



Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro

Marcella V. Sousa¹, José C. Machado¹, Ludwig H. Pfenning¹, Vivian H. Kawasaki¹, Dejânia V. Araújo², Adriano A. Silva¹ & Alfredo Martini Neto¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brasil;

²Departamento de Agronomia, Universidade do Estado do Mato Grosso, Cx. Postal 287, 78300-000, Tangará da Serra, MT, Brasil

Autor para correspondência: Dejânia V. Araújo, e-mail: dejania@terra.com.br

RESUMO

A disponibilidade de sementes com diferentes níveis de infecção por fungos, transmissíveis por esta via, é importante na realização de diversos estudos. Este trabalho teve como objetivo avaliar procedimentos de inoculação e períodos de exposição das sementes de algodoeiro ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), por meio da técnica de restrição hídrica, capazes de proporcionar elevados índices de infecção. Para isso, foram comparados os métodos: 1) imersão das sementes por 10 min em suspensão de conídios (10⁶ conídios/mL) com incubação, em seguida, em substrato com potencial osmótico de -1,0 MPa; 2) atomização de suspensão de conídios (10⁶ conídios/mL) sobre o substrato e sobre as sementes, e 3) contato direto das sementes com o micélio do fungo previamente desenvolvido no substrato de papel. Todos os métodos permitiram a obtenção de sementes com diferentes potenciais de inóculo, equivalentes aos diferentes tempos de exposição, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, ao substrato contendo ou não o fungo previamente desenvolvido. As avaliações neste ensaio foram feitas por meio dos testes de germinação em rolo de papel, emergência em solo/areia e sanidade. O método mais eficaz foi o de imersão das sementes na suspensão de conídios com incubação em substrato de papel com restrição hídrica. O período de tempo que as sementes devem ficar em contato com o patógeno, sem afetar a sua qualidade fisiológica, é de 53 h a 57 h.

Palavras-chaves: Sanidade de sementes, testes de sanidade de sementes, fusariose do algodoeiro, *Gossypium hirsutum*.

ABSTRACT

Methods of inoculation and effects of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton seeds

The availability of seeds infected by fungi or other pathogens transmissible by this way is important for several purposes. This work was conducted to evaluate proceedings of inoculations and period of exposition of seeds to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* through the water restriction technique. The following methods were compared: (1) seed immersion in a conidial suspension (10⁶ conidia/mL) following incubation in substrate with an osmotic potential of -1.0 MPa; (2) atomization of a conidial suspension (10⁶ conidia/mL) upon the substrate and on the seeds, and (3) direct contact of the seeds with the fungus mycelium, grown upon the substrate. All methods enabled to obtain seeds with different inoculum potential equivalent to different times, 24, 48, 72, 96 and 120 hours of seed expositions to the fungus. To evaluate the efficacy of infection, germination tests on roll paper and in soil/sand substrate and Blotter Test were applied. The most effective method was the immersion of seeds in inoculum suspension followed incubation in substrate with water restriction. The period of time that seeds should stay in contact with the pathogen, without affecting their physiological quality, was 53 h to 57 h.

Keywords: seed health, seed health tests, cotton wilt, *Gossypium hirsutum*.

INTRODUÇÃO

A maioria das doenças de importância econômica que ocorre na cultura do algodoeiro é causada por patógenos associados às sementes, dentre estes, encontra-se *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* W.C. Snyder & H.N. Hansen, agente etiológico da murcha de fusarium do algodoeiro.

Para auxiliar nos estudos deste patógeno, há

necessidade, de se utilizar sementes contendo inóculo com graus diferenciados de incidência. No entanto, a dificuldade em obter sementes com diferentes níveis de infecção, tornou a inoculação de sementes necessária para garantir a reprodução da sintomatologia típica da doença e ainda possibilitar a sua aplicação em estudos de detecção, patogenicidade, transmissibilidade, melhoramento genético do hospedeiro, controle, dentre outros (Tanaka *et al.*, 1989; Tanaka & Menten, 1991).

Os métodos mais simples de inoculação de sementes consistem na imersão dessas numa suspensão de esporos (Tanaka & Menten, 1991) e por meio de contato das

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras. Lavras MG 2006.

sementes com a colônia fúngica desenvolvida em meios de cultura convencionais. Por estes métodos, as estruturas fúngicas ficam, em sua maioria, aderidas ao tegumento das sementes, não sendo garantido o processo de infecção, e sim o de contaminação (Tanaka & Menten, 1991; Machado *et al.*, 2001). Estes métodos apresentam como desvantagem o limite do tempo de exposição das sementes ao fungo, visto que as sementes podem iniciar o processo de germinação em curto período de tempo, não produzindo níveis satisfatórios de infecção para determinadas finalidades (Machado *et al.*, 2001).

