

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Macrophomina phaseolina* EM
MAMONEIRA VISANDO À SELEÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES**

MONALIZA RODRIGUES CLAUDINO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE-PB

MARÇO DE 2013

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Macrophomina phaseolina* EM
MAMONEIRA VISANDO À SELEÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES**

MONALIZA RODRIGUES CLAUDINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Agrobioenergia e Agricultura Familiar.

Orientador: Prof. Dr. Dartanhã José Soares

**CAMPINA GRANDE-PB
MARÇO DE 2013**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

C615m

Claudino, Monaliza Rodrigues.

Métodos de inoculação de *macrohomina phaseolina* em mamoneira visando à seleção de genótipos resistentes. [manuscrito] / Monaliza Rodrigues Claudino. – 2013.

30 f. : il.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

“Orientação: Prof. Dr. Dartanhã José Soares, EMBRAPA”

1. Genética vegetal. 2. Manoeira. 3. Inoculação artificial. 4. Resistência genética. I. Título.

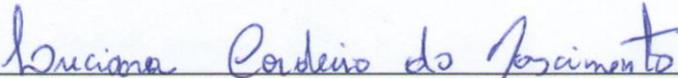
21. ed. CDD 581.3

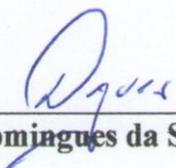
**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Macrophomina phaseolina* EM
MAMONEIRA VISANDO À SELEÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES**

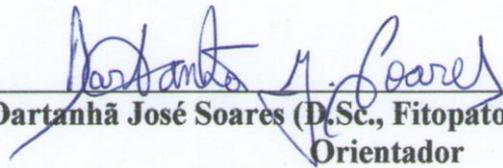
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Agrobioenergia e Agricultura Familiar.

Aprovada em 05 de março de 2013.

Banca Examinadora:


Prof.^a. Luciana Cordeiro do Nascimento (D.Sc., Fitopatologia) - Universidade Federal da Paraíba


Prof. Carlos Alberto Domingues da Silva (D.Sc., Entomologia) – Embrapa Algodão


Prof. Dartanhã José Soares (D.Sc., Fitopatologia) - Embrapa Algodão
Orientador

Aos meus amores eternos Janiel Célio e Thomas Mizaél

DEDICO

*A minha família,
A minha amada mãe,
Ao meu orientador Dartanhã,
por todos os ensinamentos*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Trino fonte de força e luz em meu viver e ao Cristo Jesus por todo seu sacrifício doado por mim na cruz, diante de sua misericórdia a minha gratidão.

Aos meus genitores Marcone Jose e Maria do Socorro, que uniram forças para garantir meus estudos e testemunho de vida plena em comunhão com o próximo.

Ao meu digníssimo Esposo Janiel Célio por sua dedicação, paciência, compreensão e força nas dificuldades e nos prazeres da vida.

Ao meu filho querido Thomas Mizael que com sua inocência soube compreender a minha ausência nos momentos preciosos de seu viver, o meu infinito amor por te.

Aos meus amados irmãos Marcelo, Marconi e Marcos por seus grandes incentivos e toda família que diante deste se dispuseram a compreensão de meus novos passos.

Ao Professor Dr. Dartanhã José Soares, pela oportuna orientação, por seu exemplo de dedicação naquilo que faz, sou muito grata principalmente pelo conhecimento adquirido diante de seus ensinamentos.

A UEPB e a coordenação da Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade de estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias Lemuel Guerra, Germano, Roseane Cavalcanti, Alberto Soares, Liziane Maria, Napoleão Esberard, Carlos Alberto e Dartanhã José Soares, obrigada pelos ensinamentos que foram de grande valia para meu crescimento profissional.

Ao pesquisador da Embrapa Algodão Dr. João Luís da Silva Filho, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao pesquisador da Embrapa Algodão M.Sc. Wirton Macedo Coutinho, por sua colaboração.

Aos professores Luciana Cordeiro do Nascimento e Carlos Alberto Domingues da Silva, por participarem da banca examinadora deste trabalho, através de colaborações com críticas construtivas e sugestões que engrandeceram este trabalho final.

À Embrapa - Algodão, por permitir a utilização dos recursos do laboratório de Fitopatologia, para as análises necessárias a feitura desta dissertação.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos funcionários do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão, Juarez (Seu Juá) e Jacilane Fernandes (Lane) pela contribuição no desenvolvimento dos ensaios realizados e pelo carinho adquirido por eles.

Aos colegas de curso Taísa, Germana, Patrícia, Emanuele, Millena, Geckson e demais pela força, coleguismo e motivação.

Aos colegas estagiários do laboratório de Fitopatologia Romel, Angélica, Waleska, Fabiane, Angélica Talita, Natália, Daniele e Maresa pelas palavras, incentivos e ajuda em algumas avaliações.

*“No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque
ainda não chegou ao fim.”*

(Fernando Sabino)

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A mamoneira e sua importância.....	3
2.2. Doenças que afetam a mamoneira.....	3
2.3. <i>Macrophomina phaseolina</i>	4
2.4. A podridão-negra-do-tronco da mamoneira.....	5
3. METODOLOGIA	7
3.1. Avaliação de métodos artificiais de inoculação de <i>Macrophomina phaseolina</i> em mamoneira.....	7
3.1.1. Método do disco de cultura.....	7
3.1.2. Método do palito de madeira.....	7
3.1.3. Método do grão de arroz.....	8
3.1.4. Condução dos ensaios.....	9
3.1.5. Avaliações e análise estatística.....	9
3.2. Patogenicidade e agressividade de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> à mamoneira.....	9
3.3. Avaliação de um método natural de inoculação de <i>Macrophomina phaseolina</i> em mamoneira.....	10
3.3.1. Preparo do inóculo.....	11
3.3.2. Condução dos ensaios.....	11
3.3.3. Avaliações e análise estatística.....	11
3.4. Reação de genótipos de mamoneira a infecção por <i>Macrophomina phaseolina</i>	12
3.4.1. Condução dos ensaios.....	12

3.4.2. Avaliações e análise estatística.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4.1. Avaliação de métodos artificiais de inoculação de <i>Macrophomina phaseolina</i> em mamoneira.....	14
4.2. Patogenicidade e agressividade de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> ...	16
4.3. Avaliação de um método natural de inoculação <i>Macrophomina phaseolina</i> em mamoneira.....	17
4.4. Reação de genótipos de mamoneira a infecção por <i>Macrophomina phaseolina</i>	21
5. CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> disponíveis na Coleção de Culturas de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão e utilizados no presente estudo.....	10
TABELA 2.	Comparação das médias do desdobramento do comprimento da lesão para os dados de agressividade de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> inoculados pelo método do grão de arroz nos genótipos BRS Energia e BRS Paraguaçu.....	17
TABELA 3.	Altura da planta, diâmetro do caule e peso fresco da parte aérea em função do genótipo e do tratamento de sementes de mamoneira inoculadas com <i>Macrophomina phaseolina</i> aos 40 dias após a semeadura.....	18
TABELA 4.	Peso seco do sistema radicular (PSR) aos 40 dias após a semeadura para o efeito de diferentes genótipos e do tratamento das sementes de mamoneira submetida à inoculação natural com diferentes concentrações de inóculo de <i>Macrophomina phaseolina</i>	21
TABELA 5.	Peso seco do sistema radicular (PSR) de genótipos de mamoneira naturalmente inoculados com <i>Macrophomina phaseolina</i> na concentração de 4% de inóculo (p/p).....	22

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Comprimento médio das lesões de *Macrophomina phaseolina* em caules de plantas de mamoneira das cultivares BRS Energia e BRS Paraguaçu, aos 15 dias após inoculação com palito de madeira, disco de cultura e grão de arroz colonizados pelo fungo..... 15
- FIGURA 2.** Resposta das variáveis, altura da planta (A); diâmetro do caule (B); peso fresco da parte aérea (C) de mamoneira em função de diferentes concentrações de inóculo de *Macrophomina phaseolina* aos 40 dias após semeadura..... 19
- FIGURA 3.** Volume do sistema radicular (cm³) de mamoneira da cultivar BRS Energia (A) e da cultivar BRS Paraguaçu (B) em função de diferentes concentrações de inóculo de *Macrophomina phaseolina* aos 40 dias após semeadura..... 20
- FIGURA 4.** Peso seco do sistema radicular (g) de mamoneira avaliado aos 40 dias após semeadura em função da concentração do inóculo de *Macrophomina phaseolina*..... 20

RESUMO

CLAUDINO, Monaliza Rodrigues. M.Sc. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão. Janeiro de 2013. **Determinação de um método de inoculação para avaliação de resistência de mamoneira a *Macrophomina phaseolina***. Dartanhã José Soares (Orientador).

