



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**ANGÉLICA CARDOSO CARLOS**

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CHAFF-GRAIN PARA AVALIAÇÃO DA  
RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE ALGODOEIRO À *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*vasinfectum*.**

Campina Grande-PB  
2012

**ANGÉLICA CARDOSO CARLOS**

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CHAFF-GRAIN PARA AVALIAÇÃO DA  
RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE ALGODOEIRO À *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*vasinfectum*.**

***Monografia apresentada a Universidade  
Estadual da Paraíba em cumprimento às  
exigências para obtenção do título de  
Licenciado em Ciências Biológicas.***

Orientador:  
**Dr. DARTANHÃ JOSÉ SOARES**

Coorientadora:  
**Profª. ÉRICA CALDAS SILVA DE OLIVEIRA**

Campina Grande-PB  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

C284v Carlos, Angélica Cardoso.  
Validação do método de chaff-grain para avaliação da resistência de genótipos de algodoeiro à *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* [manuscrito] / Angélica Cardoso Carlos. – 2012.  
40 f. : il. color.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.  
“Orientação: Prof. Dr. Dartanhã José Soares, Departamento de Ciências Agrárias”.  
“Co-Orientação: Prof. Érica Caldas Silva de Oliveira.”

1. Cultivo de algodão. 2. Pragas de plantas. 3. Murcha-de-fusário. I. Título.

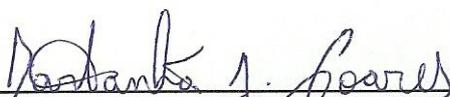
CDD 21. ed. 633.51

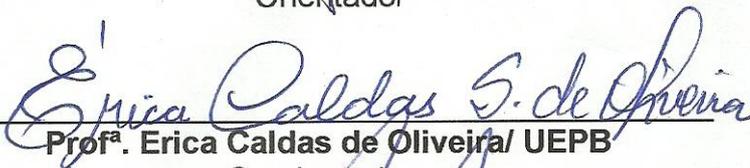
**ANGÉLICA CARDOSO CARLOS**

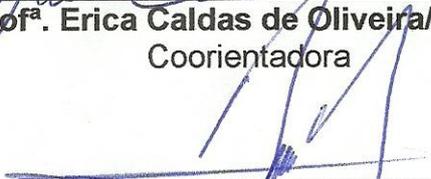
**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CHAFF-GRAIN PARA AVALIAÇÃO DA  
RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE ALGODOEIRO À *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*vasinfectum*.**

***Monografia apresentada a Universidade  
Estadual da Paraíba em cumprimento às  
exigências para obtenção do título de  
Licenciado em Ciências Biológicas.***

Aprovada em 24/07/2012.

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Dartanhã José Soares/ EMBRAPA**  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Erica Caldas de Oliveira/ UEPB**  
Coorientadora

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Alderi Emídio de Araújo/ EMBRAPA**  
Examinador

  
\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valeria Veras Ribeiro/UEPB**  
Examinadora

*A **Deus** por ter concedido sabedoria,  
saúde e principalmente, por sempre  
está presente.*

## **MINHA HOMENAGEM**

*Aos meus pais, **José Agailton Batista  
Carlos e Íria de Fátima Cardoso Carlos**,  
por terem sido compreensão, incentivo,  
força e alicerce.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

---

### **A Deus**

*por sempre me guiar em minha caminhada.*

*Para ti, todo meu amor e gratidão!*

*Aos meus Pais, **José Agailton Batista Carlos e Íria de Fátima Cardoso Carlos**, razão da minha vida, por serem o mais forte sinal de que Deus sempre está comigo. Não imagino como chegaria até aqui sem vocês.*

*Amo vocês!*

*Aos meus Irmãos,*

***Aline Cardoso Carlos** (muitas vezes meu espelho e exemplo) e **Alex Emanuel Cardoso Carlos** (meu companheiro de todas as horas), pela alegria, compreensão nos momentos mais exaustivos, carinho e incentivo. Amo vocês!*

### **A Caio Santos B. Nóbrega**

*pelo carinho, incentivo, compreensão e apoio desprendidos em todos os momentos. Para ti, todo meu carinho e sinceros agradecimentos!*

*Ao **Dr. Dartanhã José Soares (Orientador)**, por aceitar me orientar no mundo da Fitopatologia sempre procurando meios de me ajudar. Com ele aprendi o equilíbrio entre a amizade, humildade e profissionalismo.*

A professora **Dra. Erica Caldas**

(Coorientadora).

