

UTILIZAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CULTIVARES E LINHAGENS DE FEIJOEIRO A *Fusarium oxysporum* F. SP. *phaseoli*

USE OF TWO INOCULATION METHODS TO EVALUATE THE RESISTANCE OF COMMON BEAN CULTIVARS AND LINES TO *Fusarium oxysporum* F. SP. *phaseoli*

Leonardo Sousa Cavalcanti¹ Rildo Sartori Barbosa Coêlho² Jane Oliveira Perez³

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de comparar a eficiência de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de plantas de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Avaliou-se a reação de 16 cultivares e linhagens, incluindo padrões de resistência e suscetibilidade à doença. Num dos métodos, o plantio foi realizado em solo tratado com brometo de metila (CH₃Br). As plantas foram inoculadas através do método de perfuração do solo, que consistiu na aplicação de 10mℓ de suspensão de conídios ao redor das plantas, previamente feridas. No outro método utilizado, denominado método de imersão de raízes, as plantas obtidas em areia lavada e aquecida (60°C - 30min) foram retiradas e lavadas em água corrente e cortadas em cerca de 01cm do sistema radicular, o qual foi imerso em suspensão de conídios por 05 minutos. As plantas foram então replantadas em vasos contendo solo tratado com brometo de metila. Em ambos os métodos de inoculação, as plantas estavam com 07 dias de germinação, sendo inoculadas com a suspensão de inóculo a uma concentração de 1 x 10⁶ conídios/mℓ. As plantas controle sofreram o mesmo tratamento, referente ao método de inoculação correspondente. O experimento foi delineado inteiramente ao acaso, em parcelas subdivididas, com 04 repetições por tratamento, sendo o método de inoculação locado na parcela principal e as cultivares e linhagens nas subparcelas. Cada repetição foi constituída por 01 vaso com 04 plantas. As avaliações foram realizadas aos 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação, baseadas em escala de notas, com 9 graus de infecção, proposta pelo CIAT. Os dados obtidos foram transformados para índice de doença de Mackinney. Observou-se uma maior eficiência do método de imersão das raízes, na avaliação da resistência do feijoeiro a murcha de *Fusarium*, evidenciando os genótipos Goiano precoce, RH 3104 e IPA-9 como resistentes, e LM 93204247, LM 93204296 e IPA-1 como suscetíveis.

Palavras-chave: resistência de cultivares, murcha de *Fusarium*.

SUMMARY

This experiment was conducted aiming to study the efficiency of two inoculation methods to evaluate the resistance of common bean to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. The reaction of 16 cultivars and lines tested, including resistant and susceptible patterns to the disease. In one of the methods, plants were inoculated by the soil perforation method, which consists on the application of 10mℓ of conidia suspension around, previously wounded plants. For the other method, named root immersion, the plants obtained in washed and warmed up sand (60°C - 30min) were extracted, washed with running water, and tipped about one centimeter from their roots, which were submersed into conidia suspension for 05 minutes. Then, plants were replanted in plastic pots with treated soil. Two inoculation procedures were performed after seven days from plant emergence. A suspension containing 1 x 10⁶ conidia/mℓ was used in both inoculation methods. The experiment was performed in completely randomized split-plot design, with 04 replicates per treatment. Each replicate consisted of one plastic pot containing four plants. The evaluations were carried out 15, 20, 25 and 30 days after each inoculation procedure. A grading scale, proposed by CIAT, considering levels of infection ranging from 1 (highly resistant) to 9 (highly susceptible) was used. The data were converted to Mackinney disease index. The root immersion method presented better efficacy than soil perforation method to assess common bean resistance to *Fusarium* wilt, evidencing Goiano precoce, RH 3104 and IPA-9 cultivars as the most resistant genotypes, and LM 93204247, LM 93204296 and IPA-1 as the most susceptible ones.

Key words: cultivar resistance, *Fusarium* wilt.

¹Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitopatologia, Estudante de Doutorado, Setor Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, CP 9, 13418-900, Piracicaba, SP. E-mail: lescaval@esalq.usp.br. Autor para correspondência.

²Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Pesquisador, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, IPA, Recife-PE.

³Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitopatologia, Estudante de Doutorado, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro comum representa uma das principais fontes de nutrientes e sais minerais da dieta alimentar da população brasileira. A sua produtividade vem apresentando elevada taxa de crescimento, tendo aumentado de 638kg/ha para 1879kg/ha, em um período de apenas cinco anos (IBGE, 1993 / 1998). Isto se deve principalmente à utilização de tecnologias de produção diferenciadas, tais como o cultivo sob pivô central, que tem proporcionado a possibilidade de plantios sucessivos, com conseqüente aumento da rentabilidade da cultura. Apesar de possibilitarem o aumento da produtividade e do número de safras durante o ano, tais tecnologias criam condições de umidade e temperatura ideais ao desenvolvimento de patógenos, favorecendo a ocorrência de algumas doenças que apresentam alto risco à produção.

Dentre estas doenças, destaca-se a murcha de Fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder. Essa enfermidade tem causado grandes perdas nas lavouras de feijão devido, principalmente, aos cultivos sucessivos, possibilitados pela prática da irrigação (RAVA *et al.*, 1996) e a uma maior disseminação do patógeno por meio de implementos agrícolas em cultivos mecanizados (ROCHA JÚNIOR *et al.*, 1998). A doença caracteriza-se por clorose e lesões necróticas a partir das folhas mais velhas, com posterior murcha, desfolhamento prematuro e nanismo. Seu sintoma característico é observado mediante cortes transversal e longitudinal, representado pelo escurecimento dos vasos do xilema.

O fungo sobrevive em restos de cultura e no solo, através de estruturas de resistência, o que dificulta o controle cultural e químico, em áreas de constante exploração desta cultura.

A utilização de cultivares resistentes representa a medida mais eficiente e econômica para o controle dessa doença (SARTORATO E RAVA, 1994). Diversas pesquisas buscam a obtenção de fontes de resistência a murcha de Fusarium, em cultivares e linhagens de alto potencial agrícola (CRUZ *et al.*, 1974; RIBEIRO E FERRAZ, 1984; PASTOR-CORRALES E ABAWI, 1987; ZAMBOLIM *et al.*, 1987; PIZA, 1993; NASCIMENTO *et al.*, 1995; ROCHA JÚNIOR *et al.*, 1998). Nesses estudos, é necessária a utilização de uma metodologia de inoculação eficiente e confiável, que possibilite o estabelecimento e desenvolvimento do patógeno. Diferentes metodologias de inoculação, tipos e concentrações de inóculo vêm sendo utilizadas para avaliar a

severidade desta doença, como nos trabalhos de PASTOR-CORRALES E ABAWI, (1987); FERREIRA (1983) e NASCIMENTO *et al.* (1995; 1998), sem que haja uma padronização da metodologia de inoculação, o que pode incorrer em erros quanto ao comportamento de cultivares e linhagens de feijoeiro frente a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

O objetivo do presente trabalho foi comparar métodos de inoculação utilizados na avaliação da severidade da murcha de Fusarium, através da reação de cultivares e linhagens de feijoeiro ao patógeno, com o intuito de incentivar a padronização de uma metodologia de inoculação, que possibilite a identificação de fontes promissoras para o melhoramento genético visando resistência a esta doença que, cada vez mais, tem sua relevância econômica aumentada, principalmente em plantios sucessivos, possibilitados pelo advento da irrigação.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezesseis cultivares e linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foram avaliadas quanto à reação a um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, obtido no Município de Belém do São Francisco, Estado de Pernambuco. Dois métodos de inoculação foram avaliados. Em um dos métodos utilizados, denominado método de perfuração do solo, descrito por MENEZES (1972) e citado por FERREIRA (1983), o plantio foi realizado em vasos plásticos, de 15cm de diâmetro, contendo solo tratado com brometo de metila (CH₃Br).

Foram realizadas perfurações no solo ao redor das plantas, com auxílio de escalpelo, com posterior distribuição de 20ml de suspensão de conídios (1x 10⁶ conídios/ml). No outro método utilizado, denominado método de imersão das raízes, as plantas foram obtidas através da semeadura em bandejas plásticas, contendo areia lavada e aquecida durante 30min a 60°C. Este método baseou-se na imersão do sistema radicular, previamente cortado a cerca de 1cm da coifa, durante 05 minutos, em suspensão de conídios (1x 10⁶ conídios/ml), e posterior replantio em vasos plásticos, contendo solo tratado com brometo de metila. Em ambos os métodos, as plantas estavam com 07 dias de germinação, sendo fertilizadas quinzenalmente com 50ml de solução NPK (20-10-20) a 0,3% (m/v) (PASTOR-CORRALES E ABAWI, 1987).