O emprego do princípio de condicionamento fisiológico, já conhecido em tecnologia de sementes visando à potencialização do processo de germinação de algumas espécies, foi testado como parte de uma metodologia de inoculação de sementes com alguns fungos e bactérias de interesse no Brasil (Machado & Langerak, 2002). Por meio desta técnica, a inoculação de sementes tornou-se mais eficiente e bastante promissora para todos os patossistemas estudados (Machado *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2004). A metodologia consiste na exposição das sementes ao fungo desenvolvido em meio de cultura contendo um restritor hídrico por diferentes períodos de tempo, possibilitando a obtenção de sementes com diferentes níveis de inóculo (Sousa *et al.*, 2002). A vantagem da técnica da restrição hídrica sobre outros métodos de inoculação, como imersão das sementes em suspensão de esporos ou, simplesmente, o contato limitado destas com a colônia do fungo em meio convencional, é a obtenção de sementes com diferentes níveis de inóculo e a utilização destas, após secagem, por períodos de armazenamento mais prolongados.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficácia de procedimentos de inoculação por meio da técnica de restrição hídrica e testar diferentes períodos de exposição das sementes de algodoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos em câmaras de incubação e de crescimento vegetal do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras no ano de 2005. Foram utilizadas sementes da cultivar Delta Opal, deslindadas mecanicamente pelo fornecedor. Inicialmente, as sementes foram submetidas aos testes de germinação e sanidade para avaliação da qualidade do lote. Após a análise do perfil inicial, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, enxaguadas três vezes em água destilada e secas ao ar durante 24 horas.

Para inocular as sementes, utilizou-se cinco isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov 07, Fov 27, Fov 101, CNPA 0007 e MT 01) obtidos de diferentes localidades do país. A patogenicidade dos isolados foi testada usando o método de imersão das raízes em suspensão de conídios

ajustada para 10^6 conídios/mL (Assigbetse *et al.*, 1994). A inoculação foi realizada considerando cada isolado, separadamente, nos três métodos testados. Os isolados foram transferidos para placas de Petri, contendo meio BDA, e incubados em BOD com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, durante sete dias. Após esse período, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril a cada placa, obtendo uma suspensão de conídios, de cada isolado, que foi ajustada para a concentração de 10^6 conídios/mL e utilizada nos três métodos de inoculação de sementes, conforme descrito a seguir.

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

Sementes, previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, foram imersas na suspensão de conídios de cada isolado e mantidas, nessa condição, por 10 min. Em seguida, foram colocadas em bandeja plástica contendo como substrato três folhas de papel germitest esterilizado e umedecido em meio BDA + manitol com potencial osmótico ajustado para $-1,0$ MPa. Este potencial foi alcançado pela adição de 46,3 g de manitol indicado pelo software SPPM para a temperatura de 20°C (Michel & Radcliffe, 1995). De acordo com a literatura, o potencial osmótico de $-1,0$ MPa não interfere no desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, além de não favorecer a germinação das sementes de algodoeiro. No entanto, a germinação pode ocorrer, caso as sementes permaneçam por longos períodos sob restrição hídrica, o que seria desvantajoso com relação à qualidade fisiológica dessas sementes (Machado *et al.*, 2007).

Com o intuito de reduzir o espaço na câmara de incubação, foram colocadas cinco camadas de substrato contendo sementes emergidas na suspensão de conídios, de um mesmo isolado, em cada bandeja. As camadas corresponderam aos diferentes períodos de incubação, sendo eles 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, respectivamente. Para evitar contaminação externa, as bandejas foram cobertas com plástico transparente esterilizado em formol e transferidas para câmara de incubação com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Na medida em que o tempo de incubação pré-determinado fora alcançado, retirava-se uma camada do substrato contendo sementes. A testemunha constou de sementes imersas em água destilada e esterilizada por 10 min e incubadas nas mesmas condições.

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

O substrato, constituído de forma semelhante ao método 1 (três folhas de papel germitest esterilizadas e previamente umedecidas em meio BDA líquido com potencial osmótico ajustado para $-1,0$ MPa), foi atomizado inicialmente com suspensão de conídios, de cada isolado e, após a disposição das sementes sobre o mesmo, procedeu-se uma nova atomização. Conforme descrito no método

1, as bandejas continham cinco camadas de substrato com sementes, sendo cada camada, correspondente aos diferentes períodos de incubação. Como testemunha, atomizou-se água destilada e esterilizada sobre o substrato contendo sementes sem o fungo.