Ao **Dr. Alderi Emídio de Araújo**  
que nunca poupou esforços para dividir  
comigo suas opiniões. Obrigada pela  
amizade, troca de experiências e pelos  
muitos ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup> Valeria Veras Ribeiro pela  
disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de  
Fitopatologia, **Lane, Juarez, Fabianne,  
Monaliza, Rommel, Gabriela, Vanessa,  
Waleska, Raissa Andrade, Raissa Wadja  
e Rhayssa Vieira**, pelo profissionalismo,  
amizade e disponibilidade. Não tenho  
dúvida de que o que aprendemos e  
vivemos nunca serão esquecidos.

Aos meus amigos,  
**Manú, Angélica Priscila, Michelle  
Patrícia, Rafaela Pimentel, Geise,  
Aluska, Renato, Márcio, Anízio e Laíza**,  
pelos muitos momentos, ensinamentos e  
por saber que nunca estaremos sozinhos,  
pois teremos sempre uns aos outros.

A todos que direto ou indiretamente  
contribuíram para a realização deste  
trabalho.

**Muito Obrigada!!**

## RESUMO

### **Validação do método de “chaff-grain” para avaliação da resistência de genótipos de algodoeiro à *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.**

A murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, é uma das doenças mais importantes para a cotonicultura, em virtude principalmente da dificuldade de seu controle. Dada a inexistência de um método padrão efetivo e seguro de inoculação do patógeno e avaliação da doença, o presente trabalho objetivou validar a utilização do método de “chaff-grain” para avaliar a resistência de genótipos de algodoeiro à *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Fov). Foram realizados cinco experimentos, avaliando-se a agressividade de 7 isolados; a influência da idade de transplântio da plântula (7 e 14 dias após emergência- DAE); o efeito do tratamento das sementes com fungicida; a influência da concentração do inóculo (1%, 2% e 3%) e a resistência de diferentes genótipos de algodoeiro à doença. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, utilizando-se como substrato de cultivo uma mistura de turfa e vermiculita na proporção de 3:1, respectivamente. As avaliações foram realizadas a partir do sexto dia após o transplântio, empregando-se uma escala de notas de 0 a 4, onde 0 correspondeu a planta sem sintomas e 4 planta morta. As notas da escala foram utilizadas para calcular o índice de intensidade de infecção e a partir deste foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). As médias da AACPD de cada tratamento foram comparadas entre si pelos testes de Scott-Knott e Tukey. Adicionalmente, para o ensaio de caracterização dos genótipos de algodoeiro foi também utilizado o método do índice de escurecimento vascular (VBI) para classificação da resistência à murcha-de-fusário (FWRR). A correlação entre AACPD e FWRR foi determinada por meio da correlação classificatória de Spearman ( $r_s$ ). Houve diferença quanto à agressividade dos isolados, idade de transplântio da plântula e concentração do inóculo. O tratamento das sementes com fungicidas não teve efeito no desenvolvimento da doença. Com base nos valores de AACPD foi possível distinguir duas classes entre os genótipos testados. Os genótipos Aurburn 56, M-315 e Delta Opal apresentaram maior resistência quando comparados aos genótipos BRS 286, Acala 44 e Deltapine 744. Houve alta correlação entre a AACPD e FWRR. O método de “chaff-grain” foi eficaz para a avaliação da resistência de genótipos de algodoeiro à Fov, tendo como principal vantagem a simulação de condições naturais de infecção.

