



## AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO À MANCHA DE RAMULARIA

Juliano Cesar da Silva<sup>1</sup>; Wagner Bettiol<sup>2</sup>; Zayame Vegette Pinto<sup>2</sup>; Edvaldo Cia<sup>3</sup>;  
Ricardo Harakava<sup>4</sup>; Rafael Galbieri<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> UNESP - Botucatu; <sup>2</sup> Embrapa Meio Ambiente; <sup>3</sup> Instituto Agronômico de Campinas; <sup>4</sup> Instituto Biológico; <sup>5</sup> Instituto Mato-grossense do Algodão.

**Resumo** - Na cultura do algodoeiro ocorrem diversas doenças, destacando-se a mancha de ramularia, causada pelo fungo *Ramularia areola*. No Brasil, a mancha de ramularia sempre foi considerada uma doença secundária, que ocorria no final do ciclo e auxiliava na desfolha da planta. Entretanto, a partir do ano de 1998, com o incremento da área cultivada, do monocultivo e da utilização de cultivares susceptíveis à doença, a mancha de ramularia passou a ocorrer mais cedo e a causar desfolha prematura, implicando na necessidade de aplicações de fungicidas. Porém, o controle da doença pelo uso de cultivares resistentes é preconizado como a maneira mais eficaz e econômica de controlar o patógeno em relação ao químico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento de cultivares de algodoeiro (ensaio VND – safra 2010/2011) à mancha de ramularia, bem como identificar molecularmente o isolado patogênico utilizado no presente estudo. Sementes de algodoeiro foram semeadas em solo contido em vasos plásticos. O isolado IMA 244 de *Ramularia areola* foi cultivado em meio de cultura extrato de Malte (2%). Após sete dias de cultivo foi obtida uma suspensão de conídios ( $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) do patógeno para aplicação em plantas de algodoeiro com 30 dias após a semeadura. As avaliações da severidade da doença foram realizadas aos 15, 20, 30 e 40 dias após a inoculação. Também, foi realizada a extração e sequenciamento do DNA do isolado IMA 244, o resultado foi comparado com as sequências depositadas no NCBI. As cultivares e linhagens LD CV 03, CNPA BA 2005-3300, IAC 08-2031 e IMS CD 03-1661 apresentaram os maiores índices da área abaixo da curva do progresso da severidade da doença. Por outro lado, as cultivares e linhagens FMT 709, IMA CD 05-8276, FMT 705, CNPA GO 2006-174, CNPA 2007-419 apresentaram os menores índices da área abaixo da curva do progresso da severidade da doença. O isolado IMA 244 de *Ramularia areola* apresentou 99% de similaridade quando comparado com as sequências da região ITS 1 de *Mycosphaerella areola* existentes no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Palavras-chave:** Cultivares de algodoeiro; *Gossypium hirsutum*; *Ramularia areola*; mancha de ramularia;

### INTRODUÇÃO

Na cultura do algodoeiro ocorrem diversas doenças, destacando-se a mancha de ramularia, causada pelo fungo *Ramularia areola* G. F. Atk., forma teleomórfica, *Mycosphaerella areola* Ehrlich & F.A. Wolf (SUASSUNA; COUTINHO, 2007). A doença inicia, geralmente, em lavouras bem desenvolvidas, em locais mais sombreados e úmidos. Os sintomas são verificados primeiramente nas folhas do baixeiro, sendo caracterizados por lesões branco-azuladas na superfície inferior da folha,

logo após é verificada a esporulação do fungo de coloração branca ou amarelada e de aspecto pulverulento. O ataque do fungo é mais intenso quando existe alta densidade de plantas e alta umidade (CIA; SALGADO, 1997). Historicamente, no Brasil, a mancha de ramularia sempre foi considerada uma doença secundária, que ocorria no final do ciclo e auxiliava na desfolha da planta (CIA; SALGADO, 1997). Entretanto, a partir do ano de 1998, com o incremento da área cultivada, monocultivo e a utilização de cultivares susceptíveis à doença, a mancha de ramularia passou a ocorrer mais cedo e a causar desfolha prematura (SUASSUNA et al., 2006; CHITARRA, 2008). Neste contexto, Aquino et al. (2008a) observaram que a doença reduziu 49% do potencial produtivo do algodão, implicando na necessidade de aplicações de fungicidas. Com relação ao controle da doença, a resistência genética de cultivares é preconizada como a maneira mais eficaz e econômica de controle da mancha de ramularia (RATHAIAH, 1975). Além disso, a rotação de cultura associado a um eficiente controle de soqueiras e tigueras propicia a redução do inóculo inicial. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento de genótipos de algodoeiro (ensaio VND – safra 2010/2011) à mancha de ramularia, bem como identificar molecularmente o isolado IMA 244 de *Ramularia areola* patogênico utilizado no presente estudo.