Método 3 – Contato direto das sementes com o micélio do fungo

O substrato foi atomizado com a suspensão de conídios de cada isolado, conforme descrito no método 2, e incubado em câmara com temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h durante três dias. Após o desenvolvimento micelial do fungo, as sementes foram colocadas sobre as colônias, em camada simples, e mantidas por diferentes períodos de exposição, conforme indicado no método 1. Como testemunha, as sementes foram colocadas em contato com o substrato umedecido e livre de inóculo.

Após a incubação em cada período (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) as sementes, de todos os métodos comparados neste trabalho, foram retiradas e secas, separadamente, em temperatura ambiente por 72 h. Em seguida, as sementes foram colocadas em sacos de papel e armazenadas, em câmara fria e seca, onde permaneceram, até a realização de todos os testes.

Comparação de diferentes métodos de inoculação de Fov em sementes de algodoeiro em relação à sanidade, germinação e emergência

Neste ensaio, realizou-se a mistura das sementes de todos os períodos de incubação (24, 48, 72, 96 e 120 h), de cada isolado separadamente, obtendo uma amostra composta de proporções iguais (20%). Em seguida, estas foram submetidas aos testes de sanidade, germinação e emergência em solo e areia.

Para a avaliação da sanidade, realizou-se uma segunda desinfestação das sementes inoculadas com hipoclorito de sódio 1% por 30 s e, novamente, secas ao ar por 12 h. Como a inoculação foi realizada com suspensão de conídios e/ou micélio do fungo crescido em meio de cultura, a desinfestação das sementes, após a inoculação, serviu para reduzir o inóculo externo que pode interferir no resultado do teste de sanidade e superestimar a porcentagem de sementes que, de fato, foi infectada pelo patógeno. Após esse procedimento, foram distribuídas 25 sementes em placas de Petri, de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em calda agarizada (ágar-água a 2%) com manitol, obtendo-se o potencial osmótico de $-1,0$ MPa (Machado *et al.*, 2007). As placas contendo as sementes foram incubadas à temperatura de 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Ao final desse período, foi examinada cada semente individualmente ao microscópio estereoscópico, verificando-se a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. A incidência foi obtida por meio da porcentagem de ocorrência do patógeno nas sementes analisadas.

O teste de germinação em laboratório foi conduzido

com quatro repetições de 50 sementes sobre papel germitest umedecido com água destilada, conforme descrição nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os rolos de papel foram colocados em germinador regulado à temperatura de 25 °C, por sete dias. Realizou-se a contagem de sementes germinadas e o número de plântulas com sintomas. Para a avaliação de sintomas, foram realizados cortes no hipocótilo das plântulas, atribuindo-se notas conforme a intensidade das lesões, sendo: 0 (sem sintoma); 1 (escurecimento vascular); 2 (morte das plântulas). Os dados de severidade foram ponderados pelo índice de McKinney (1923).

A avaliação da emergência de plântulas em substrato composto por solo e areia foi realizada em caixas plásticas com dimensões de 48x29x09 cm, com substrato composto por areia e solo, na proporção de 1:1, previamente tratado com brometo de metila. O cálculo da quantidade de água necessária para atingir 70% da capacidade de campo foi realizado segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Foram semeadas 50 sementes por caixa sendo quatro repetições por tratamento. Após a semeadura, as caixas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal com temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante 21 dias. As variáveis analisadas foram: índice de velocidade de emergência (IVE), estande final, altura de plântulas e índice de doença. O índice de velocidade de emergência foi determinado pela contagem diária de plântulas que apresentaram o cotilédone, exposto acima do solo até a estabilização do estande e calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962).

A severidade foi avaliada por meio do índice de doença ponderado por McKinney (1923). A escala de notas utilizada para o cálculo do índice de doença foi proposta por Nascimento *et al.* (1995), sendo: 0 (ausência de sintomas); 1 (presença de escurecimento vascular confinado à raiz principal; epinastia); 2 (sintomas externos iniciais da doença - clorose e murcha - e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule); 3 (sintomas bem definidos da doença - clorose, murcha e seca de folhas - e escurecimento vascular atingindo o terço médio da planta); 4 (Sintomas bem definidos da doença e escurecimento atingindo o terço superior da planta ou plantas mortas).