No presente estudo foram avaliados três métodos de inoculação artificial, e um método de inoculação natural de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira. Foi avaliada também a patogenicidade e agressividade de 20 isolados provenientes de diferentes estados da região nordeste e diferentes culturas hospedeiras, bem como a reação de 11 genótipos de mamoneira quanto a sua resistência à *M. phaseolina*. Dentre os métodos de inoculação artificial testados, o método do palito de madeira apresentou o menor comprimento da lesão, diferindo estatisticamente dos métodos do grão de arroz e disco cultura, os quais não diferiram entre si. Foi observada alta variabilidade quanto à agressividade dos isolados testados, mas não foi observada especificidade de hospedeiro uma vez que isolados provenientes de diferentes culturas foram capazes de causar doença na mamoneira. Quanto à inoculação natural de *M. phaseolina* por meio da infestação artificial do substrato de cultivo, foi observado efeito significativo do genótipo, do tratamento da semente, e da concentração do inóculo sobre o diâmetro do caule, altura da planta, peso fresco da parte aérea, volume do sistema radicular e peso seco do sistema radicular. De modo geral o tratamento das sementes resultou em maiores médias das variáveis analisadas, demonstrando a importância deste no manejo da doença. Quanto maior a concentração de inóculo utilizada, menores foram os valores das variáveis analisadas. Foi observada variabilidade quanto à resistência à *M. phaseolina* entre os genótipos de mamoneira avaliados.

Palavras-chave: podridão-negra-do-tronco, resistência genética, *Ricinus communis*

ABSTRACT

CLAUDINO, Monaliza Rodrigues. M.Sc. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão. Janeiro de 2013. **Evaluation of inoculation methods to screening castor genotypes against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina***. Dartanhã José Soares (Orientador).

In the present study were evaluated three artificial and one natural inoculation method of *Macrophomina phaseolina* on castor. It was also evaluated the pathogenicity and aggressiveness of twenty *M. phaseolina* isolates from distinct Brazilian states and host plants, as well as the reaction of eleven castor genotypes regarding its resistance to charcoal rot pathogen. Among the artificial inoculation methods evaluated, the toothpick method showed the lowest lesion length, differing statistically from the culture disk and rice grain methods, which not differed each other. It was observed high variability in the isolates aggressiveness, but it was not observed host-specificity. The effect of genotype, seed treatment and inoculum density in the natural inoculum assay was statistically significant to all dependent variable evaluated. The seed treatment resulted in an increment of the mean values of the stem diameter, plant height, fresh weight of the aerial part, and dry weight of the root system, evidencing the importance of this practice in the charcoal rot management. With the increase of inoculum density there was observed a reduction in the mean value of the variable stem diameter, plant height, fresh weight of the aerial part, volume of the root system and dry weight of the root system. There was observed variability among the castor genotypes regarding its resistance to *M. phaseolina*, however it was not observed genotypes with high resistance levels.

Keywords: charcoal rot, genetic resistance, *Ricinis communis*

1. INTRODUÇÃO

Com a expansão do cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Brasil, tem-se constatado um aumento na ocorrência de doenças associadas a esta cultura. O uso de cultivares suscetíveis, maior adensamento de plantas, práticas de cultivo inadequadas, uso de sementes de baixa qualidade, estão entre os fatores que favorecem a dispersão dos agentes causais das principais doenças desta cultura (ARAÚJO et al., 2007). Dentre as doenças mais relevantes economicamente podemos citar o mofo-cinzento, ocasionada pelo fungo *Botryotinia ricini* (Godfrey) Whetzel; a murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini* (Wollenw.) W. L. Gordon e a podridão-negra-do-tronco causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (ARAÚJO et al., 2007; SEVERINO et al., 2012).

No Brasil, a podridão-negra-do-tronco é considerada a principal doença da cultura mamoneira, com maior expressividade na região nordeste, especialmente no Estado da Bahia, por ser esse o maior produtor dessa oleaginosa e onde as condições climáticas são favoráveis à ocorrência da doença. Os problemas ocasionados pela doença vão desde a redução do estande inicial de plantas, em virtude da podridão das sementes e morte de plântulas, até redução da produção e morte precoce das plantas, graças à podridão do sistema radicular e do caule, sobretudo em condições de altas temperaturas e deficiência hídrica (ARAÚJO et al., 2007).

Uma vez que *M. phaseolina* é um patógeno habitante do solo, capaz de infectar mais de 500 espécies diferentes de plantas, sobreviver por mais de cinco anos na ausência do hospedeiro e para o qual os métodos curativos de controle não são eficazes e economicamente viáveis, a melhor estratégia de manejo da podridão-negra-do-tronco, em diferentes culturas, reside principalmente na utilização de cultivares que apresentem maior resistência ao patógeno em questão (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; GUPTA et al. 2012; KAUR et al. 2012).

Em virtude da importância da podridão-negra-do-tronco, principalmente nas regiões semiáridas, onde as condições climáticas e de solo favorecem o desenvolvimento da doença, e onde os produtores normalmente utilizam baixos níveis tecnológicos, fica evidente a necessidade de pesquisas visando à caracterização e seleção de genótipos de mamoneira resistentes a essa

doença. Entretanto, para que isso seja possível é imprescindível que se desenvolvam métodos de seleção que sejam rápidos, permitam a avaliação concomitante de grande número de genótipos e apresentem alta reprodutibilidade.

Os métodos de avaliação da resistência à *M. phaseolina* em diversas culturas, podem ser divididos em duas categorias os chamados métodos de inoculação artificial e os métodos de inoculação natural.

Os métodos artificiais de inoculação envolvem, de modo geral, a realização de ferimentos nas plantas, e possuem como principais vantagens a rapidez da resposta e a facilidade de execução e, como principais desvantagens, o fato de não simularem as condições naturais de infecção, provocarem estresse excessivo nas plantas e conseqüentemente, de modo geral, subestimarem os níveis de resistências dos genótipos avaliados.

Por outro lado, os métodos de inoculação natural possuem como principal vantagem o fato de simularem o processo natural de infecção do patógeno, e como principais desvantagens o fato de serem mais demorados e muitas vezes apresentarem escape de infecção e, com isso, supraestimarem os níveis de resistência das plantas avaliadas; entretanto esse fato ocorre principalmente quando da realização de estudos visando à determinação da resistência em condições de campo, onde a distribuição e concentração do inóculo do patógeno pode apresentar alta variabilidade.

Para contornar tal situação, usualmente, utilizam-se métodos de inoculação natural em condições controladas, com a infestação artificial do substrato de cultivo, de forma que a distribuição e concentração do inóculo sejam uniformes e, com isso, a ocorrência de escape seja minimizada, ou mesmo eliminada.

Dessa forma, no presente estudo objetivou-se avaliar diferentes métodos de inoculação artificial e natural, de modo a determinar qual ou quais métodos seriam mais adequados para a avaliação da resistência de genótipos de mamoneira ao agente causal da podridão-negra-do-tronco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A mamoneira e sua importância econômica

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa pertencente à família Euphorbiaceae, originária do continente africano e cultivada em diferentes países do mundo em principalmente em regiões semiáridas (MATOS, 2007), e sua importância reside no alto valor econômico de seu óleo em virtude de suas inúmeras aplicações industriais (SANTOS et al., 2007).

O Brasil é o terceiro maior produtor dessa oleaginosa, com 160 mil hectares plantados, ficando atrás apenas da China, com 200 mil, e da Índia com 840 mil hectares (FREITAS et al., 2010).

A região Nordeste é considerada a principal produtora, responsável por mais de 90% da área plantada nas safras 2008/2009 e 2009/2010, sendo o estado da Bahia o maior produtor nacional com aproximadamente 65% da produção. Nos estados produtores da região Nordeste, a produtividade média da mamoneira é de 543 Kg.ha⁻¹, enquanto nos estados do Sudeste, principalmente São Paulo e Minas Gerais, é de 1.268 Kg.ha⁻¹ (CONAB, 2010). De acordo com dados da CONAB (2012), entre as safras 2010/2011 e 2011/2012, observou-se um acentuado decréscimo da área plantada, produtividade e produção total, principalmente na região nordeste, onde essa redução foi da ordem de 38,5%, 71,2% e 82,2%, respectivamente. Mesmo assim a cultura da mamoneira representa uma das principais atividades de vários municípios do oeste da Bahia.

2.2 Doenças que afetam a mamoneira

A mamoneira é infectada por diversos fitopatógenos que em condições de clima, solo e temperatura favoráveis, se manifestam de forma expressiva, prejudicando o rendimento da cultura (ARAÚJO et al., 2007). Em virtude da grande expansão da cultura mamoneira no Brasil

têm-se observado uma maior ocorrência de doenças, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, sendo essas, muitas vezes intensificadas, principalmente pelo uso de cultivares suscetíveis ou material propagativo de baixa qualidade, aliado ao plantio em áreas de baixa fertilidade do solo e sujeitas a estresses abióticos (SILVA et al., 2009).