Palavras-chave: *Gossypium* spp. métodos de inoculação. murcha-de-fusário. resistência genética.

## ABSTRACT

### **Validation of the chaff-grain method to evaluate the resistance of cotton genotypes to *Fusarium* wilt.**

The fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (*Fov*) is regarded one of the most important diseases of cotton, mainly due the difficulties of its management. Given the absence of an effective method of inoculation and a standard method of disease assessment, this study aimed to validate the use of the method of chaff-grain to evaluate the resistance of cotton genotypes to *Fov*. Five experiments were performed, evaluating the isolate aggressiveness, seedling age at transplanting (7 and 14 days after emergence, DAE), seed treatment with fungicide, inoculum concentration (1 %, 2% and 3%) and the resistance of different genotypes. The bioassays were conducted in a greenhouse, using as substrate a mixture of peat and vermiculite in a 3:1 ratio, respectively. The evaluations were performed from the sixth day after transplanting, using a scale from 0 to 4, where 0 corresponded to no symptoms and 4 dead plant. The notes of the scale were used to calculate the index of infection intensity and from this we calculated the area under the disease progress curve (AUDPC). The mean AUDPC for each treatment were compared by Scott-Knott and Tukey tests. Additionally, the cotton genotypes were also evaluated by the vascular browning index (VBI) method which was used to sorting the genotype resistance to *Fusarium* wilt according to the *Fusarium* wilt resistance rank (FWRR). The correlation between AUDPC and FWRR was determined by the Spearman correlation ( $r_s$ ). There was difference in the isolate aggressiveness, age of seedling transplanting and inoculum concentration. The fungicide seed treatment had no effect on development of disease. Based on the values of AUDPC was possible to distinguish two classes among the genotypes tested. Genotypes Aurburn 56, M-315 and Delta Opal showed higher resistance when compared to the genotypes BRS 286, Acala 44 and Deltapine 744. There was high correlation between AUDPC and FWRR. The method of chaff-grain was effective to evaluate the resistance of cotton genotypes to *Fusarium* wilt and has the advantage of simulate the natural infection process.

**Keywords:** *Gossypium* spp. inoculation methods. *Fusarium* wilt. Genetic resistance.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	13
	3.1. O Algodoeiro.....	13
	3.2. Doenças do algodoeiro.....	13
	3.2.1. A murcha-de-fusário do algodoeiro.....	14
	3.3. Métodos de inoculação de <i>Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum</i> .....	16
	3.3.1. Métodos de inoculação artificial.....	16
	3.3.2. Métodos de inoculação natural.....	17
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
	4.1 Condução dos experimentos.....	19
	4.2 Escolha dos genótipos.....	19
	4.3 Obtenção dos isolados de <i>Fov</i> .....	19
	4.4 Preparo do inóculo.....	20
	4.5 Infestação do substrato e condução dos ensaios.....	21
	4.5.1 Agressividade de isolados.....	22
	4.5.2 Influência da concentração do inóculo.....	22
	4.5.3 Influência da idade de transplântio sobre a infecção por <i>Fov</i>	22
	4.5.4 Influência do tratamento químico das sementes.....	23
	4.5.5 Reação de genótipos de algodoeiro a <i>Fov</i> .....	23
	4.6 Avaliações dos ensaios.....	24
	4.7 Análises estatísticas.....	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
	5.1 Agressividade de isolados.....	28
	5.2 Influência da concentração do inóculo.....	29
	5.3 Influência da idade de transplântio.....	30
	5.4 Influência do tratamento químico das sementes.....	32
	5.5 Reação de genótipos de algodoeiro à <i>Fov</i> .....	33
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	35
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

---

O algodoeiro (*Gossypium spp.*), especialmente *Gossypium hirsutum L.*, é considerado uma das espécies de planta mais importantes do mundo do ponto de vista socioeconômico. É produzido e consumido em mais de 150 países devido, principalmente, ao seu principal produto - a fibra mundialmente utilizada pela indústria têxtil (BELTRÃO, 2008). Adicionalmente, o algodoeiro é considerado a sexta maior fonte de óleo vegetal do mundo (ULLOA *et al.*, 2006).

