



Um método simples e rápido de seleção para resistência à murcha-de-fusário em genótipos de algodoeiro

Litervaldo P. Machado¹, Sami J. Michereff¹, Beatriz A.S. Falleiro², Marcelo G. Oliveira³, Wirton M. Coutinho³, Camilo L. Morello³ & Nelson D. Suassuna³

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil; ²Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Mato Grosso, 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil; ³Embrapa Algodão, 58107-720, Campina Grande, PB, Brasil

Autor para correspondência: Nelson D. Suassuna, e-mail: suassuna@cnpa.embrapa.br

RESUMO

Neste trabalho, descreve-se um método para seleção de genótipos de algodoeiro resistentes à murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Sementes de diferentes genótipos de algodoeiro foram plantadas em bandejas com células (volume de 25 mL), contendo vermiculita esterilizada. Aos 5 e 7 dias após o plantio, depositaram-se, em cada célula, 2 mL de uma suspensão de 5×10^5 esporos/mL do patógeno. Avaliou-se diariamente, por 15 dias consecutivos a partir do décimo dia após a inoculação (DAI), a severidade da doença em cada plântula. A resistência dos genótipos foi estimada por meio da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), além das variáveis calculadas aos 25 DAI: severidade da doença, porcentagem de plântulas com escurecimento do sistema vascular e porcentagem de plântulas com o patógeno interno aos vasos (re-isolamento). Considerando a AACPD, os genótipos Bayou SM-1 e Coker 312 foram mais resistentes que Deltapine 45A. Para a variável severidade aos 25 DAI, além de Bayou SM-1 e Coker 312, o genótipo Auburn 56-24 também foi mais resistente que Deltapine 45A. O genótipo Coker 312 foi mais resistente do que Acala 44 apenas para esta variável. Houve correlação significativa entre AACPD e severidade aos 25 DAI, sendo esta última mais adequada na seleção para resistência, devido à sua praticidade.

Palavras-chave: melhoramento, resistência genética, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

ABSTRACT

A simple and fast method to screen cotton genotypes for fusarium wilt resistance

This study describes a new method to screen cotton genotypes for wilt resistance caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Cotton genotypes were sown in germination trays (25 mL each cell) with sterilized vermiculite. On the fifth and the seventh days after germination, each seedling was inoculated with a suspension adjusted to 5×10^5 spores/mL. Resistance was evaluated using 1) the area under disease progress curve (AUDPC), for 15 days starting on the tenth day after the first inoculation (DAI); 2) disease severity on the 25th DAI; 3) percent of seedlings showing vascular system browning and 4) percent of seedlings with pathogen in the vascular system on the 25th DAI. No significant differences were found among genotypes Clevevilt 6, Auburn 56-24, Bayou SM-1, Coker 312, Stoneville 132, IAC RM2 and BJ 1302 for AUDPC and disease severity. When considering disease severity, genotypes Auburn 56-24, coker 312 and Bayou SM-1 were more resistant than Deltapine 45A, whereas for AUDPC only Coker 312 and Bayou SM-1 were more resistant than Deltapine 45A. Coker 312 was more resistant than Acala 44 only for disease severity. There was a significant correlation between AUDPC and disease severity, however, due to its ease, the latter index was found to be the best to screen cotton genotypes for fusarium wilt resistance.

Keywords: cotton breeding, genetic resistance, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

A murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* W.C. Snyder & H.N. Hansen, afeta o algodoeiro em qualquer estágio de desenvolvimento. Em plântulas, ocorre amarelecimento, murcha e necrose das folhas cotiledonares; em plantas adultas, ocorre amarelecimento em áreas irregulares da superfície foliar e murcha de folhas e ramos. Algumas plantas afetadas podem

sobreviver à doença, emitindo novas brotações próximas ao solo, mas, em geral, os ramos originados a partir desses novos brotos não são produtivos. Durante o processo infeccioso, as plantas perdem todas as folhas e as novas brotações caem. Internamente ao caule, ocorre escurecimento dos feixes vasculares, devido à oxidação e à polimerização de compostos fenólicos. As plantas que conseguem sobreviver sofrem severa redução de crescimento (Davis et al., 2006).

O patógeno pode sobreviver no solo na forma de estruturas de resistência (clamidósporos) por períodos superiores a 12 anos (Smith & Snyder, 1975), sendo a

Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife PE. 2008.

dispersão de propágulos a curtas distâncias favorecida pelo movimento de partículas de solo contaminado, principalmente por meio de máquinas agrícolas, do vento e da água; a longas distâncias, a dispersão ocorre principalmente por meio de sementes infectadas (Davis et al., 2006).