Dentre as doenças mais relevantes economicamente na cultura da mamoneira podemos citar o mofo-cinzento, causada pelo fungo *B. ricini*, que destrói rapidamente as inflorescências e os cachos da mamoneira; a murcha-de-fusário causada por *F. oxysporum* f. sp. *ricini*, que causa redução do crescimento, amarelecimento e eventualmente morte da planta; e a podridão-negra-do-tronco causada por *M. phaseolina* que afeta principalmente o sistema radicular e o tronco causando uma podridão de coloração negra que pode resultar na morte da planta (ARAÚJO et al., 2007; SEVERINO et al., 2012).

No Brasil, a podridão-negra-do-tronco é considerada uma das doenças mais importantes, principalmente por não existirem métodos de controle curativo e pelo fato do patógeno estar amplamente disseminado na principal região produtora do país (ARAÚJO et al., 2007; SEVERINO et al., 2012).

2.3 *Macrophomina phaseolina*

Macrophomina phaseolina é considerado um patógeno polífago, capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas, incluindo culturas economicamente importantes como soja, feijão, milho, algodão, girassol, amendoim e mamona (ROSA, 2006; KHAN, 2007; NDIAYE, 2007; ISLAM et al., 2012; GUPTA et al., 2012).

Os sintomas mais comumente observados são tombamento, podridão radicular e podridão do colo e caule (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Esse fungo pertence ao Filo Ascomycota e é caracterizado pela produção de picnídios e microescleródios nos tecidos dos hospedeiros. Esses últimos sendo responsáveis pela sobrevivência do fungo em condições adversas ou na ausência de hospedeiro suscetível, sendo usualmente a fonte primária de inóculo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; NDIAYE, 2007; GUTPA et al. 2012).

Este fungo foi constatado nas Américas do Norte e do Sul, Ásia, África e Europa; entretanto ele é economicamente mais importante em regiões semiáridas de países com clima tropical a subtropical (NDIAYE, 2007).

Microescleródios presentes no solo, sementes infectadas e restos de cultura servem como fonte primária de inóculo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Os exsudados do sistema radicular induzem a germinação dos microescleródios e a infecção das raízes dos hospedeiros. Durante os

estágios iniciais da patogênese, o micélio penetra na epiderme da raiz e fica restrito aos espaços intercelulares do córtex das raízes primárias. Como resultado, células adjacentes entram em colapso podendo levar a morte das plântulas infectadas. Durante o florescimento, hifas do fungo crescem intracelularmente através do xilema e formam microescleródios que bloqueiam os vasos e causam a ruptura das células do hospedeiro (MAYÉK-PÉREZ et al., 2002; KHAN, 2007; KAUR et al. 2012).

As plantas infectadas apresentam lesões necróticas nas raízes, caule, ramos e pedúnculos. Por meio desse último o fungo pode infectar as sementes, sendo estas a principal forma de disseminação do mesmo na grande maioria das culturas afetadas (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990; NDIAYE, 2007). Plantas severamente infectadas morrem prematuramente em virtude da produção de toxinas do fungo e pelo bloqueio dos vasos do xilema (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; NDIAYE, 2007; ISLAM et al., 2012).

Após a morte da planta, a colonização dos tecidos do hospedeiro e a formação de microescleródios continuam. Micélio e microescleródios produzidos no material vegetal são a principal fonte de inóculo do patógeno. Após a decomposição dos restos vegetais os microescleródios são liberados no solo. Esses usualmente encontram-se agrupados, e localizados próximos à superfície do solo numa profundidade de 0-20 cm (MIHAIL, 1989), podendo sobreviver de 2-15 anos dependendo das condições ambientais e se os mesmos estiverem ou não associados a tecidos do hospedeiro (PAPAVIZAS, 1977; BAIRD et al., 2003).

Em virtude de o patógeno poder sobreviver por longo tempo no solo, graças à formação dos microescleródios, depois de introduzido em uma nova área, os microescleródios passam a ser a principal fonte de inóculo primário do fungo (PAPAVIZAS, 1977; DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

2.4. A podridão-negra-do-tronco da mamoneira

No Brasil, a primeira constatação da podridão-negra-do-tronco da mamoneira, causada por *M. phaseolina*, foi na região de Irecê, Estado da Bahia, considerada a maior região produtora de mamona do país (BATISTA et al., 1996).

De modo geral os sintomas dessa doença não são visíveis até aproximadamente a metade da estação de cultivo, quando o fungo já se encontra bem estabelecido na planta (DHINGRA e SINCLAIR, 1978). Na fase inicial da doença os sintomas se assemelham aqueles causados pela murcha-de-fusário, e caracterizam-se pelo amarelecimento das folhas e murcha da planta;

entretanto, pode ser distinguida dessa última por não apresentar enegrecimento dos vasos condutores.

Com a evolução da doença observa-se, ao arrancar uma planta, a necrose total ou parcial do sistema radicular; em seguida a podridão evolui em direção ao caule tornando-o enegrecido. Neste estágio, a visualização apenas dos sintomas externos torna mais difícil a sua distinção em relação a plantas infectadas pela murcha-de-fusário que encontram-se em estágio final de evolução da doença. Em tais situações a distinção de ambas as doenças, no campo, só é possível visualizando a parte interna dos entrenós para a observação da presença dos microescleródios de *M. phaseolina* (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; BATISTA et al., 1996; BATISTA et al., 1997; ARAÚJO et al., 2007). Condições de baixa umidade do solo e temperaturas elevadas favorecem o desenvolvimento da doença e, a expressão dos sintomas é mais evidente quando a planta está sujeita a uma situação de estresse, quer seja por fatores do ambiente, ou por mudança de estágio fenológico (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ARAÚJO et al., 2007).

Por ser um patógeno habitante do solo, o controle químico no campo é econômica e ambientalmente inviável, de forma que recomenda-se apenas o tratamento químico das sementes visando a proteção da planta nos estágios iniciais de desenvolvimento; entretanto é importante salientar que não há registro de fungicidas químicos para o tratamento de sementes da mamoneira (COUTINHO et al., 2012).

Dentre as poucas medidas de manejo dessa doença que podem ser adotadas, aconselha-se a rotação de culturas com espécies de gramíneas, outras que não o milho, e a eliminação dos restos culturais, ambas visando à redução do inóculo na área de cultivo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ARAÚJO et al., 2007). Realizar plantios em regiões que possuam regimes pluviais definidos ou que tenham suplementação de água por irrigação também é uma medida eficaz (ARAÚJO et al., 2007).

Assim sendo, a melhor estratégia de manejo da podridão-negra-do-tronco da mamoneira seria a utilização de genótipos resistentes, entretanto não se tem conhecimento de cultivares de mamoneira que apresentem níveis satisfatórios de resistência à *M. phaseolina* (ARAÚJO et al., 2007).

3. METODOLOGIA

3.1 Avaliação de métodos artificiais de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira

Foram comparados três métodos de inoculação artificial de *M. phaseolina* em mamoneira. Todos os três métodos envolveram a realização de um ferimento no caule onde era depositado o inóculo do fungo.

3.1.1 Método do disco de cultura

Este método foi baseado no estudo descrito por Grezes-Besset et al. (1996), e consistiu na realização de um corte longitudinal, de aproximadamente 1 cm de comprimento por aproximadamente 0,2 cm de profundidade no caule da planta, realizado com auxílio de um bisturi, a cerca de 2 cm de altura do colo da planta. Após a realização do corte, foi depositado um disco de cultura do fungo de 7 mm de diâmetro, o qual foi removido das margens de colônias crescidas em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) cultivadas durante quatro dias em câmara de crescimento a temperatura de 30 °C.

Para o tratamento-controle (testemunha) foi utilizado disco de meio de meio de cultura sem crescimento do fungo. Após a deposição do disco de cultura no local do ferimento, toda a região foi envolta em papel celofane visando evitar a rápida dessecação do disco e permitir a penetração do fungo nos tecidos da planta. Quatro dias após, o papel celofane foi removido.

3.1.2 Método do palito de madeira

Este método foi adaptado de Mihail (1992) e Tesso e Ejeta (2011). Palitos de dente de madeira foram umedecidos em água destilada durante 20 minutos e, em seguida, secos em uma câmara de fluxo laminar por 10 minutos. Decorrido este período, os palitos foram então

acondicionados em frascos e esterilizados por autoclavagem durante 1 hora a 120 °C. Após esterilização, os palitos foram transferidos assepticamente para placas de Petri, contendo meio BDA, juntamente com discos de cultura do fungo, obtidos conforme descrito no método de inoculação por disco de cultura (item 3.1.1). As placas foram então mantidas em câmara de crescimento a 30 °C, no escuro, durante 15 dias, de forma a permitir a colonização dos palitos pelo fungo e a produção de microescleródios sobre a superfície dos mesmos. Decorrido este período, os palitos foram secos por 12 horas em câmara de fluxo laminar e posteriormente armazenados em placas de petri descartáveis sob temperatura ambiente até a realização do ensaio.

A inoculação consistiu da inserção do palito colonizado pelo patógeno no caule das plantas de mamoneira, a uma altura de aproximadamente de 2 cm do colo da planta. Para o tratamento-controle (testemunha), utilizaram-se palitos esterilizados sem crescimento do fungo. Para permitir a melhor fixação do palito, a inserção do mesmo no caule das plantas foi realizada em ângulo aproximado de 45 graus.