Os testes de sanidade e de germinação foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e o teste de emergência em blocos casualizados, todos com quatro repetições. A análise de variância foi realizada em esquema fatorial 6×3 ([5 isolados + 1 controle] x métodos de inoculação). As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

Comparação de diferentes métodos de inoculação de Fov em função do período de exposição das sementes ao patógeno sob restrição hídrica

Com base no teste de patogenicidade, realizado previamente, foi utilizado o isolado Fov 27 para realizar

este ensaio. As sementes com diferentes níveis de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, obtidas em função dos diferentes tempos de exposição (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h), foram semeadas em caixas plásticas contendo como substrato solo e areia na proporção de 1:1. Em seguida, as caixas plásticas foram colocadas em câmara de crescimento vegetal com temperatura ajustada para 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 12 h, por 21 dias. Como tratamento controle utilizou-se sementes não inoculadas. O cálculo da quantidade de água necessária para atingir 70% da capacidade de campo foi realizado segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

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

O ensaio foi conduzido em blocos casualizados com três repetições de 50 sementes por bandeja. A análise de variância foi realizada em esquema fatorial 5x3x2 (tempos de exposição das sementes x métodos de inoculação x inóculo [com e sem fungo]). As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias ajustadas a um modelo de regressão ou teste de médias, conforme a natureza dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo teste de sanidade não foi observado o crescimento do patógeno em sementes não inoculadas. De acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$), observou-se diferença significativa na porcentagem de incidência de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nas sementes entre os métodos de inoculação somente para os isolados CNPA 0007 e MT 01. A maior incidência do patógeno

foi constatada nas sementes inoculadas pelo método de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1) (Tabela 1).

Com relação à porcentagem de germinação, os isolados reagiram diferentemente em cada método de inoculação aplicado (Tabela 1). Esta variação na reação entre os isolados pode ser explicada por sua ação patogênica sob condições favoráveis à infecção e colonização do patógeno em sementes. Para os isolados, Fov 27 e CNPA 0007, considerados mais virulentos pelo teste de patogenicidade, não houve diferença quanto à eficácia entre os métodos de inoculação estudados. Por outro lado, para os isolados, considerados menos virulentos (Fov 07 e MT 01), os métodos de inoculação em que as sementes permaneceram em contato com os conídios apresentaram porcentagem de germinação superior ao método em que as sementes permaneceram em contato com o micélio fúngico desenvolvido sobre o substrato. Contudo, a redução da porcentagem de germinação, em cada método de inoculação, quando comparado com o tratamento controle (sementes não inoculadas), foi resultado da presença do patógeno nas sementes. Sob condições ideais para o desenvolvimento do patógeno que são fornecidas no teste de germinação (temperatura e umidade), observou-se que os métodos de inoculação influenciaram na germinação das sementes, principalmente em relação aos isolados Fov 27 e CNPA 0007, que reduziram a porcentagem de germinação em todos os métodos de inoculação (Tabela 1).

A decisão de se concentrar os estudos em metodologia na qual se lança mão do recurso da restrição hídrica ou condicionamento fisiológico das sementes foi tomada considerando que por outros métodos de inoculação, como por exemplo, a imersão das sementes na suspensão de conídios (Tanaka & Menten, 1991), perde-se vantagem no que tange a manutenção da viabilidade das sementes após a sua inoculação. Outra vantagem é a possibilidade de obter sementes com diferentes níveis de inóculo onde o processo de infecção pode ser controlado por meio da restrição hídrica. Baseado nestes

TABELA 1 – Incidência, Germinação de sementes e índice de doença em plântulas de algodoeiro inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) em três métodos de inoculação com restrição hídrica

Fov	Incidência (%)			Germinação (%)			Índice de doença (%)		
	Métodos de Inoculação								
	1 ^a	2 ^b	3 ^c	1 ^a	2 ^b	3 ^c	1 ^a	2 ^b	3 ^c
Controle	0 aC	0 aB	0 aB	69 bA	70 bA	86 aA	0 aC	0 aD	0 aC
Fov 07	52 aAB	47 aA	50 aA	54 abA	56 aAB	41 bBC	37 aB	31 aC	38 aB
Fov 27	68 aA	43 aA	43 aA	0 aB	0 aE	2 aD	88 aA	82 aA	88 aA
Fov 101	37 aB	28 aA	21 aA	53 aA	35 bCD	53 aB	28 aB	37 aC	40 aB
CNPA 0007	78 aA	42 bA	30 bA	5 aB	20 aD	5 aD	76 aA	57 bB	82 aA
MT 01	67 aA	31 bA	39 abA	57 aA	52 aBC	29 bC	26 aB	27 aC	33 aB
CV (%)		20,89			21,64			18,30	
DMS		32,28			17,38			16,47	

As médias com mesma letra, minúscula nas linhas, e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). ^a= imersão das sementes por 10 minutos na suspensão de 10^6 conídios/mL e incubação em substrato com restrição hídrica; ^b= atomização do inóculo na concentração de 10^6 conídios/mL sobre o substrato com restrição hídrica e sobre as sementes; ^c= sementes em contato com micélio do fungo.

resultados ficou evidenciado que a eficácia das metodologias de inoculação, comparadas neste trabalho, reforçam os resultados de outros estudos (Machado *et al.* 2004; Araújo *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007). Estes autores observaram que *Fov* quando inoculado em sementes de algodoeiro sob diferentes potenciais osmóticos (-0,4 a -1,0 MPa), provocou redução da germinação e conseqüente aumento da porcentagem de sementes mortas. Neste caso, os autores associaram a infecção das sementes com o aumento no período de exposição das sementes ao patógeno, que pode ser proporcionado com o potencial osmótico mais negativo.