## METODOLOGIA

### Plantio e condução das plantas de algodoeiro

Sementes de algodoeiro (Tabela 1) foram semeadas em solo contido em vasos plásticos. Após a emergência, as plantas foram mantidas em telado com redução de 25% da luminosidade. A irrigação, por meio de micro-aspersores, foi realizada duas vezes ao dia.

### Produção de inóculo de *Ramularia areola* e inoculação das plantas de algodoeiro

O isolado IMA 244 foi obtido de plantas de algodoeiro com sintomas da mancha de *Ramularia areola*, localizadas no Município de Montividiú, GO. Para multiplicação, 100 µL de uma suspensão de conídios ( $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) do fungo foi transferida para o meio de cultura extrato de Malte (2%). O patógeno foi incubado durante sete dias, sob luz contínua e temperatura de 25 °C. Depois deste período, foi obtida uma suspensão de conídios, a qual foi ajustada para  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> para inoculação das plantas de algodoeiro com 30 dias após a semeadura.

As plantas de algodoeiro foram inoculadas com a suspensão de inóculo do isolado IMA 244 através de pulverização da superfície das folhas até o ponto de escorrimento.

As avaliações da severidade da doença foram realizadas aos 15, 20, 30 e 40 dias após a inoculação, utilizando a escala de notas proposta por Aquino et al., (2008b). Os resultados de severidade foram transformados em área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) pelo programa Sigma Plot 10.0. O delineamento foi inteiramente ao acaso, composto de 18 tratamentos e 3 repetições.

### **Extração de DNA de *Ramularia areola***

Para a extração do DNA do isolado IMA 244 foi utilizado o protocolo CTAB (DELLAPORTA et al., 1983). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando os pares de primers ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Para a PCR, foram utilizados 1 µL de DNA total extraído, 10 µL de tampão da enzima *GoTaq* DNA polimerase (Promega®), 5 µL MgCl<sub>2</sub>, 1 µL dNTP, 1 µL de cada primer e 0,2 µL de *GoTaq* DNA polimerase (Promega®), ajustando-se o volume da reação para 50 µL com água ultra pura. O regime utilizado no termociclador foi de: 94° C por 2 min., 40 ciclos de 94° C por 15 segundos, 54° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos, finalizando-se o processo com 72° C por 4 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio e observado sob luz UV. O produto amplificado foi submetido a reação de sequenciamento com nucleotídeos marcados, utilizando o seqüenciador automático ABI377 (Applied Biosystems). Após a reação de sequenciamento, os produtos foram analisados em sequenciador, através de eletroforese em gel de poliacrilamida de alta resolução e detecção da fluorescência com sensor a laser. As sequências de nucleotídeos do isolado IMA 224 foi comparada com as seqüências depositadas no site do National Center for Biotechnology Information - NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Pelos dados obtidos, observou-se que todos os genótipos diferiram significativamente entre si, quando inoculados com o isolado IMA 244 de *Ramularia areola* (Figura 1). Os genótipos de algodoeiro LD CV 03, CNPA BA 2005-3300, IAC 08-2031 e IMS CD 03-1661 apresentaram os maiores índices de área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da mancha de ramularia (45,03 a 36,58), quando comparados com os demais tratamentos, demonstrando alta suscetibilidade à doença. Lima et al. (2010), estudando o comportamento de genótipos a mancha de ramularia verificaram que as materiais Delta Opal, Makina e Sure Grow 821 foram suscetíveis a *R. areola*, sendo que os materiais Delta Penta e Deltapine Acala 90 foram mais resistentes. Galbiere (2007), testando vários genótipos em diferentes regiões no Brasil nos anos agrícolas de 2004/2005 e 2005/2006 também observou que as cultivares Delta Opal e Makina foram suscetíveis à mancha de ramularia, com destaque para a

cultivar Makina que apresentou altos índices da doença em locais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno.

Os genótipos FMT 709, IMA CD 05-8276, FMT 705, CNPA GO 2006-174, CNPA 2007-419 apresentaram os menores índices de AACPS da mancha de ramularia (12,71 a 7,03), demonstrando uma maior resistência ao patógeno quando comparados aos demais tratamentos, destacando-se o genótipo CNPA 2007-419 (7,03). Maranha et al. (2002) verificaram que dentre as 16 cultivares avaliadas a BRS Facual apresentou a maior resistência a mancha de ramularia. Estudos realizados por Novaes et al. (2010) verificaram que a herança de resistência à mancha de ramularia é monogênica.