3.1.3 Método do grão de arroz

Este método, adaptado do estudo de Amusa et al. (2007), consistiu na utilização de grãos de arroz colonizados pelo fungo.

Para a colonização dos grãos de arroz, foi utilizada a metodologia adaptada de Mihail (1992), Amusa et al. (2007) e Iqbal et al. (2010). Em frascos do tipo erlenmeyers de 200 mL, adicionaram-se 100 g de arroz parboilizado e 20 mL de água destilada, os quais foram esterilizados por autoclavagem durante 30 minutos. Após resfriamento, foi adicionado em cada frasco cinco discos de micélio do fungo obtidos conforme descrito no método de inoculação por disco de cultura (item 3.1.1). Os frascos foram então mantidos em câmara de crescimento a 30 °C, no escuro, até a completa colonização dos grãos. Para garantir uma colonização mais rápida e uniforme, a partir do terceiro dias, após deposição dos discos contendo micélio do fungo, os frascos foram manualmente agitados diariamente. Após a colonização dos grãos, os mesmos foram secos, por 12 horas, em câmara de fluxo laminar e posteriormente armazenados em sacos de papel sob temperatura ambiente, até o momento da inoculação.

A inoculação consistiu da inserção de um grão de arroz colonizado pelo fungo em um ferimento, realizado no caule da planta à aproximadamente 2 cm de altura do colo das plantas com o auxílio de uma haste de metal com o mesmo diâmetro dos grãos. Para o tratamento-controle (testemunha) foram utilizados grãos de arroz não colonizados pelo fungo.

3.1.4 Condução dos ensaios

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação. Foi utilizado o isolado CCMF-CNPA 286, uma vez que o mesmo apresentou alta agressividade em estudos preliminares. As inoculações foram realizadas nas cultivares BRS Energia e BRS Paraguaçu, aos 30 dias após a germinação. Para o cultivo das plantas foram utilizados tubetes plásticos com capacidade para 280 mL, contendo uma mistura de turfa e vermiculita, na proporção de 3:1, previamente autoclavada por três dias consecutivos, durante uma hora a 120 °C. Antes da semeadura, as sementes foram tratadas com uma mistura comercial de carboxina+tiram, conforme definido em Coutinho et al. (2012). Foram semeadas duas sementes por tubete e após a germinação foi realizado o desbaste mantendo apenas uma planta por tubete. Os ensaios foram conduzidos em esquema fatorial 2 x 3 (genótipo x método de inoculação), no delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições, sendo uma planta por repetição. O ensaio foi repetido duas vezes.

3.1.5 Avaliações e análise estatística

Para todos os métodos de inoculação a avaliação consistiu da medição do comprimento da lesão aos 15 dias após a inoculação, com o auxílio de uma régua milimétrica.

Os dados de comprimento da lesão foram submetidos a análises de variância, e teste de média utilizando-se o pacote estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011). Para melhor atender as pressuposições da análise de variância os dados de comprimento de lesão foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$.

3.2 Patogenicidade e agressividade de isolados de *Macrophomina phaseolina* à mamoneira

Neste ensaio foi testada a patogenicidade e agressividade de 20 isolados de *M. phaseolina* disponíveis na Coleção de Culturas de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão, especificados na Tabela 1, utilizando-se os genótipos BRS Paraguaçu e BRS Energia.

O método de inoculação utilizado foi o método do grão de arroz, conforme descrito acima (item 3.1.3). As plantas foram cultivadas conforme descrito no item 3.1.4. O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 2 x 20 (genótipo x isolado) no delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo uma planta por repetição. As avaliações do comprimento

da lesão e análises estatísticas foram realizadas conforme descrito no item 3.1.5 aos 10 dias após a inoculação. O ensaio foi repetido duas vezes.

Tabela 1. Isolados de *Macrophomina phaseolina* disponíveis na Coleção de Culturas de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão e utilizados no presente estudo.

Isolado	Hospedeiro		
	Nome Científico	Cultivar*	Origem
CCMF-CNPA 274	<i>Sesamum indicum</i>	BRS Seda	Campina Grande/PB
CMM 527	<i>Cucumis melo</i>	NI	Mossoró/RN
CMM 2062	<i>C. melo</i>	NI	Mossoró/RN
CCMF-CNPA 277	<i>Helianthus annuus</i>	NI	Campina Grande/PB
CCMF-CNPA 278	<i>Jatropha gossypifolia</i>	MS	Lagoa Seca/PB
CCMF-CNPA 279	<i>R. communis</i>	MS	Central/BA
CCMF-CNPA 281	<i>R. communis</i>	MS	Central/BA
CCMF-CNPA 282	<i>R. communis</i>	BRS Energia	Irecê/BA
CCMF-CNPA 283	<i>R. communis</i>	BRS Energia	Irecê/BA
CCMF-CNPA 284	<i>R. communis</i>	BRS Energia	Irecê/BA
CCMF-CNPA 285	<i>R. communis</i>	BRS Energia	Irecê/BA
CCMF-CNPA 286	<i>R. communis</i>	BRS Energia	Irecê/BA
CCMF-CNPA 287	<i>R. communis</i>	CNPAM 2001-42	Patos/PB
CCMF-CNPA 288	<i>R. communis</i>	IAC 2028	Irecê/BA
CCMF-CNPA 289	<i>R. communis</i>	BRS Nordestina	Irecê/BA
CCMF-CNPA 290	<i>R. communis</i>	BRS Paraguaçu	Irecê/BA
CCMF-CNPA 291	<i>R. communis</i>	BRS Nordestina	Central/BA
CCMF-CNPA 292	<i>R. communis</i>	BRS Nordestina	Irecê/BA
CCMF-CNPA 293	<i>Gossypium hirsutum</i>	BRS 286	Apodí/RN
CCMF-CNPA 294	<i>G. hirsutum</i>	BRS 286	Apodí/RN

* NI = genótipo não identificado; MS = material selvagem.

3.3. Avaliação de um método natural de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira.

Neste ensaio, foi avaliada a eficácia da inoculação natural de *M. phaseolina*, a partir de substrato de cultivo artificialmente infestado com inóculo do fungo.

3.3.1 Preparo do inóculo

O inóculo para condução do presente ensaio foi preparado utilizando a metodologia do grão de arroz descrita no item 3.1.3. O isolado utilizado foi o CCMF-CNPA 286.

3.3.2 Condução dos ensaios

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação. Foram utilizados os genótipos BRS Energia e BRS Paraguaçu, com e sem tratamento das sementes com uma mistura comercial de carboxina+thiram, conforme definido em Coutinho et al. (2012), as quais foram semeadas em tubetes contendo o mesmo substrato de cultivo utilizado nos ensaios anteriores. Para a infestação do substrato de cultivo, após a esterilização e resfriamento do mesmo e antes do enchimento dos tubetes, foi realizada a incorporação do inóculo do fungo, por meio do revolvimento sucessivo do substrato juntamente com o inóculo até completa uniformização da mistura. Foram avaliadas cinco concentrações do inóculo. Para a obtenção das diferentes concentrações, o substrato de cultivo e o inóculo foram pesados separadamente, e esse último foi então incorporado nas proporções de 0 g, 1,55 g, 3,10 g, 6,21 g, e 12,41 g do inóculo por tubetes de 280 cm³ (~155 g do substrato de cultivo) de modo a obter as concentrações desejadas de 0%, 1 %, 2 %, 4 % e 8 % (p/p).

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial triplo (genótipo x tratamento de semente x concentração do inóculo), no delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo um tubete com uma planta por repetição. A semeadura foi realizada depositando-se duas sementes por tubete, com posterior desbaste mantendo-se apenas uma planta por tubete.

3.3.3 Avaliações e análise estatística

As avaliações foram realizadas aos 40 dias após a semeadura e consistiram da determinação do diâmetro do caule (DC) junto à região do colo da planta; da altura da planta

(AP) a partir do colo até o último entrenó; do peso fresco da parte aérea (PFPA); do volume do sistema radicular (VSR); e do peso seco do sistema radicular (PSR). A determinação do DC foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital, enquanto que a altura da planta foi determinada com uma régua milimétrica. Para a determinação do volume do sistema radicular as plantas foram cuidadosamente removidas dos tubetes e lavadas em água corrente, visando à eliminação dos resíduos do substrato de cultivo. O excesso de água da lavagem foi removido com o auxílio de papel de filtro e as raízes foram então imersas em uma proveta graduada, contendo água em volume pré-definido. O volume do sistema radicular foi obtido subtraindo-se o volume final do volume inicial. Para a obtenção do peso seco do sistema radicular, após determinação do volume, as raízes foram deixadas secar por dois dias consecutivos em papel de filtro sobre bancada em laboratório; decorrido esse período as raízes foram individualmente pesadas em balança semi-analítica. O ensaio foi repetido duas vezes.