Com a expansão da cultura do algodão para o cerrado do Brasil a importância das doenças tem aumentado a cada ano em razão das perdas provocadas pela ação dos patógenos e da necessidade de adoção de medidas preventivas ou curativas que elevam o custo de produção (SUASSUNA; COUTINHO, 2007).

Dentre as doenças que afetam a cultura do algodoeiro, a murcha-de-fusário ou fusariose, merece destaque, quer pelos danos causados pela doença, quer pelas dificuldades encontradas para o seu manejo.

A murcha-de-fusário provoca danos à cultura do algodoeiro em vários estados brasileiros, com perdas de produção estimadas em mais de 30% (FUZZATTO *et al.*, 1994). Por se uma doença cujo patógeno sobrevive na área de cultivo por vários anos, e para a qual não existem métodos de controle curativo eficazes, a principal alternativa para o seu manejo é o uso de cultivares resistentes. Infelizmente, o sucesso do uso da resistência genética no manejo da murcha-de-fusário não tem sido plenamente alcançado, devido principalmente à alta variabilidade presente nas populações do patógeno, aliada ao fato da necessidade de incorporação de resistência a nematóides (DAVIS *et al.*, 2006). Embora não existam cultivares imunes ao patógeno, genótipos comerciais com moderados a elevados níveis de resistência tem sido desenvolvido (SUASSUNA *et al.*, 2008).

Em qualquer programa de melhoramento genético que vise a resistência à doenças é imprescindível a identificação de fontes de genes de resistência, a incorporação dessa resistência em genótipos de interesse agrônomo, e a disponibilidade de métodos efetivos de inoculação e avaliação das plantas (MACHADO *et al.*, 2009).

Vários métodos têm sido utilizados para avaliação de genótipos de algodoeiro à murcha-de-fusário, porém, nenhum deles é amplamente adotado, pois muitos são laboriosos ou não permitem uma infecção uniforme dos genótipos avaliados (BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012).

Frente à constante busca por novas cultivares que sejam agronomicamente mais interessantes aos produtores, fica evidente a necessidade de um processo contínuo de avaliação da resistência de genótipos de algodoeiro à murcha-de-fusário. Essa constante busca por novas cultivares demanda que o método de seleção e avaliação seja facilmente reproduzível, propicie uma rápida resposta e seja altamente acurado (BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012).

Um método que tem sido usado com sucesso em outros patossistemas, inclusive para várias espécies de *Fusarium*, é o método de “chaff-grain”, que preconiza a produção de inóculo do patógeno em um substrato sólido, composto de uma mistura de grãos e farelo de cereais e sua posterior incorporação ao substrato de cultivo das plantas (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Embora esse método reúna as principais vantagens dos métodos mais comumente usados para a inoculação de patógenos habitantes do solo, sendo a mais importante delas, a simulação do processo natural de infecção, ele ainda não foi validado para o presente patossistema.

## 2 OBJETIVOS

---

- ✓ Validar o método de “chaff-grain” para a avaliação da resistência de genótipos de algodoeiro à *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.
- ✓ Caracterizar a agressividade de diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, pelo método de chaff-grain.
- ✓ Analisar o efeito da idade de transplante, concentração de inóculo, e do tratamento químico das sementes sobre a taxa de infecção e reprodução de sintomas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

## 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 3.1 O algodoeiro

O algodoeiro (*Gossypium spp.*) é uma das culturas do ponto de vista socioeconômico mais importante do mundo. Atualmente, estima-se uma área mundial de aproximadamente 35 milhões de hectares plantados anualmente com essa cultura (ABRAPA, 2012). O Brasil é um importante centro produtor, com grandes possibilidades de expansão da área cultivada.