O inóculo foi obtido através da adição de 10ml de água destilada às placas de Petri, contendo as colônias do fungo, cultivadas em meio BDA (Batata - dextrose - agar), durante 15 dias, a uma

temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a filtração, em quatro camadas de gaze esterilizada, a suspensão foi centrifugada a 5000rpm, por 5 minutos, sendo o precipitado suspenso em água destilada, e novamente centrifugado. Em seguida, promoveu-se a ressuspensão e ajuste da concentração do inóculo, com auxílio de uma câmara de Neubauer, para 1×10^6 conídios/ml (PASTOR-CORRALES E ABAWI, 1987).

As avaliações foram realizadas aos 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação, utilizando-se escala de notas adotada pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, Cali, Colômbia, descrita por SCHOONHOVEN & PASTOR-CORRALES (1987), com notas de 1 a 9. A nota 1 corresponde a plantas sem sintomas perceptíveis; nota 3 - atribuída a plantas com algumas folhas murchas, representando não mais que 10% da folhagem, com pequenas lesões no hipocótilo; nota 5 - atribuída a plantas com aproximadamente 25% das folhas com sintomas de murcha e clorose; nota 7 - cerca de 50% das folhas exibindo sintomas de murcha, clorose e necroses limitadas; nota 9 - plantas com sintomas de necrose com desfoliação precoce, clorose e murcha em 75% das folhas ou mais, plantas severamente atrofiadas e plantas mortas. Os dados originais foram transformados em Índice de doença de Mackinney (Tabela 1), conforme BALARDIN *et al.* (1990), tendo sido considerados três tipos de reação: resistente,

intermediário e suscetível, para índices até 33,33 ; 66,66 e 100%, respectivamente. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, sendo o método de inoculação locado na parcela principal, e as cultivares e linhagens nas subparcelas. Cada subparcela foi constituída por 01 vaso com 04 plantas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1 e 2 mostram o progresso da doença, em algumas cultivares e linhagens, possibilitando a comparação dos métodos de inoculação. A cultivar IPA 1 apresentou reação de resistência, quando inoculada através do método de perfuração do solo. Entretanto, mostrou-se suscetível aos 20 dias após a inoculação, quando inoculada por meio do método de imersão das raízes. Este resultado coincide com as informações relatadas por PASTOR-CORRALES & ABAWI (1987); PIZA (1993); NASCIMENTO *et al.* (1995) e RAVA *et al.* (1996). A cultivar ESAL 647 e as linhagens AN 9022421 e LM 9324509 também não confirmaram, para o método de imersão das raízes, suas reações de resistente ou intermediária, que apresentaram quando inoculadas pelo método de perfuração do solo. Isto revela a maior eficiência do método de imersão das raízes, devido, possivelmente, a uma maior exposição da área das raízes aos conídios, aumentando a possibilidade de penetração do patógeno.

Outro aspecto a ser considerado neste estudo é a determinação da melhor época de avaliação. Diferentes períodos de avaliação foram utilizados em estudos realizados por RAVA *et al.* (1996), que avaliaram a reação de genótipos de feijoeiro aos 11 dias após a inoculação, e NASCIMENTO *et al.* (1995) que realizaram avaliações aos 25 e 30 dias após a inoculação. Esses últimos verificaram que apenas as variedades FT 120 e PI 207262 e as linhagens IAPAR LP 88-141 e IAPAR LP 88-198 não confirmaram a reação de resistência, apresentada aos 25 dias, quando avaliadas 30 dias após a inoculação. Pode-se verificar que as maiores variações no

Tabela 1 - Reação de genótipos de feijoeiro, em diferentes períodos de avaliação, a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* inoculados através do método de imersão de raízes. Recife, 1999.