As análises de variância, regressão e teste de médias foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011). Os dados de volume do sistema radicular foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$, para melhor atender as pressuposições da análise de variância. Os gráficos de regressão foram construídos utilizando-se o software R.

3.4. Reação de genótipos de mamoneira à infecção por *Macrophomina phaseolina*

Nesse ensaio foram avaliados 11 genótipos de mamoneira, sendo eles: BRS Energia, BRS Paraguaçu, BRS Nordestina, BRS Gabriela, EBDA MPB 01, EBDA MPA 11, EBDA MPA 34, IAC 80, IAC 2028, CNPAM 2009-7 e BRA 3182, utilizando-se a metodologia descrita no item 3.3.

3.4.1 Condução do ensaio

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação em esquema de blocos ao acaso com sete repetições, sendo cada repetição composta por quatro plantas. Foram semeadas duas sementes por tubetes, e após germinação foi realizado o desbaste mantendo-se apenas uma planta. As sementes de todos os genótipos, antes da semeadura, foram tratadas com uma mistura comercial de carboxina+tiram, conforme definido em Coutinho et al. (2012).

A produção do inóculo e incorporação ao substrato de cultivo foi realizada conforme descrito no 3.3.2, utilizando-se apenas a concentração de 4% de inóculo (p/p) composto de uma mistura equitativa dos isolados CCMF-CNPA 286 e CCMF-CNPA 289.

Para isolar o efeito dos genótipos sobre as variáveis a serem analisadas foram utilizadas plantas cultivadas em substrato sem a presença do fungo (tratamento controle) e os dados obtidos foram utilizados para determinação do efeito da presença de inóculo sobre o comportamento dos genótipos calculando-se a porcentagem relativa de redução das variáveis analisadas.

3.4.2 Avaliações e análise estatística

As avaliações consistiram da determinação do peso seco do sistema radicular (PSR), aos 40 dias após a semeadura, conforme descrito no ensaio 3.3.3.

As análises de variância e teste de médias foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAS[®] v.9.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação de métodos artificiais de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira

Todos os três métodos avaliados induziram sintomas nas plantas inoculadas. Houve efeito significativo do método de inoculação sobre o comprimento das lesões. Não houve efeito do genótipo nem da interação entre método de inoculação/genótipo.

Os métodos de inoculação com disco de cultura e grão de arroz não diferiram estatisticamente entre si, mas ambos diferiram do método do palito (Figura 1).

O método de inoculação por meio do disco de cultura, apesar de ter sido utilizado com sucesso em um estudo pioneiro para a avaliação de resistência da mamoneira a *M. phaseolina* (GREZES-BESSET et al. 1996) foi, no presente estudo, considerada laboriosa e sujeita a maior probabilidade de erro, pois além de necessitar da realização de um fermento prévio, faz-se necessário também que o local da inoculação seja envolto por um filme plástico para evitar a dessecação do disco, o que operacionalmente tornou esse método de inoculação mais lento e dispendioso.

A inoculação por meio do palito de madeira foi considerado o método de inoculação menos laborioso, pois não requer a realização de fermento prévio. Esse método é comumente utilizado em estudos envolvendo *M. phaseolina*, justamente por ser de fácil operação (MIHAIL, 1992).

Embora, no presente estudo, o método de inoculação por meio do palito de madeira tenha sido considerado de fácil execução e tenha apresentado menor amplitude do erro padrão da média, o comprimento médio das lesões, foi em geral 3 vezes menor do que as lesões resultantes dos métodos de inoculação por meio do disco de cultura ou do grão de arroz. Assim sendo, a utilização de tal método em estudos futuros deve ser cautelosamente avaliada de forma a evitar a subestimação dos resultados obtidos.

Apesar de ser de rápida execução o método do palito de madeira não foi considerado adequado para avaliar a interação entre *M. phaseolina*/mamoneira mediante os resultados obtidos no presente estudo. Contudo, em um dos trabalhos pioneiros para avaliar a resistência da mamoneira à *M. phaseolina*, esse método foi considerado adequado, muito embora os autores não tenham mostrado os resultados detalhados sobre a eficácia desse método (GREZES-BESSET et al. 1996).

O método do grão de arroz, apesar de requer a realização de um fermento prévio, à inserção do grão, foi considerado de fácil execução, pois o uso da haste de metal pontiaguda permitiu maior uniformização e rapidez na realização do fermento, quando comparado ao método do disco de cultura. Adicionalmente, após a deposição do inóculo, não foi necessário envolver a região com filme plástico, permitindo assim maior agilidade na inoculação.

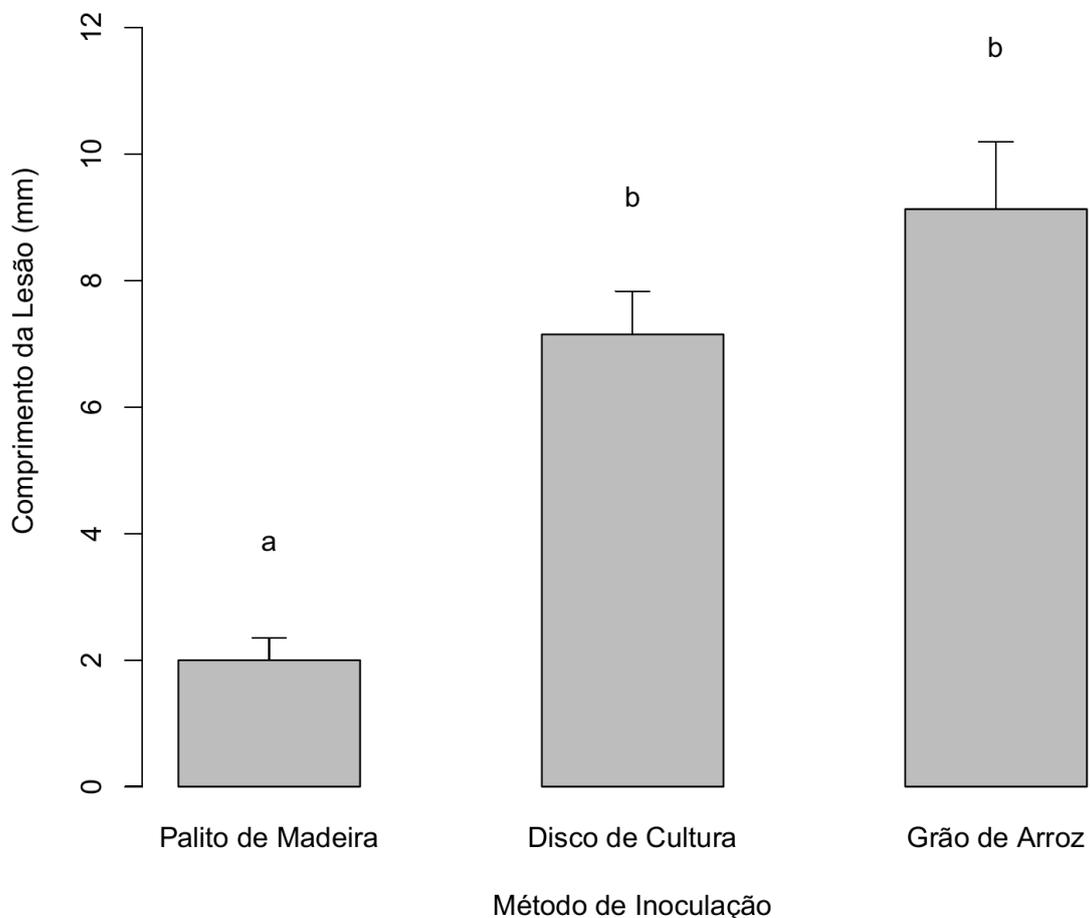


Figura 1. Comprimento médio das lesões de *Macrophomina phaseolina* em caules de plantas de mamoneira das cultivares BRS Energia e BRS Paraguaçu, aos 15 dias após inoculação com palito de madeira, disco de cultura e grão de arroz colonizados pelo fungo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2 Patogenicidade e agressividade de isolados de *Macrophomina phaseolina*

Todos os isolados testados foram patogênicos à mamoneira. Houve variação na agressividade dos isolados em função do genótipo do hospedeiro. Os isolados CCMF-CNPA 281, 287, 288, 291 e 294 resultaram em 80-100% de morte das plantas inoculadas e foram excluídos da análise de variância e teste de médias. Esses isolados foram considerados os mais agressivos.

Dentre os 15 isolados restantes, os isolados CCMF-CNPA 274, CMM 527 e CMM 2062 foram considerados os menos agressivos, enquanto que os isolados CCMF-CNPA 279 e CCMF-CNPA 282 foram considerados os mais agressivos, independente do genótipo do hospedeiro. Os demais isolados apresentaram comportamento intermediário que variou em função do genótipo do hospedeiro (Tabela 2).

Não foi observada especificidade do hospedeiro entre os isolados testados, o que pode ser observado pelo comportamento do isolado CCMF-CNPA 285, oriundo de mamoneira e considerado um dos menos agressivos, e o isolado CCMF-CNPA 294, oriundo de algodoeiro e considerado um dos mais agressivos.