A cadeia produtiva do algodão ocupa um papel relevante no agronegócio brasileiro, tanto na geração de renda como no emprego de mão de obra. A produção nacional é a quinta maior do mundo, ficando atrás apenas da China, Índia, Estados Unidos e Paquistão. Contudo, a cotonicultura brasileira tem seu destaque na produtividade em sequeiro, obtida na região do cerrado, considerada a maior do mundo (ABRAPA, 2012).

Dentre os países consumidores da fibra do algodão, o Brasil é o quinto maior, tendo seu consumo médio anual em torno de 1 milhão de toneladas. No cenário externo é o terceiro país exportador (ABRAPA, 2012). Na safra de 2010/2011, a produção de algodão em pluma totalizou 1.959,8 mil toneladas, e para a safra de 2012, estima-se um crescimento de 2,1%, passando para 2.001,1 mil toneladas de algodão em pluma (CONAB, 2012).

O agronegócio mundial do algodão movimenta anualmente, aproximadamente US\$ 12 bilhões, além de ser uma das cadeias produtivas que mais gera empregos diretos e indiretos (ABRAPA, 2012), mostrando em números expressivos a grande importância econômica e social que a cultura propicia ao país.

O seu principal produto, a fibra, tem sua utilização concentrada na indústria têxtil e de fiação. Entretanto diversos subprodutos da cadeia produtiva do algodoeiro são utilizados tanto na indústria de alimentação humana, quanto animal (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

### 3.2 Doenças do algodoeiro

Uma das maiores barreiras para o aumento da produtividade da cultura do algodoeiro é estabelecida pelas doenças fúngicas, que geram sérios prejuízos econômicos. Além disso, a crescente expansão das áreas cultivadas não foi acompanhada do manejo adequado das doenças, resultando em perdas de produtividade, além de proporcionar a dispersão de diversos patógenos para áreas de cultivo anteriormente livres dos mesmos (SILVA *et al.*, 2007).

Entre os patógenos que causam problemas para a cotonicultura, destacam-se a murcha-de-fusário ou fusariose. Sua introdução no estado de São Paulo, ainda na década 1950, ocasionou o declínio da cotonicultura paulista. Entretanto, este fato impulsionou o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) a desenvolver cultivares resistentes ao agente causal dessa doença, viabilizando o cultivo do algodoeiro naquele Estado (SUASSUNA *et al.*, 2008).

### 3.2.1 A murcha-de-fusário do algodoeiro

A murcha-de-fusário do algodoeiro foi relatada pela primeira vez em 1892 no Alabama (EUA). Posteriormente esta doença foi relatada em vários outros países produtores de algodão, incluindo o Egito, Índia, Tanzânia, Sudão, Israel, China e Austrália (DAVIS *et al.*, 2006). No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez ainda na década de 1930 no estado da Paraíba, e hoje se encontra disseminada por quase todos os estados produtores de algodão (SUASSUNA *et al.*, 2008). Além disso, ocorre em todos os quatros tipos de algodões domesticados, *Gossypium arboretum* L., *G. barbadense* L., *G. herbaceum* L., *G. hirsutum* L. (COYLER, 2007).

O agente causal da doença é o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hans. (*Fov*), que quando associado à nematoides, principalmente do gênero *Meloidogyne* aumenta a incidência e severidade da doença. (ATKINSON, 1892; JULIATI; RUANO, 1997; RUANO, 1984).

Diferentemente da maioria das outras forma especiais de *Fusarium oxysporum*, *Fov* caracteriza-se por ser patogênico a outras espécies de plantas além do algodoeiro, o que lhe confere uma ampla adaptabilidade e capacidade de sobrevivência, mesmo na ausência de seu principal hospedeiro (DAVIS *et al.*, 2006). Além disso, já foram relatadas várias “raças” desse patógeno em todo o mundo. Entretanto devido a necessidade de inclusão de plantas de outras espécies

botânicas para a diferenciação dessas “raças”, Davis *et al.* (2006) consideram que esse conceito tem sido erroneamente utilizado no caso de *Fov*, e sugere que se dê preferência aos termos biótipos ou patótipos.