Cultivar/ Linhagem	15 dias		20 dias		25 dias		30 dias	
	Índice de doença*	Reação	Índice de doença*	Reação	Índice de doença*	Reação	Índice de doença*	Reação
IPA-7	34,83	I	44,24	I	45,29	I	50,00	I
IPA-10	32,79	R	36,83	I	49,28	I	51,93	I
IPA-11	29,17	R	37,90	I	37,90	I	39,91	I
IPA-9	24,92	R	32,03	R	32,03	R	33,24	R
ESAL-647	28,67	R	34,39	I	36,11	I	60,77	S
LM 93204247	64,83	S	90,00	S	90,00	S	90,00	S
LM 9324296	30,04	R	85,13	S	86,05	S	90,00	S
AN 9022421	26,09	R	55,07	I	66,27	I	74,45	S
RH 3104	27,16	R	28,29	R	30,51	R	31,61	R
LM 9220363	28,88	R	32,07	R	32,07	R	34,16	I
RH 3045	23,13	R	34,83	I	56,67	I	59,70	I
AN 9022180	22,55	R	39,60	I	49,25	I	56,56	I
AN 90221465	21,05	R	42,51	I	56,02	I	59,85	I
LM 9324509	19,47	R	57,74	I	75,19	S	82,12	S
IPA-1	19,47	R	75,21	S	87,22	S	90,00	S
Goiano Precoce	19,47	R	22,57	R	26,66	R	28,85	R

* Índice de doença = $(\Sigma(f.v)/n.x) \times 100$; f = nº de plantas em cada categoria; v = nota; n = nº total de plantas; x = grau máximo da escala.

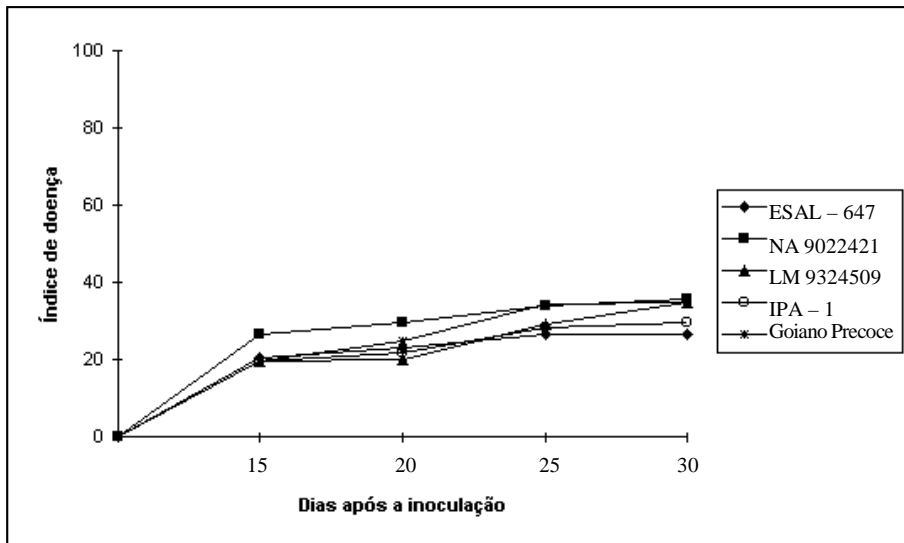


Figura 1 - Evolução da doença em algumas cultivares e linhagens de feijoeiro inoculadas através do método de perfuração do solo. Recife, 1999.

comportamento das cultivares e linhagens avaliadas (Tabela 1) ocorreram entre o 15º e 20º dia após a inoculação. Apenas as cultivares ESAL 647 e AN 9022421 e a linhagem LM 9220363 não confirmaram suas reações na transição entre o 25º e o 30º dia, tendo sido, neste estudo, este último o melhor período para avaliar a reação das cultivares e linhagens.

As reações apresentadas pelas cultivares IPA 9 (R) e IPA 7 (I) não coincidiram com aqueles obtidos por RAVA *et al.* (1996). Esta discrepância pode ser atribuída a diversos fatores como condições

de realização do experimento, condições ambientais, agressividade do isolado utilizado e forma de avaliação. O comportamento de resistência da cultivar Goiano Precoce esteve de acordo com os relatos de BALARDIN *et al.* (1990) e NASCIMENTO *et al.* (1995), devendo esta cultivar, juntamente com as cultivares RH 3104 e IPA 9, serem alvos de novos estudos visando a obtenção de cultivares e linhagens melhoradas, com alto nível de resistência à murcha de *Fusarium*.

A maior eficiência do método de imersão de raízes veio dar suporte e ratificar a sua utilização. Além disso, também possibilitou a identificação da cultivar Goiano Precoce como genótipo altamente resistente. Essa cultivar, além de representar uma promissora fonte de resistência para programas de melhoramento genético, deve ser alvo de estudos posteriores, que envolvem os mecanismos de defesa bioquímicos e/ou estruturais expressos neste patossistema, devido ao seu comportamento de resistência, mesmo através de método de inoculação altamente seletivo.