A murcha-de-fusário é agravada pelo ataque de nematóides dos gêneros *Meloidogyne* (Kofoid & White) Chitwood, *Rotylenchulus* (Linford & Oliveira) e *Pratylenchus* (Godfrey) Filipjev & Schurms Stekhoven, por debilitarem a planta e provocarem ferimentos nas raízes, facilitando a penetração de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* no seu sistema radicular (Colyer, 2001). Além dos nematóides, outras condições, tais como solos com alto teor de areia, baixo pH, fertilidade desequilibrada, temperaturas entre 25°C e 32°C e alta umidade, favorecem a doença.

O manejo da murcha-de-fusário é realizado principalmente por meio do princípio da exclusão, evitando-se a introdução do patógeno em áreas isentas. A utilização de sementes livres do patógeno e o tratamento de sementes com fungicidas são fundamentais. Outras táticas importantes no manejo dessa doença são a rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes (Suassuna & Coutinho, 2007).

Apesar de não terem sido identificados genótipos imunes a essa doença dentro da espécie *Gossypium hirsutum*, cultivares comerciais com níveis de resistência, de moderado a alto, têm sido desenvolvidas. Em *G. hirsutum*, as primeiras cultivares resistentes desenvolvidas eram pouco produtivas e com características de fibra inferiores às das cultivares suscetíveis. No Brasil, atualmente, as cultivares IAC 24, BRS Aroeira e BRS Sucupira têm bom desempenho produtivo, mesmo quando cultivadas em solos com alta infestação de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Suassuna & Coutinho, 2007).

Para que se possa introgridir resistência à murcha-de-fusário em cultivares-elites de algodoeiro, é imprescindível a identificação de fontes de genes de resistência, principalmente em acessos que possuam outras características agrônomicas desejáveis.

Vários métodos têm sido usados para selecionar genótipos com resistência à murcha-de-fusário. O método de “deeping”, comumente usado (Wiles, 1963; Wickens, 1964; Bugbee & Sappenfield, 1972; Miller & Cooper, 1967), apesar de confiável é muito laborioso e pode causar injúria no sistema radicular da planta.

Para que haja sucesso no processo de seleção para resistência, há necessidade de fontes de genes de resistência, previamente caracterizadas como resistentes, e de um método efetivo de inoculação e avaliação das plantas. A maneira mais simples de selecionarem-se plantas resistentes é o cultivo em solo infestado, natural ou artificialmente (Perry, 1962). Entretanto, esse método não se adequa à seleção de plantas individuais, devido ao eventual escape de inoculação.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um método fácil, rápido e acurado de seleção para quantificar a resistência de genótipos de algodoeiro à murcha-de-fusário em condições controladas. Os experimentos foram

realizados no Laboratório de Fitopatologia e na casa de vegetação da Embrapa Algodão, em Campina Grande, PB.

Todos os genótipos de algodoeiro usados neste estudo foram cultivados na Estação Experimental de Santa Helena de Goiás, GO, e auto-fecundados por, pelo menos, uma geração. Todas as plantas que geraram as sementes usadas nos ensaios não desenvolveram sintomas da doença. As sementes obtidas foram deslindadas com ácido sulfúrico e armazenadas em câmara fria (temperatura de 15°C ± 3°C e umidade abaixo de 40%) até a condução dos ensaios.

Foram utilizados quatro isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, obtidos de plantas de algodoeiro com sintomas da doença, coletadas em diferentes áreas de plantio de algodão no país (CNPA 0003, Votuporanga-SP; CNPA 0005, Campina Grande PB; CNPA 0006, Acreúna GO e CNPA 0007, São Desidério BA).

Os isolados foram cultivados em placas de Petri, contendo meio SNA - Synthetic Nutrient Agar (Nuremberg, 1981) e incubados em condições controladas (temperatura de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 12 h), durante dez dias. Na preparação do inóculo, foram adicionados 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa. Os conídios foram liberados das colônias fúngicas, com o auxílio de alça de Drigalski, e a suspensão resultante filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada. A suspensão de conídios foi ajustada para 5x10⁵ esporos por mL, utilizando-se hemacitômetro.