Os resultados observados para a intensidade da doença, em todos os métodos, evidenciaram a maior virulência dos isolados Fov 27 e CNPA 0007, sendo que as sementes inoculadas com o isolado Fov 27 apresentaram índice de doença semelhante nos três métodos avaliados. Considerando os diferentes isolados, os métodos de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1) e contato direto com o micélio (método 3) destacaram-se como os mais eficazes para causar infecção de sementes, não havendo diferença significativa entre eles (Tabela 1).

Com relação à emergência de plântulas em solo e areia, os métodos de inoculação apresentaram diferença significativa apenas para as variáveis, estande final e altura de plântulas. O método de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1) proporcionou a redução do estande e a obtenção de plântulas menores quando comparado aos demais métodos de inoculação, o que pode ter sido o resultado de um maior nível de infecção das sementes inoculadas por este método (Tabela 2). Entretanto, deve-se lembrar que um método de inoculação ideal deve garantir a infecção de sementes e manter de forma satisfatória seu poder germinativo para posterior utilização (Machado *et al.*, 2004).

TABELA 2 – Índice de velocidade de emergência (IVE), estande final, altura e índice de doença (ID) em plântulas de algodoeiro, provenientes de sementes submetidas a três métodos de inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV 27) em sementes de algodoeiro

Método de Inoculação	IVE	Estande final (%)	Altura (cm)	ID (%)
1 ^a	7,46 a	64,92 b	7,0 b	6,45 a
2 ^b	7,91 a	70,50 a	7,3 ab	6,18 a
3 ^c	8,16 a	71,67 a	7,7 a	5,31 a
CV(%)	14,99	10,44	11,62	20,06
DMS	0,82	5,02	0,59	1,40

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

^a= imersão das sementes por 10 minutos na suspensão de 10^6 conídios/mL e incubação em substrato com restrição hídrica; ^b = atomização do inóculo na concentração de 10^6 conídios/mL sobre o substrato com restrição hídrica e sobre as sementes; ^c = sementes em contato com micélio do fungo.

O método de inoculação por imersão das sementes em suspensão de conídios por um determinado período de tempo, já foi objeto de estudo em outros trabalhos (Halfon-Meir & Volcani, 1977; Tanaka & Menten, 1991). Este método apresenta como desvantagem a caracterização, apenas, do processo de contaminação e não infecção. Além disso, a secagem das sementes pode resultar na morte da maioria dos conídios por ressecamento (Tanaka & Menten, 1991). No presente trabalho, estas desvantagens foram superadas pela técnica da restrição hídrica, na qual após a imersão, as sementes foram submetidas a diferentes períodos de exposição sob restrição hídrica, garantindo uma maior infecção das sementes.

Sabe-se que a discrepância de resultados revelados pelos dois testes de avaliação aplicados, teste de germinação em laboratório e emergência em solo e areia, é compreensível com base nos princípios e fundamentos de fitopatologia. Para que uma doença venha a ocorrer, é necessário que aconteça a interação patógeno, hospedeiro e ambiente (Agrios, 2005). Caso haja alteração de um desses componentes como o ambiente, podem ocorrer variações na incidência e na severidade da doença. Neste trabalho, ao mudar o substrato de papel para solo e areia em ambos os testes, observou-se uma acentuada redução nos índices de doença, havendo valores mais elevados para o teste de germinação em laboratório. Isso pode ser devido às condições mais favoráveis que o teste de germinação em rolo de papel proporciona ao desenvolvimento das sementes e, conseqüentemente, do patógeno. Isto também foi observado por Henning & França Neto (1980) e por Machado *et al.* (2001) com relação ao patossistema *Phomopsis sojae* e sementes de soja. Este patógeno teve um comportamento mais agressivo em teste de germinação em laboratório do que em emergência em solo e areia. Este fato, provavelmente, é devido ao mecanismo de escape no qual a plântula, ao emergir, libera o tegumento infectado no solo enquanto que, no teste de germinação (rolo de papel) o tegumento permanece em contato com os cotilédones, por um período de tempo maior.

Para o índice de velocidade de emergência (IVE), a ausência de diferença significativa entre os tratamentos, para os três métodos de inoculação, pode estar relacionada às condições de restrição hídrica, que foram as mesmas em todos os casos (Tabela 3). Comparando-se os isolados, pode-se observar diferença significativa entre eles para todas as variáveis analisadas. As plântulas emergidas do tratamento controle, cujas sementes não foram inoculadas, permaneceram isentas do patógeno diferenciando-se das inoculadas apenas com relação ao índice de doença (Tabela 3).