Entretanto, os isolados CMM 527, CMM 2062 obtidos de *C. melo* e o CCMF-CNPA 274, obtido de *S. indicum*, apesar de terem sido considerados patogênicos a mamoneira, resultaram em lesões menores de 0,5 cm de comprimento, indicando que esses isolados podem possuir alguma preferência de hospedeiro (PEARSON et al. 1987; MIHAIL; TAYLOR, 1995; MAYÉK-PÉREZ et al., 2001; SU et al., 2001; GUPTA et al., 2012; RAYATPANAH et al., 2012).

Tabela 2. Comparação das médias do desdobramento do comprimento da lesão para os dados de agressividade de isolados de *Macrophomina phaseolina* inoculados pelo método do grão de arroz nos genótipos BRS Energia e BRS Paraguaçu.

Isolado	Comprimento da lesão (mm)*	
	BRS Energia	BRS Paraguaçu
CCMF-CNPA 274	2,06 a	2,17 a
CCMF-CNPA 285	2,96 a	5,92 b
CMM 527	3,16 a	3,20 a
CMM 2062	3,37 a	3,41 a
CCMF-CNPA 292	6,84 b	6,45 b
CCMF-CNPA 293	7,47 b	8,80 b
CCMF-CNPA 289	7,88 b	19,52 c
CCMF-CNPA 284	13,29 c	9,05 b
CCMF-CNPA 290	14,37 c	8,92 b
CCMF-CNPA 283	16,56 c	9,63 b
CCMF-CNPA 286	16,98 c	21,09 c
CCMF-CNPA 277	17,40 c	17,06 c
CCMF-CNPA 278	25,94 d	24,10 c
CCMF-CNPA 279	36,95 e	29,91 d
CCMF-CNPA 282	44,16 e	35,24 d

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4.3 Avaliação de método natural de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira.

Os efeitos de genótipos, tratamento da semente e concentração de inóculo foram estatisticamente significativos para todas as variáveis testadas, com exceção do tratamento da semente sobre o volume do sistema radicular. Não houve efeito significativo das interações para a maioria das variáveis testadas, com exceção da interação entre genótipo x tratamento da semente sobre o peso seco do sistema radicular, e genótipo x concentração para o volume do sistema radicular.

Com relação ao genótipo a cultivar BRS Energia apresentou menores médias para as variáveis diâmetro do caule (DC) e peso fresco da parte aérea (PFPA), e maior média para a variável altura de planta (AP), quando comparado a cultivar BRS Paraguaçu (Tabela 3).

O tratamento das sementes com fungicida, em comparação as sementes não tratadas, proporcionou, no caso das variáveis DC, AP e PFPA um incremento nos valores médios observados (Tabela 3).

Os resultados obtidos comprovam que o tratamento das sementes com fungicidas é uma medida que deveria ser adotada no manejo da podridão-negra-do-tronco da mamoneira. Infelizmente no Brasil não existem produtos registrados para o tratamento de sementes de mamoneira, embora muitos produtos tenham demonstrado eficácia quanto a melhoria da qualidade fisiológica das sementes da mamoneira (COUTINHO et al., 2012).

Tabela 3. Altura da planta, diâmetro do caule e peso fresco da parte aérea em função do genótipo e do tratamento de sementes de mamoneira inoculadas com *Macrophomina phaseolina* aos 40 dias após a semeadura.

Variável	Médias*			
	Genótipo		Tratamento das sementes	
	BRS Energia	BRS Paraguaçu	Sem	Com
Altura da planta	9.71 a	8.64 b	8.65 a	9.70 b
Diâmetro caule	3.54 a	3.81 b	3.63 a	3.72 b
Peso fresco parte aérea	2.30 a	2.80 b	2.42 a	2.68 b

*Médias seguidas de mesma letra na linha, para cada um dos efeitos principais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste *F* a 5 % de probabilidade.

O aumento na concentração do inóculo resultou na diminuição do DC, da AP e PFPA, conforme pode ser observado na Figura 2.

Apesar de no presente estudo as variáveis DC, AP, PFPA terem apresentado diferenças estatísticas significativas em relação aos efeitos principais, a utilização das mesmas em estudos para determinação da resistência de genótipos de mamoneira à *M. phaseolina* não foi considerada satisfatória uma que estas variáveis são medidas indiretas e apresentam uma variação intrínseca diretamente ligadas a expressão fenotípica dos genótipos e como consequência não necessariamente relacionadas à fatores de resistência ao patógeno.

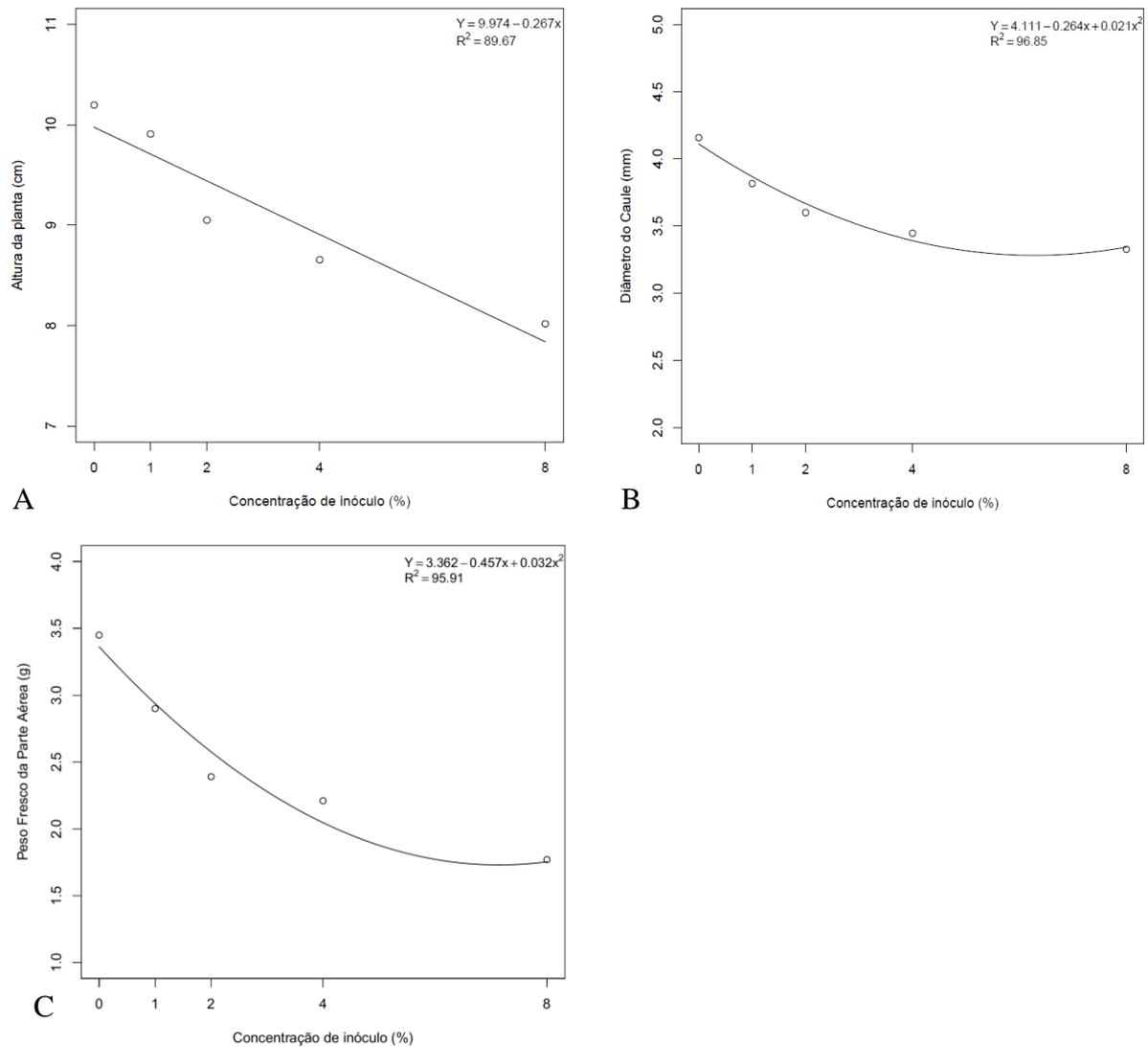


Figura 2. Resposta das variáveis, altura da planta (A); diâmetro do caule (B); peso fresco da parte aérea (C) de mamoneira em função de diferentes concentrações de inóculo de *Macrophomina phaseolina* aos 40 dias após semeadura.

Para a variável VSR houve efeito significativo da interação entre genótipo e concentração de inóculo.

Para ambas as cultivares, quanto maior a concentração do inóculo do fungo menor foi o volume do sistema radicular (Figura 3).