Previamente, testaram-se algumas modificações do método desenvolvido por Perry (1962), que é laborioso, com a utilização de quatro cultivares de diferentes níveis de resistência; como em todos os testes houve remoção de plântulas antes da inoculação, o que provocou injúrias, decidiu-se, então, por inocular as plântulas sem transplante. Dessa forma, o método adotado consistiu no plantio de sementes de algodoeiro, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio na concentração de 1%, por 2 minutos, em bandejas de plástico para germinação, contendo 162 células (18x9), sendo 25 mL o volume de cada célula. As bandejas foram dispostas em casa-de-vegetação climatizada sobre bancadas recobertas com lona de polietileno, contendo uma camada de areia lavada esterilizada utilizada como suporte. Adicionou-se vermiculita esterilizada a cada célula das bandejas, plantando-se uma semente por célula. Aos 5 e 7 dias após o plantio, depositaram-se, em cada célula, 2 mL de uma suspensão de esporos ajustada para 5 x 10⁵ esporos/mL, contendo proporções iguais de esporos dos quatro isolados supracitados. Durante a execução do ensaio, a temperatura média externa variou entre 22,8 e 25 °C e a umidade relativa do ar manteve-se acima de 60 %.

Para validação do método, testaram-se nove genótipos de algodoeiro com níveis diferentes de resistência à doença: Resistentes: Cleverwilt 6, Bayou SM-1 (Hillocks, 1992) e Auburn 56-24 (Gridi-Papp et al., 1984); Moderadamente resistente: IAC RM2 (Gridi-Papp et al., 1984); Suscetível: Acala 44 (Davis et al., 1996) e Resistência desconhecida: Coker 312, Stoneville 132, Deltapine 45A e BJ 1302.

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com seis repetições, sendo a parcela constituída por 18 plântulas.

As avaliações foram realizadas diariamente durante 15 dias consecutivos, a partir do décimo dia após a primeira inoculação (DAI), atribuindo-se notas, conforme escala proposta por Wickens (1964), com modificações: 0: sem sintomas; 1: amarelecimento nos cotilédones; 2: amarelecimento nos cotilédones, início de murcha e escurecimento das nervuras; 3: murcha total dos cotilédones, porém com o caule verde; 4: morte da plântula (tombamento).

As notas de severidade da doença em cada plântula na parcela foram utilizadas para calcular um índice de intensidade de infecção (I), expresso como $I = \text{sen}^2 \omega$, para cada distribuição de frequência obtida na parcela (Amaral, 1969), com as modificações propostas por Czermainski (1999). Os dados diários da variável ω , calculada a partir da transformação angular $\omega = \arcsen \sqrt{I}$, foram usados para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença - AACPD (Campbell & Madden, 1990).

Após a última avaliação da severidade da doença aos 25 DAI, as plântulas foram retiradas do substrato, seccionadas na região do colo e, por meio de inspeção visual, foi quantificada a porcentagem de plântulas com escurecimento do sistema vascular. Em seguida, procedeu-se ao isolamento indireto de todos os fragmentos de caule de todas as plântulas em meio BDA (Batata – Dextrose – Agar), para quantificação do número de plântulas com o patógeno interno ao sistema vascular.

As variáveis AACPD, severidade da doença aos 25 DAI, porcentagem de plântulas com escurecimento do sistema vascular e porcentagem de plântulas contendo o

patógeno no sistema vascular foram submetidas à análise de variância, com delineamento de blocos ao acaso, e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, utilizando-se o software SAS System® versão 9.1 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Também foram realizados testes de correlação entre as variáveis mensuradas.

Os primeiros sintomas nos cotilédones foram observados entre 10 e 19 dias após a inoculação, sendo observada flacidez das bordas de um ou de ambos os cotilédones, com a mudança gradativa de tonalidade do verde claro para o amarelo, dependendo do nível de resistência do genótipo. Os sintomas rapidamente progrediram da borda para todo o limbo do cotilédone e, após perderem totalmente a coloração verde natural, as nervuras primárias tornavam-se escurecidas; eventualmente, as folhas cotiledonares e o primeiro par de folhas verdadeiras caíam da plântula naturalmente. Quando todas as folhas estavam mortas, o caule tornava-se escuro, sendo possível observar esporulação abundante na sua base, constatando-se apenas macroconídios.

Houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis AACPD ($P=0,0114$) e severidade da doença aos 25 DAI ($P=0,0013$). Considerando-se a variável AACPD, os genótipos Bayou SM-1 e Coker 312 foram mais resistentes que o genótipo Deltapine 45A (Tabela 1). Para a variável severidade da doença aos 25 DAI, os genótipos Bayou SM-1, Auburn 56-24 e Coker 312 foram mais resistentes que Deltapine 45A. Verificou-se também que o genótipo Coker 312 foi mais resistente que a Acala 44 para esta variável.

Houve correlação positiva entre as variáveis AACPD e severidade da doença aos 25 DAI ($r=0,89024$, $P<0,0001$) e entre AACPD e porcentagem de escurecimento

TABELA 1 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), severidade aos 25 dias após a inoculação, porcentagem de plântulas com escurecimento do sistema vascular e porcentagem de re-isolamento de plântulas de nove genótipos de algodoeiro inoculados artificialmente com *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*

Genótipo	AACPD	Severidade da doença (25 DAI)	Escurecimento (%)	Re-isolamento (%)
Stoneville 132	193,23 ab	22,393 abc	24,784	52,749
Cleevewilt 6	192,58 ab	22,225 abc	19,156	56,551
Deltapine 45A	306,15 a	34,387 a	32,737	59,861
Acala 44	242,74 ab	32,237 ab	33,181	56,997
Auburn 56 24	175,99 ab	18,803 bc	26,468	56,902
Bayou SM-1	160,02 b	18,973 bc	18,945	75,750
BJ 1302 (S 1062)	207,73 ab	22,407 abc	17,734	57,970
Coker 312	153,04 b	18,262 c	20,714	58,088
IAC RM 2	260,46 ab	27,923 abc	29,762	52,656
Média	210,22	24,18	24,83	58,61
P	0,0114	0,0013	0,6101	0,3232
CV	34,35	29,96	66,99	26,13

do sistema vascular ($r=0,48425$, $P=0,0002$), entretanto, não houve correlação entre AACPD e re-isolamento do patógeno de plântulas. Constatou-se também que houve correlação entre as variáveis severidade da doença aos 25 DAI e porcentagem de escurecimento do sistema vascular ($r=0,54031$, $P<0,0001$), entretanto, não houve correlação entre a porcentagem de escurecimento e frequência de re-isolamento do patógeno de plântulas.

Com base na correlação significativa entre AACPD e severidade da doença aos 25 DAI, a última variável é mais adequada para ser usada na seleção de um número elevado de genótipos, devido à sua praticidade. A variável AACPD, apesar de integrar toda a curva de progresso da doença, levando-se em consideração o início da epidemia e a magnitude do incremento da severidade da doença ao longo do tempo, tem seu emprego dificultado em estudos com muitos genótipos, em virtude de serem necessárias muitas avaliações, devendo ser limitada a testes de avaliação de poucos genótipos ou ensaios em campo.

A correlação entre as variáveis AACPD, severidade da doença aos 25 DAI e escurecimento do sistema vascular, embora significativa, foi relativamente baixa. Portanto, deve-se ter cautela no uso da variável escurecimento do sistema vascular em testes de seleção de genótipos em condições controladas.

O fato de não haver correlação entre escurecimento do sistema vascular e re-isolamento do patógeno de plântulas, deve estar relacionado a outro mecanismo de resistência, que não oclusão do sistema vascular nem formação de toxinas, que esteja contribuindo para a resistência das plantas. Bugbee (1970) estudou este fenômeno em genótipos com a mesma taxa de oclusão do sistema vascular e diferentes níveis de resistência à murcha, concluindo que a resistência era devida, principalmente, à rápida capacidade de regeneração dos vasos condutores.

A simples inspeção visual do escurecimento do sistema vascular pode não ser suficiente para constatar o início da resposta de resistência com base na oclusão do xilema; no entanto, esse procedimento associado ao isolamento indireto do patógeno, a partir da base do caule, pode ser empregado para a confirmação da presença do agente causal da murcha no sistema vascular das plantas afetadas, conforme as médias gerais verificadas para essas variáveis, ou seja, 24,83%, para inspeção visual, e 54,81%, para isolamento indireto.