Dos três métodos avaliados neste ensaio, observou-se que o de inoculação por imersão das sementes na suspensão de conídios por 10 min com posterior incubação em restrição hídrica (método 1), possibilitou a maior ocorrência de sementes infectadas. Este método, provavelmente proporcionou a maior concentração e adesão de conídios nas sementes inoculadas.

Os métodos de inoculação comparados neste estudo apresentaram como vantagens a facilidade de execução, a sua eficácia na produção de sementes

TABELA 3 – Índice de velocidade de emergência (IVE), estande final, altura e índice de doença (ID) em plântulas de algodoeiro, provenientes de sementes inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov)

Fov	IVE	Estande Final (%)	Altura (cm)	ID (%)
Controle	8,45 a	77,83 a	7,7 a	0,00 d
Fov 07	8,29 a	74,33 a	7,8 a	3,68 c
Fov 27	7,48 ab	63,00 bc	7,0 ab	10,12 a
Fov 101	8,47 a	72,33 a	7,8 a	6,18 bc
CNPA 0007	6,58 b	55,83 c	7,3 ab	9,38 ab
MT 01	7,78 ab	70,83 ab	6,5 b	6,53 abc
CV (%)	14,99	10,44	11,62	20,06
DMS	1,42	8,71	1,03	3,62

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

infectadas, a padronização da concentração de inóculo e a possibilidade de uso destas sementes inoculadas por períodos mais prolongados. Como limitação, pode ser

citada a necessidade de maior controle da assepsia dos materiais envolvidos na operação, uma vez que as chances de contaminações externas passem a ser mais evidentes.

Efeito do período de exposição das sementes ao isolado Fov 27 sob condições de restrição hídrica

O nível de inóculo presente nas sementes influencia o nível de germinação e a taxa de transmissão de patógenos, podendo causar morte em pré e pós-emergência de plântulas (Tanaka, 1994; Machado, 1994; Machado & Pozza, 2005). No entanto, com a técnica de restrição hídrica, da forma como vem sendo utilizada, os métodos de inoculação possibilitam a infecção de sementes com diferentes níveis de inóculo de acordo com o tempo de exposição da semente ao patógeno (Machado *et al.*, 2001). Neste trabalho, o maior tempo de contato das sementes com a colônia fúngica provocou o aumento da infecção das sementes pelo patógeno, causando a redução no índice de velocidade de emergência e no estande final (Figura 1A). As sementes expostas ao fungo por cinco dias (120 h) sofreram maior pressão de inóculo, refletindo em menor porcentagem de germinação. Contudo,