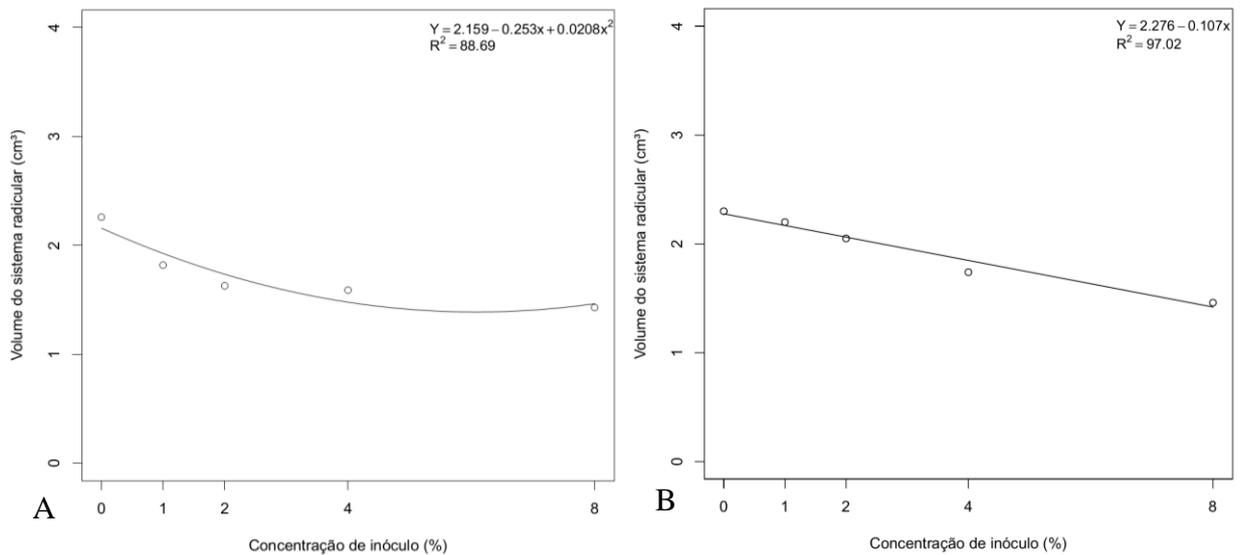


Figura 3. Volume do sistema radicular (cm³) de mamoneira da cultivar BRS Energia (A) e da cultivar BRS Paraguaçu (B) em função de diferentes concentrações de inóculo de *Macrophomina phaseolina* aos 40 dias após semeadura.

Para a variável PSR houve efeito significativo da interação entre genótipos e tratamento de sementes. Em relação à concentração do inóculo a variável PSR se comportou da mesma forma que as demais variáveis analisadas, ou seja, com o aumento da concentração de inóculo de *M. phaseolina* houve um decréscimo do peso seco das raízes (Figura 4).

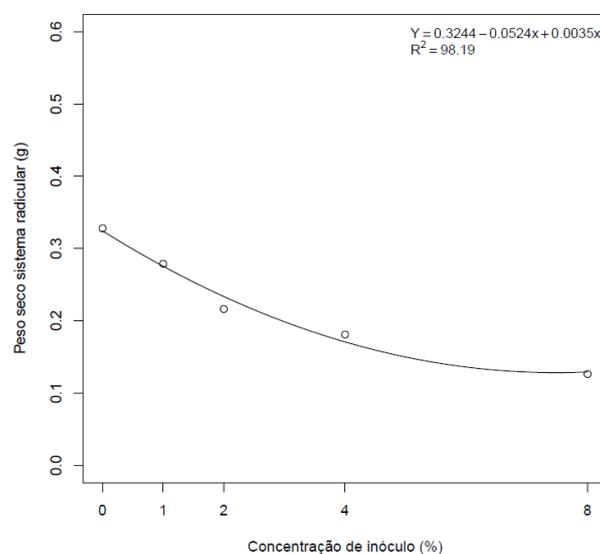


Figura 4. Peso seco do sistema radicular (g) de mamoneira avaliado aos 40 dias após semeadura em função da concentração do inóculo de *Macrophomina phaseolina*.

Quando do desdobramento da interação entre genótipo e tratamento das sementes, é possível observar que no caso do genótipo mais suscetível, ou seja, BRS Energia, o tratamento químico das sementes com fungicida não foi efetivo. Por outro lado, no caso da cultivar BRS Paraguaçu, cuja resistência a *M. phaseolina* é considerada maior quando comparada a BRS Energia, o tratamento das sementes com fungicidas apresentou resultados significativos, ou seja, o peso seco do sistema radicular foi maior quando as sementes de BRS Paraguaçu foram tratadas com fungicida em comparação as sementes não tratadas. Nesse caso pode-se inferir que houve um efeito sinérgico entre o tratamento das sementes e a maior resistência ao patógeno, na cultivar BRS Paraguaçu, o que resultou em maior efeito daquele (Tabela 4).

Apesar das variáveis VSR e PSR serem medidas indiretas, ou seja, não avaliam diretamente a quantidade da doença, ambas apresentaram uma resposta direta à ocorrência do patógeno, uma vez que o mesmo afeta principalmente o sistema radicular, e por consequência genótipos mais resistentes apresentam sistema radicular menos comprometido.

A obtenção do PSR é operacionalmente menos laboriosa que a obtenção do VSR, dessa forma, recomenda-se que em estudos futuros para avaliar a resistência de mamoneira a *M. phaseolina* seja utilizada a variável peso seco do sistema radicular, visto que a mesma possui uma correlação direta com a severidade da ocorrência da doença.

Tabela 4. Peso seco do sistema radicular (PSR) aos 40 dias após a semeadura para o efeito de diferentes genótipos e do tratamento das sementes de mamoneira submetida à inoculação natural com diferentes concentrações de inóculo de *Macrophomina phaseolina*.

Tratamento das sementes	BRS Energia	BRS Paraguaçu
Sem tratamento	0,212 a A	0,214 a A
Com tratamento	0,215 a A	0,264 b B

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4.4 Reação de genótipos de mamoneira à infecção por *Macrophomina phaseolina*

Houve diferenças quanto à resistência dos genótipos avaliados em relação ao peso seco do sistema radicular. Os genótipos EBDA MPB 01 e BRS Nordestina foram os que apresentaram

o menor percentual de redução do peso seco do sistema radicular, sendo assim menos suscetíveis à *M. phaseolina*, quando comparados com o genótipo BRA 3182, que apresentou o maior percentual de redução do peso seco do sistema radicular. Os demais genótipos, não diferiram estatisticamente entre si, ou entre os genótipos EBDA MPB 01, BRS Nordestina e BRA 3182 (Tabela 5).

Tabela 5. Peso seco do sistema radicular (PSR) de genótipos de mamoneira naturalmente inoculados com *Macrophomina phaseolina* na concentração de 4% de inóculo (p/p).

Genótipo	PSR (%)
EBDA MPB 01	29,00 a
BRS-NORDESTINA	34,13 a
EBDA MPA 11	38,76 ab
BRS-PARAGUAÇU	40,95 ab
EBDA MPA 34	43,42 ab
BRS-ENERGIA	44,85 ab
IAC -80	45,22 ab
IAC-80-2028	52,33 ab
BRS- GABRIELA	55,26 ab
CNPAM 2009-7	55,79 ab
BRA 3182	61,73 b

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a 5 % de probabilidade pelo teste de SNK.

É importante ressaltar que *M. phaseolina*, pode infectar as sementes de diferentes culturas, reduzindo a velocidade de germinação ou mesmo causando o tombamento pré-emergência, devido ao apodrecimento das sementes (DHINGRA e SINCLAIR, 1978). Tal fato foi constatado no presente estudo e resultou em perda (sementes não germinadas ou morte prematura de plântulas) de várias repetições, quando da comparação com as testemunhas sem inoculação, onde a velocidade e percentual de germinação foram muito superior, principalmente em relação ao genótipo BRA 3182, cuja germinação foi de 100% aos 15 dias no tratamento controle, comparado com menos de 50 % aos 20 dias no tratamento com inóculo do fungo presente no substrato de cultivo.

Em todos os tratamentos controle, ou seja, genótipos semeados em substrato de cultivo sem a presença do inóculo do fungo, aos 15 dias após semeadura houve 100% de germinação das plântulas, enquanto que na presença do inóculo do fungo, mesmo aos 30 dias após a semeadura houve em média, considerando todos os genótipos, cerca de 20% de redução da germinação (dados não apresentados). A única exceção foi o genótipo EBDA MPB 01 cuja porcentagem de germinação do tratamento controle não foi de 100%, embora o percentual de sementes não germinadas tenha sido semelhante a média de todos os genótipos.

