum dos três estádios fenológicos avaliados. Destaca-se que a inoculação de plantas no estágio V0 atingiu somente o pecíolo das folhas já que as plantas com essa idade tinham somente folhas cotiledonares. Nesse caso, a manifestação da doença ocorreu somente nos pecíolos na forma de lesões necróticas. Plantas nos estádios V2 e B1 submetidas à inoculação protegendo a gema apical tiveram morte das gemas laterais e manchas necróticas sem, no entanto, ocorrer sintomas típicos da ramulose. Assim, para que o desenvolvimento da ramulose ocorra, é necessário avaliar um conjunto de fatores que predispõem a planta à doença. A avaliação dos sintomas isolados não é conclusiva para uma diagnose segura.

A inoculação com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em plantas no estágio fenológico V2 em toda a sua superfície foi o procedimento mais adequado para a produção dos sintomas típicos da ramulose. A inoculação com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* direcionada somente à gema apical das plantas de algodão não é capaz de induzir a formação dos sintomas de superbrotamento ou encurtamento de internódios típicos da ramulose.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) que financiou este trabalho, ao PNPD-CAPES, pela concessão de bolsa de pós-doutorado à primeira autora, e ao pesquisador Edvaldo Cia do Instituto Agronômico de Campinas pelas sementes cedidas.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. How pathogens attack plants. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). *Plant pathology*. 5.ed. New York: Academia, 2005. p.175-205.
- ARAÚJO, A.E.; MENTEN, J.O.M.; FERREIRA, A.C.B.; DIAS, C.T.S.; NÓBREGA, M.B.M.; Morello, C.L. Efeito de diferentes níveis de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, em plantas de algodão no campo e sua incidência nas sementes. *Summa Phytopathologica*, v.35, p.310-315, 2009.
- BÜRKLE, R.; MEHTA, Y.R.; FONSECA JUNIOR, N.S. Reaction of cotton cultivars to *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica*, v.25, p.278-281, 1999.
- CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro. KIMATI, H. AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1977. p.33-48.
- COSTA, A.S.; FRAGA JUNIOR, C.G. Superbrotamento ou Ramulose do algodoeiro. *Revista de Agricultura*, v.7, p.249-259. 1937.
- GOULART, A.C.P. Doenças iniciais do algodoeiro: identificação e controle. In: ZAMBOLIM, L. *Sementes qualidade fitossanitária*. Viçosa: UFV, 2005. 502p.
- LIMA, E.E.; CARVALHO, L.P.; SANTOS, E.O.; CARVALHO, J.M.F.C. Avaliação de germoplasma de algodoeiro para resistência à Ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira*, v.9, p.561-565, 1984.
- METHA, Y.R.Z.C.; ZANDONÁ, C.; BIBANCO, K.R.; ALMEIDA, W.P.; TEIXEIRA, E.A.; CUNHA, H.C.; ERIVALDO, J. Resposta diferencial de cultivares de algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica*, v.31, p.142-145, 2005.
- MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helmintosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, v.26, p.195-219, 1923.
- NASCIMENTO, J.F.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; BERGER, P.G.; CECON, P.R. Resistência do algodoeiro a Ramulose e variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica*, v.32, p.9-15, 2006.
- PIZZINATTO, M.A.; CIA, E. Relação entre a severidade de Ramulose do algodoeiro em condições de campo e a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes produzidas. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.50-54, 1994.
- PIZZINATTO, M.A.; TANAKA, M.A.S. Método para identificação de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro baseado no hábito de crescimento : II avaliação em casa de vegetação. *Summa Phytopathologica*, v.22, p.122-127, 1996.
- ROSOLEM, C.A. Fenologia e Ecofisiologia do algodoeiro. In: *Fundo de Apoio à cultura do algodão* (Ed.). Algodão: Pesquisas e Resultados para o campo. Cuiabá, MS, 2006. p.16-35.
- SANTOS, G.R.; ZAMBOLIM, L.; BATISTA, U.G. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes do algodoeiro em função do período de inoculação das plantas. *Summa Phytopathologica*, v.19, p.171-180, 1993.
- SANTOS, G.R.; ZAMBOLIM, L. RIBEIRO DO VALE, F.X.; MAFFIA, L.A.; VIEIRA, J.M. Progresso e gradiente da Ramulose do algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.390-393, 1994.
- SILVA-MANN, R.; SALGADO, K.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.27-32, 2002.
- STADEN, J. van; NICHOLSON, R.I.D. Cytokinins and mango flower malformation II: the cytokinin complement produced by *Fusarium moniliforme* and the ability of the fungus to incorporate [8-<sup>14</sup>] adenine into cytokinins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.35, p.423-431, 1989.
- TANAKA, M.A.S. Problemas na detecção do agente causal da ramulose em sementes de algodão. In: MENTEN, J.O.M. (Ed.). *Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico*. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p.93-108.
- TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Relação entre resistência do algodoeiro à Ramulose e a transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelas sementes. *Summa Phytopathologica*, v.18, p.227-234, 1992.
- ZANDONÁ, C.; NOVAES, T.G.; ETHA, Y.R.; SCHUSTER, I.; TEIXEIRA, E.A.; CUNHA, H. Herança de resistência a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro brasileiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.76-78, 2006.