Com relação à identificação molecular do patógeno, foi verificado que o isolado IMA 244 de *Ramularia areola* apresentou 99% de similaridade quando comparado com as sequências da região ITS 1 de *Mycosphaerella areola* existentes no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### CONCLUSÃO

- As cultivares e linhagens LD CV 03, CNPA BA 2005-3300, IAC 08-2031 e IMS CD 03-1661 apresentaram os maiores índices de área abaixo da curva do progresso da severidade mancha de ramularia.

- As cultivares e linhagens FMT 709, IMA CD 05-8276, FMT 705, CNPA GO 2006-174, CNPA 2007-419 apresentaram os menores índices da área abaixo da curva do progresso da severidade mancha de ramularia.

- A linhagem CNPA 2007-419 apresentou o menor índice da área abaixo da curva do progresso da severidade da mancha de ramularia.

- O isolado IMA 244 de *Ramularia areola* apresentou 99% de similaridade quando comparado com as sequências da região ITS 1 de *Mycosphaerella areola* (NCBI).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, L. A.; BERGER, P. G.; RODRIGUES, F. A.; ZAMBOLIM, L.; OGOSHI, F.; MIRANDA, L. M.; LÉLIS, M. Controle alternativo da mancha de ramularia do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 131-136, 2008a.

AQUINO, L. A.; BERGER, P. G.; RODRIGUES, F. A.; ZAMBOLIM, L.; HERNANDEZ, J. F. R.; MIRANDA, L. M. Elaboração e valiação da escala diagramática para a quantificação da mancha de ramularia do algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34, p. 361-363, 2008b.

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

CHITARRA, L. G. **Identificação e controle das principais doenças do algodoeiro**. 2. ed. Embrapa Algodão: Campina Grande, 2008. 84 p.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

GALBIERI, R. **Comportamento de genótipos de algodoeiro na presença de patógenos e nematóides**. 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

LIMA, L. L.; BARRETO, M.; GIACHETO SCALOPPI, E. A. G. Reação de cultivares de algodoeiro a *Ramularia areola*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n.1, p. 57-60, 2010.

NOVAES, T. G.; ZANDONÁ, C. C.; BARBOSA, J.; SÉLERI, A.; ALMEIDA, W. P.; MEHTA, Y. R. Resposta diferencial e herança de resistência a *Ramularia areola* de cultivares do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 56., 2010, Guarujá. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2010. p. 213.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M.; FERREIRA, A. C. de B. **Manejo da mancha de ramulária em algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 4 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 272)

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília, D.F.: Gráfica Talento, 2007, p. 479-521.

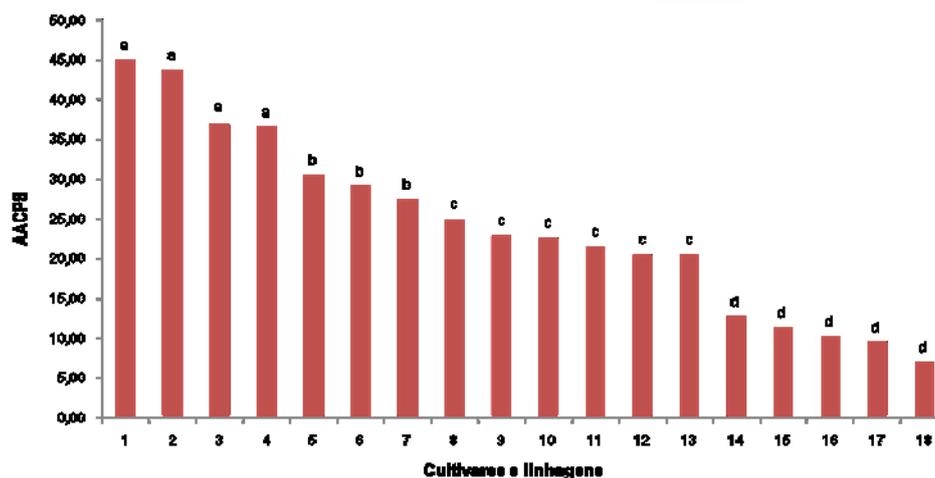


Figura 1. Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) da mancha de ramularia em genótipos de algodoeiro (Ensaio VND safra 2010-2011).

Tabela 1. Relação de genótipos de algodoeiro (Ensaio VND safra 2010-2011).

Tratamento	Cultivar/linhagem
1	LD CV 03
2	CNPA BA 2005-3300
3	IAC 08-2031
4	IMA CD 03-1661
5	IPR Jataí
6	DP 604 BG
7	NUOPAL
8	FM 910
9	PRGOA 03-231-04
10	BRS 2080
11	IAC 08/90
12	LD CV 12
13	FM 993
14	FMT 709
15	IMA CD 05-8276
16	FMT 705
17	CNPA GO 2006-174
18	CNPA 2007-419