Essa alta ocorrência de tombamento pré-emergência foi atribuído a utilização de uma concentração muito elevada do inóculo do fungo. Embora, usualmente, recomendasse a utilização de concentrações da ordem de 5 a 10% de inóculo de *M. phaseolina* (DHINGRA E SINCLAIR 1978; MAYEK-PEREZ et al. 2001), pode-se observar nas figuras 2 a 4, que houve pouca diferença, quanto ao comportamento das variáveis analisadas em relação as concentrações de 2 e 4% de inóculo do fungo. Assim sendo, em estudos futuros seria preferível utilizar a concentração de 2% de inóculo do fungo, pois além de haver uma redução de custos, é possível que a mesma resulte na redução da ocorrência do tombamento pré-emergência, sem que houvesse interferência sobre a capacidade discriminatória dos genótipos a serem avaliados.

A melhor maneira de se testar a patogenicidade de um fungo e selecionar plantas para resistência é por meio da utilização de um método cuja resposta seja exclusivamente induzida pelo patógeno, mimetizando assim o processo natural de infecção e eliminando qualquer estresse, às plantas, que não estejam relacionados ao patógeno (BECERRA-LOPEZ LAVALLE et al. 2012). Assim, o método desenvolvido no presente estudo atende a essas premissas, pois além de permitir a simulação do processo natural de infecção, permite uma uniformização da quantidade de inóculo no substrato de cultivo.

5. CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Macrophomina phaseolina* testados foram patogênicos a mamoneira.

Existe variabilidade quanto à agressividade de isolados de *Macrophomina phaseolina* à mamoneira.

O comprimento da lesão ocasionado por *Macrophomina phaseolina* é influenciado pelo método de inoculação utilizado.

O método de inoculação natural, por meio da incorporação de inóculo do fungo ao substrato de cultivo, foi eficiente na indução de sintomas da doença. Esse método foi considerado mais adequado para a avaliação da reação de genótipos de mamoneira à *Macrophomina phaseolina*, pois simula condições naturais de infecção.

O peso seco do sistema radicular foi a variável mais adequada para a avaliação da reação de genótipos de mamoneira quanto à resistência a *Macrophomina phaseolina*.

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Seed transmission and effect of fungicide treatments against *Macrophomina phaseolina* in dry edible beans. **Turrialba**, v.40, p.334-339, 1990.
- AMUSA, N. A.; OKECHUKWU, R. U.; AKINFENWA, B. Reactions of cowpea to infection by *Macrophomina phaseolina* isolates from leguminous plants in Nigeria. **African Journal of Agricultural Research**, v.2, p.73-75, 2007.
- ARAÚJO, A. E. de.; SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Doenças e seu Manejo. In: AZEVEDO, D. M. P. de.; BELTRÃO, E. de M. (Ed). **O Agronegócio da Mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, 2 ed. rev. e ampl. 2007. p.283-301.
- BAIRD, R. E.; WATSON, C. E.; SCRUGGS, M. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. **Plant Disease**, v.87, p.563-566, 2003.
- BATISTA, F. A. S.; LIMA, E. F.; SOARES, J. J.; AZEVEDO, D. M. P. de. **Doenças e pragas da mamoneira (*Ricinus communis* L.) e seu controle**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1996. 53p. (EMBRAPA, CNPA. Circular Técnica, 21).
- BATISTA, F. A. S.; LIMA, E. F.; AZEVEDO, D. M. P.; SANTOS, J. W.; PIRES, V. A. **Avaliação do nível de resistência de genótipos de mamoneira às podridões causadas por *Macrophomina phaseolina* e *Botryodiplodia theobromae***. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1997. 4p. (EMBRAPA, CNPA. Comunicado Técnico, 57).

BECERRA-LOPEZ LAVALLE L. A.; POTTER, N.; BRUBAKER, C. L. Development of a rapid, accurate glasshouse bioassay for assessing fusarium wilt disease responses in cultivated *Gossypium* species. **Plant Pathology**, v.61, p.1112-1120, 2012.

CONAB. **Indicadores da Agropecuária**. Junho 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/IA-jun10.pdf>. Acessado em: 10 de junho de 2012.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira - Grãos**. Nono Levantamento, Junho 2012, Ano XIX, Nº 06. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_06_12_16_15_32_boletim_portugues_junho_2012.pdf. Acessado em: 26 de junho de 2012.

COUTINHO, W. M.; ALMEIDA, R. P.; DANTAS, F. V.; SOARES, D. J.; ARAÚJO, A. E. de.; MILANI, M. **Eficácia de misturas de fungicidas químicos na microbiota e na qualidade fisiológica de sementes de mamoneira**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2012. 22p. (EMBRAPA, CNPA. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 91).

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 166p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FREITAS, J. B. de; SILVA, A. B. da; PEREIRA, A. W. R.; REGO, S. M. de O.; MENEZES, E. R. de. Cultivo da mamona para biodiesel no Nordeste do Brasil é viável ou não? **VII SEGeT – Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia – 2010**. Disponível em: <http://www.aedb.br/.../376_Seget%202010%20-...>. Acesso em: 19 de dezembro de 2011.

GREZES-BESSET, B.; LUCANTE, N.; KELECHIAN, V.; DARGENT, R.; MULLER, H. Evaluation of castor bean resistance to sclerotial wilt disease caused by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v.80, p.842-846, 1996.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v.160, p.167-180, 2012.

IQBAL, U.; MUKHTAR, T.; MUHAMMAD, S.; UI-HAQUE, I.; MALIK, S. R. Host plant resistance in blackgram against charcoal rot (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v.22, p.126-129, 2010.

ISLAM, S.; HAQUE, S.; ISLAM M. M.; EMDAD, E. M.; HALIM, A.; HOSSEN, Q. M.; HOSSAIN, Z.; AHMED, B.; RAHIM, S.; RAHMAN, S.; ALAM, M.; HOU, S.; WAN, X.; SAITO, J. A.; ALAM, M.; Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, v.13, p.493-509, 2012

KAUR, S.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VALLAD, G. E.; CHAND, R.; CHAUHAN, V. B.; Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Mycobiology**, v.38, p.136-151, 2012.

KHAN, S. N. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. **Mycopathologia**, v.5, p.111-118, 2007.

MAYER-PÉREZ, N.; LOPEZ-CASTANEDA, C.; GONZALEZ-CHAVIRA, M.; GARCÍA-ESPINOSA, R.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; LA VEGA, O. M. de.; SIMPSON, J.; Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, p.257-264, 2001.

MAYÉK-PÉREZ, N.; GARCÍA-ESPINOSA, R.; LOPEZ-CASTANEDA, C.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; SIMPSON, J. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.60, p.185-195, 2002.

MATOS, E. H. da S. F.; Dossiê Técnico - Cultivo da Mamona e Extração do Óleo. **SBRT**, Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB, 29 p, jul. 2007. Disponível em: <[http:// www.sbirt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MjE3](http://www.sbirt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MjE3)>. Acesso em: 22 de dezembro de 2011.

MIHAIL, J. D. *Macrophomina phaseolina*: spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. **Phytopathology**, v.79, p.848-855, 1989.

MIHAIL, J. D. *Macrophomina*. In: Singleton, L. L.; Mihail, J. D.; Rush, C. M. (Ed). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992. p.134-136.

MIHAIL, J. D.; TAYLOR, S. J. Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, picnidium production and chlorate utilization. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.1596 -1603, 1995.

NDIAYE, M. **Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel**. 2007. 114f. PhD Thesis Wageningen University, the Netherlands, 2007.

PAPAVIZAS, G. C. Some factors affecting survival of sclerotia of *Macrophomina* in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.9, p.337-341, 1977.

PEARSON, C. A. S.; LESLIE, J. F.; SCHWENK, F. W. Host preference correlated with chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v.71, p.828-831, 1987.

RAYATPANAH, S.; NANAGULYAN, S. G.; ALAV, S. V.; RAZAVI, M.; GHANBARI-MALIDARREH, A. Pathogenic and genetic diversity among Iranian isolates of *Macrophomina phaseolina*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.72, p.40-44, 2012.

ROSA, J. **Seleção de genótipos de guandu para resistência a *Macrophomina phaseolina* e esporulação do fungo**. 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2006.

SANTOS, R. F. dos.; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M. Aspectos econômicos do agronegócio da mamona. In: AZEVEDO, D. M. P. de.; BELTRÃO, E. de M. (Ed). **O Agronegócio da Mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, 2 ed. rev. e ampl. 2007. p.23-41.

SEVERINO, L. S.; AULD, D. L.; BALDANZI, M. et al. A review on the challenges for increased production of castor. **Agronomy Journal** v.104, p.853-880, 2012.

SILVA, T. H. C. A. da; MICHEREFF, S. J. Prospecção de solos do nordeste brasileiro com atividade supressiva a patógenos radiculares da mamoneira. **Eventos UFRPE**, Areia/PB, 2009. Disponível em: <[http:// www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0816-1.pdf](http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0816-1.pdf)> Acesso em: 25 de dezembro de 2011.

SU, G.; SUH, S. -O.; SCHNEIDER, R. W.; RUSSIN, J. S. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**. v.91, p.120-126, 2001.

TESSO, T.; EJETA, G. Stalk strength and reaction to infection by *Macrophomina phaseolina* of brown midrib maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). **Field Crops Research**. Estados Unidos, v.120, p.271-275, 2011.