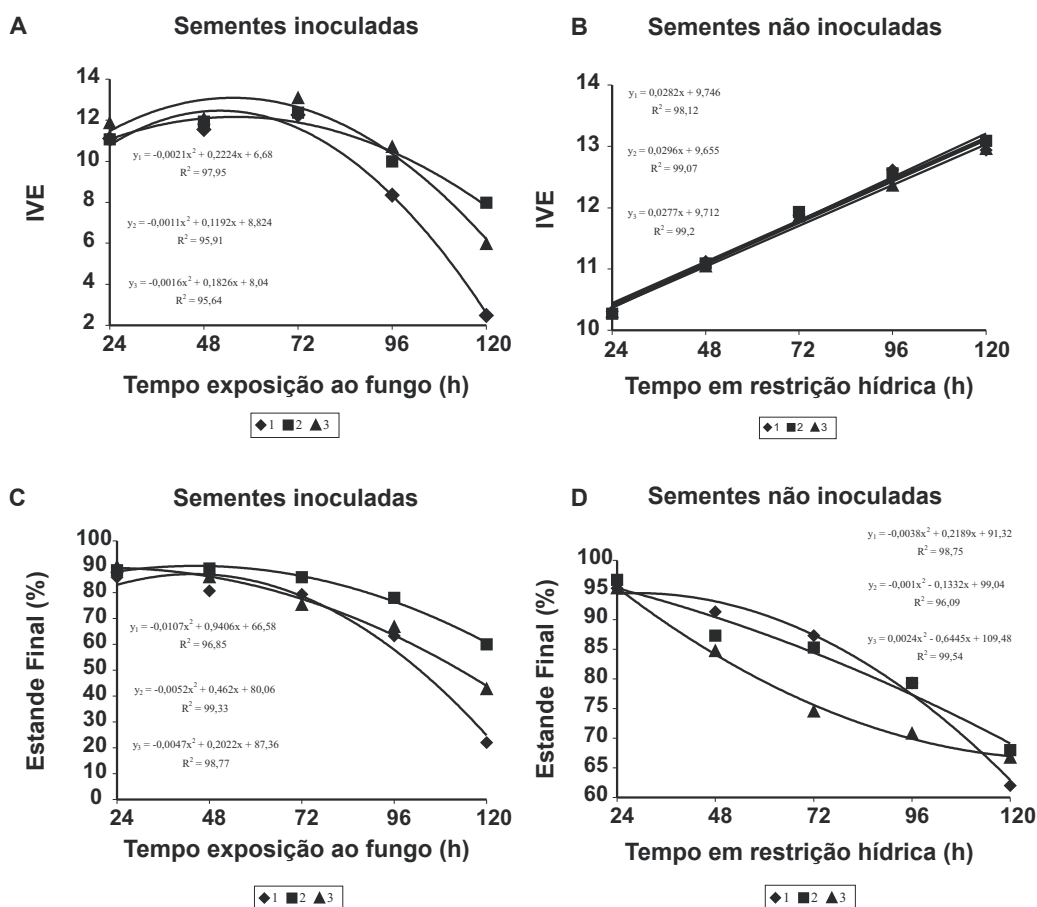


FIG. 1 – Índice de velocidade de emergência (IVE) (A e B) e estande final (C e D) proveniente de sementes de algodoeiro inoculadas e não inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com diferentes métodos em função do tempo de exposição das mesmas ao fungo. 1 = Imersão das sementes na suspensão de conídios e contato com substrato contendo restritor hídrico; 2 = Atomização do inóculo sobre o substrato de papel e sobre as sementes; 3 = Contato direto das sementes com o micélio dos fungos.

é preciso considerar que apenas o condicionamento osmótico também pode exercer influência na germinação de sementes (Figura 1B). Como houve um acréscimo no valor de vigor em sementes sem inóculo, o decréscimo desse valor em sementes inoculadas pode ser atribuído à interação patógeno-semente.

O condicionamento fisiológico (restrição hídrica) em algodão pode influenciar na germinação e no vigor de sementes dependendo das condições de estresse, além de ser uma alternativa viável para maximizar o desempenho de germinação sob qualquer condição. No entanto, concentrações salinas ou restrições hídricas no substrato, naquele estudo, contribuíram para uma leve redução do vigor das sementes. No presente trabalho onde a restrição hídrica foi de $-1,0$ MPa, observou-se que o ponto máximo do índice de velocidade de emergência, considerando a curva obtida nos três métodos de inoculação, variou de 53 h a 57 h de exposição das sementes (Figura 1A). Em outro estudo conduzido por Machado *et al.* (2004), a influência de *Colletotrichum gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *Fov* em sementes de algodão, inoculadas sob restrição hídrica, variou em função do período de exposição das sementes a estes fungos. Para infectar as sementes foi necessário prolongar o tempo de exposição por mais de 48 h. Nestas circunstâncias, estes fungos provocaram a morte de sementes quando expostas a um maior período de tempo, devido ao maior potencial de inóculo.

À medida que houve aumento do período de exposição das sementes livres do patógeno à restrição hídrica, o índice de velocidade de emergência também foi maior (Figura 1B). No entanto, sob estas condições, tanto nas sementes inoculadas como nas livres do patógeno, foi observada a redução do estande final (Figura 1C e 1D). Comportamento parecido foi observado com a cultura da cebola, onde foi possível verificar a redução na germinação das sementes submetidas ao condicionamento osmótico, no entanto, houve incremento na velocidade de emergência quando o período de exposição foi prolongado por até oito dias (Lopes *et al.*, 1996).

Com relação à severidade, a porcentagem de doença aumentou com o aumento do período de exposição das sementes ao patógeno. Com 48 h de exposição das sementes ao fungo, a severidade foi de 27-29% para os três métodos de inoculação estudados. No entanto, nos períodos de exposição de 96 e 120 h, pelo método de inoculação de imersão das sementes na suspensão de conídios (método 1), o índice de doença (ID) foi maior quando comparado ao método de contato direto das sementes ao micélio do fungo (método 3), evidenciando o processo de infecção (Figura 2).

O método de inoculação pela imersão das sementes na suspensão de conídios por 10 min. mostrou-se o mais eficaz na obtenção de sementes infectadas com *Fov*, sendo o período de 53 h a 57 h, de contato das sementes na restrição hídrica, o que proporcionou a obtenção de sementes infectadas sem afetar sua qualidade fisiológica.