Todos os tratamentos (genótipos) tiveram frequência de infecção (com base no re-isolamento do patógeno) acima de 50%, o que caracteriza a eficiência do método no favorecimento da infecção pelo patógeno, devido ao espaço reduzido para o desenvolvimento das raízes. Apesar de todo o controle local, ainda houve escape (plantas assintomáticas e sem o patógeno interno nos vasos), embora não tanto quanto o verificado em outros métodos de inoculação, como aqueles descritos por Wiles (1963), Wickens (1964), Miller & Cooper (1967) e Bugbee & Sappenfield (1972). Uma possível explicação para a ocorrência do escape é o

potencial de inóculo, uma vez que a suspensão de esporos foi preparada em água destilada esterilizada. Wang et al. (1999) verificaram que o inóculo preparado em meio de cultura líquido causou maior severidade da doença em plantas de algodoeiro que o inóculo preparado com água destilada. Possivelmente, alguns metabólitos secundários produzidos no meio de cultura líquido têm alguma função no processo de infecção.

Neste estudo, a concentração da suspensão de esporos usada para a inoculação, ou seja 5×10^5 esporos por mL, foi suficiente para a diferenciação entre genótipos resistentes e suscetíveis, contrastando com os resultados obtidos por Gridi-Papp et al. (1979), cujo método de inoculação empregado só permitiu tal diferenciação com uma suspensão de esporos 10 vezes mais concentrada.

Apesar desse método ser eficiente na seleção de genótipos resistentes à murcha-de-fusário em condições controladas, é fundamental que os genótipos também sejam avaliados em campo, sob condição de infecção natural simultânea de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e dos nematóides patogênicos ao algodoeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de estudos, respectivamente, aos autores Litervaldo Pereira Machado e Beatriz Alemonge de Souza Falleiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral E (1969) Novo índice de intensidade de infecção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 4:1-2.
- Bugbee WM (1970) Vascular response of cotton to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. *Phytopathology* 60:121-123.
- Bugbee WM, Sappenfield WP (1972) Greenhouse evaluation of verticillium, fusarium and root knot nematode on cotton. *Crop Science* 12:112-114.
- Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. New York NY. John Wiley & Sons.
- Colyer PD (2001) Fusarium wilt. In: Kirkpatrick TL, Rothrock CS (Eds.) Compendium of cotton diseases. Saint Paul MN. APS Press. pp. 27-28.
- Czermainski ABC (1999) Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de doenças em plantas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:1545-1555.
- Davis RD, Moore NY, Kochman JK (1996) Characterization of a population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causing wilt of cotton in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 47:1143-1156.

- Davis RM, Colyer PD, Rothrock CS, Kochman JK (2006) Fusarium wilt of cotton: diversity and implications for management. *Plant Disease* 90:629-703.
- Gridi-Papp IL, Cia E, Soave J (1979) Transferência da resistência a *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* baseada em inoculações durante a germinação de sementes de algodoeiro e em testes sob condições naturais. *Bragantia* 38:115-121.
- Gridi-Papp IL, Fuzatto MG, Cavaleri PA, Cia E, Silva NM, Ferraz CAM, Schmidt W, Neves OS, Rodrigues Filho FSO, Chiavegato EJ, Sabino NP, Martinelli ES, Lazzarini JF, Corrêa FA, Grossi JMM (1984) Melhoramento do algodoeiro no Estado de São Paulo: obtenção das variedades IAC RM3, IAC RM4, IAC 16 e IAC 17. *Bragantia* 43:405-423.
- Hillocks RJ (1992) Fusarium wilt. In: Hillocks RJ (Ed.). Cotton diseases. Wallington. CAB International. pp. 127-160.
- Miller DA, Cooper WE (1967) Greenhouse technique for studying fusarium wilt in cotton. *Crop Science* 7:75-76.
- Perry DA (1962) Method for determining the reaction of cotton plants to *Fusarium* wilt. *Empire Cotton Growing Review* 39:22-26.
- Smith SN, Snyder WC (1975) Persistence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in fields in the absence of cotton. *Phytopathology* 65:190-196.
- Suassuna ND, Coutinho WM (2007) Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire EC (Ed.) Algodão no cerrado brasileiro. Brasília. ABRAPA. pp. 479-521.
- Wang B, Dale ML, Kochman JK (1999) Studies on a pathogenicity assay for screening cotton germplasms for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in the glasshouse. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39:967-974.
- Wickens GM (1964) Methods for detection and selection of heritable resistance to *Fusarium* wilt of cotton. *The Empire Cotton Growing Review* 41:172-193.
- Wiles AB (1963) Comparative reactions of certain cottons to fusarium and verticillium wilts. *Phytopathology* 53:586-588.

Recebido 9 Junho 2008 - Aceito 13 Março 2009 - TPP 8071
Editor Associado: Carlos R. Casela