CONCLUSÕES

O método de inoculação através da imersão de raízes em suspensão de conídios apresentou-se superior ao método de fermentos no sistema radicular por meio de perfuração no solo, com posterior deposição de suspensão de conídios, na diferenciação das reações das cultivares testadas nesse estudo.

As cultivares Goiano Precoce, RH 3104 e IPA-9 apresentaram os menores índices médios de infecção, sem alteração na reação de resistência, em todas as avaliações.

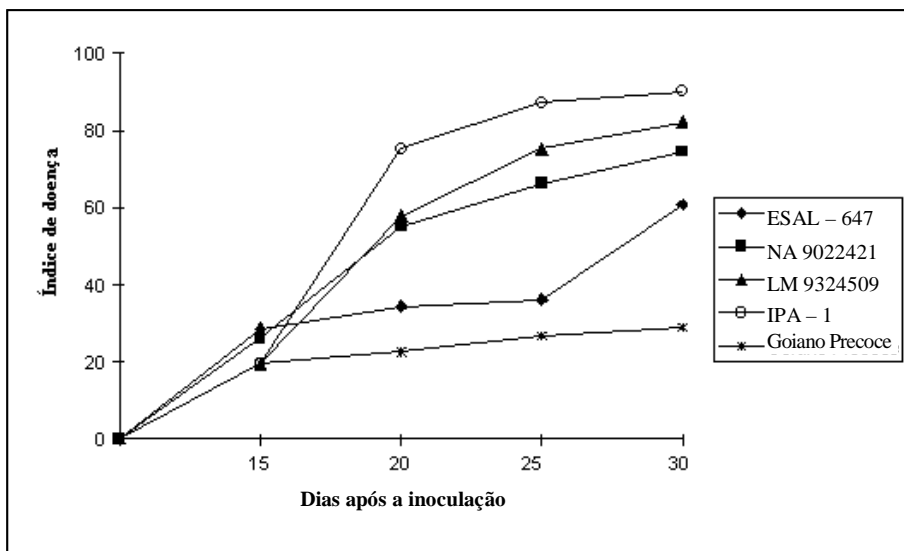


Figura 2 - Evolução da doença em algumas cultivares e linhagens de feijoeiro inoculadas através do método de imersão de raízes. Recife, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Resistência de germoplasmas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.1, p.102-103, 1990.
- CRUZ, B.P.B.; TERANISHI, J.; ISSA, E., *et al.* Resistência de cultivares de feijão-vagem à murcha de *Fusarium*. **O Biológico**, São Paulo, v.40, n.1, p.25-32, 1974
- FERREIRA, R.G. **População fúngica em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), fontes de resistência e controle químico a *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder**. Recife, 1983. 101p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Curso de Pós-graduação em Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1983.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção vegetal. **Anuário Estatístico do Brasil**, v.55, cap.3, p.20-47, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção vegetal. **Anuário Estatístico do Brasil**, v.58, cap.3, p.23-39, 1998.
- NASCIMENTO, S.R.C.; MARINGONI, A.C.; KUROSZAWA, C. Comportamento de variedades e linhagens de feijoeiro ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.3, p.458-463, 1995.
- NASCIMENTO, S.R.C.; MARINGONI, A.C.; KUROSZAWA, C. Determinação do efeito da concentração e do tipo de inóculo na severidade dos sintomas da murcha de *Fusarium* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.24, n.1, p.8-11, 1998.
- PASTOR-CORRALES, M.A.; ABAWI, G.S. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, n.11, p.990-993, 1987.
- PIZA, S.M.T. Patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e reação de germoplasma de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.19, p.165-167, 1993.
- RAVA, C.A.; SARTORATO, A., COSTA, J.G.C. Reação de genótipos de feijão comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.296-300, 1996.
- ROCHA JÚNIOR, W.; SANTOS, J.B.; MENDES-COSTA, M.C. Reação de cultivares e linhagens de feijão à *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.407-409, 1998.
- RIBEIRO, C.A.G.; FERRAZ, S. Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.1, p.37-44, 1984.
- SARTORATO, A.; RAVA, C.A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília : EMBRAPA - CNPAF, 1994. 300p.
- SCHOONHOVEN, A.A.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Cali : CIAT, 1987. 54p.
- ZAMBOLIM, L.; VIEIRA, C.; ARAÚJO, C.A.A., *et al.* Ocorrência de murcha de *Fusarium* na Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.3, p.287-288, 1987.