Esses resultados representam um avanço nos estudos

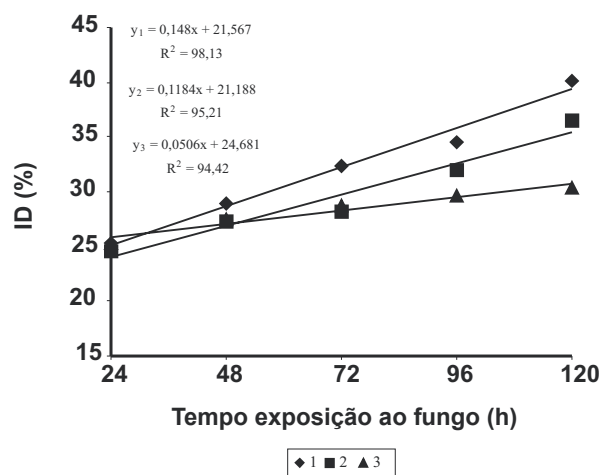


FIG. 2 – Índice de doença (%) em plântulas de algodoeiro provenientes de sementes inoculadas com três métodos em função do tempo de exposição das mesmas ao fungo. 1 = Imersão das sementes na suspensão de conídios por 10 minutos e contato com substrato contendo restritor hídrico; 2 = Atomização do inóculo sobre o substrato de papel e sobre as sementes; 3 = Contato direto das sementes com o micélio do fungo.

com esse patógeno associado às sementes. Por ser de difícil detecção e apresentar baixa transmissão da planta para a semente, a técnica da restrição hídrica possibilitou a obtenção de sementes efetivamente infectadas pelo patógeno, as quais poderão ser utilizadas em estudos, tais como transmissibilidade do patógeno da semente para a planta, considerando os diferentes níveis de inóculo que a técnica pode proporcionar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press. 2005.
- Araújo DV, Pozza EA, Machado JC, Zambenedetti EB, Celano FAO, Carvalho EM, Camargos VN (2006) Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Fitopatologia Brasileira 31:35-40.
- Assigbetse KB, Fernandez D, Dubois, MP, Geiger JP (1994) Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. Phytopathology 84:622-626.
- BRASIL (1992) Ministério da Agricultura. Regras para Análise de Sementes. Brasília DF. LANARV/SNAD/MA.

- Costa MLN, Machado JC, Guimarães RM, Pozza EA, Oride D (2003) Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. *Ciência e Agrotecnologia* 27:1023-1030.
- Ferreira, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. Resumos, 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos SP. 2000. p. 235.
- Halfon-Meiri A, Volcani Z (1977) A combined methods for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. *Seed Science and Technology* 5:129-139.
- Henning AA, França Neto JB (1980) Problemas na avaliação de germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* spp. *Revista Brasileira de Sementes* 2:9-22.
- Lopes HM, Fontes PCR, Maria J, Cecon PR, Malavasi MM (1996) Germinação e vigor de sementes de cebola (*Allium cepa* L.) influenciados pelo período e temperatura de condicionamento osmótico. *Revista Brasileira de Sementes* 18:173-179.
- Machado AQ, Machado JC, Vieira MDGGC, Cassetari Neto D, Souza MV (2007) Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32:408-414.
- Machado JC (1994) Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 2:229-263.
- Machado JC, Langerak CJ (2002) General incubation methods for routine seed health analysis. In: Machado JC, Langerak CJ, Jaccoud-Filho DS (Eds.) *Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis*. International Seed Testing Association. pp. 48-80.
- Machado JC, Oliveira JA, Vieira MGGC, Alves MC (2001) Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. *Revista Brasileira de Sementes* 23:95-101.
- Machado JC, Oliveira JA, Vieira MGGC, Alves MC (2004) Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 26:62-67.
- Machado JC, Pozza EA (2005) Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: Zambolim L (Ed.) *Sementes: qualidade fitossanitária*. Viçosa MG. pp. 375-398.
- Maguire JD (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science* 2:176-177.
- McKinney HH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal Agricultural Research* 26:195-219.
- Michel BE, Radcliffe D (1995) A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal* 87:131-136.
- Nascimento SRC, Kurozawa OC, Maringoni OC (1995) Avaliação de raças fisiológica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira* 20:214-217.
- Sousa MV, Machado JC, Oride D, Prado PER (2002) Metodologia de infecção artificial de sementes de algodão por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Resumos, 7º Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes. Sete Lagoas MG. p. 70.
- Tanaka MAS (1994) Patógenos causadores de tombamento do algodoeiro e seus efeitos sobre a germinação das sementes em diferentes temperaturas. *Fitopatologia Brasileira* 19:29-33.
- Tanaka MAS, Menten JOM (1991) Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. *Summa Phytopathologica* 17:218-226.
- Tanaka MAS, Menten JOM, Marianno MIA (1989) Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. *Summa Phytopathologica* 15:232-237.

Recebido 15 Junho 2007 - Aceito 11 Fevereiro 2008 - TPP 7069
Editor Associado: David S. Jaccoud Filho