Os sintomas da doença aparecem em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Durante o processo infeccioso em plântulas, ocorre amarelecimento, murcha e necrose das folhas cotiledonares e em plantas adultas, ocorre amarelecimento da superfície foliar e murcha das folhas e ramos. Além de perderem todas as folhas e as novas brotações caírem, as plantas que conseguem sobreviver sofrem severa redução de crescimento (DAVIS *et al.*, 2006). Internamente ao caule observa-se o escurecimento dos feixes vasculares, devido à presença de esporos e micélio, e pela ação de substâncias produzidas pelo metabolismo do fungo nos vasos, sendo a principal causa do sintoma de murcha na planta (SUASSUNA *et al.*, 2008).

A murcha-de-fusário é uma doença veiculada pelo solo, cujo patógeno, além de poder sobreviver por vários anos na ausência de seu hospedeiro, na forma de clamidósporos, pode ser transmitido pela semente. Além disso, vários fatores influenciam a ocorrência e o desenvolvimento da doença incluindo, interação com nematoides, uso de sementes infectadas, capacidade de dispersão de propágulos (por meio de máquinas agrícolas, do vento e da água), e a suscetibilidade da cultivar plantada (CIA; SALGADO, 1997; DAVIS, *et al.*, 2006).

Embora, as perdas ocasionadas pela murcha-de-fusário possam variar, mesmo dentro de uma região produtora ou de um país, o uso de cultivares suscetíveis, em áreas altamente infestadas, aumentam significativamente essas perdas de produção (COYLER, 2007). Em geral considera-se que não existem métodos químicos ou físicos que sejam eficazes e economicamente viáveis para o manejo da doença. Dessa forma, uma vez que o patógeno foi introduzido na área de cultivo, o uso de cultivares resistentes é o único método de manejo adequado. Essa prática, associada a outras táticas como, utilização de sementes livres do patógeno, tratamento das sementes com fungicidas e rotação de culturas, usualmente promove uma redução das perdas ocasionados pela doença, bem como evita, ou reduz os riscos de introdução do patógeno em novas áreas até então consideradas isentas (SUASSUNA; COUTINHO, 2007).

### **3.3 Métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.**

Inúmeros métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de algodoeiro à *Fov* já foram desenvolvidos, entretanto nenhum deles é amplamente adotado (BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012). De um modo geral eles podem ser divididos em dois grupos: os métodos de inoculação artificial e os métodos de inoculação natural. Os métodos de inoculação artificial são usualmente mais utilizados, devido, principalmente à rápida resposta de reação, à baixa probabilidade de escape da inoculação, ao controle da quantidade de inóculo, bem como à sua distribuição uniforme e redução dos custos experimentais. Entretanto, o processo de infecção torna-se mais severo do que quando em condições naturais. Já os métodos de inoculação natural são usados principalmente por simularem o processo natural de infecção e dessa forma serem considerados mais realísticos (BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012).

Contudo, o sucesso da identificação de cultivares resistentes depende de um método efetivo de avaliação e inoculação das plantas. Para isso, é necessário definir um método fácil, rápido e eficiente no processo de infecção (MACHADO *et al.*, 2009).

#### **3.3.1 Métodos de inoculação artificial**

Geralmente, o método de inoculação artificial mais utilizado é o “root deeping” ou imersão das raízes em suspensão de esporos do fungo (COUTO *et al.*, 2006; ULLOA *et al.*, 2006). Apesar da eficiência no favorecimento da infecção pelo patógeno, pode-se observar, em alguns casos, ocorrência de escape devido, por exemplo, a diferenças em relação ao tempo de exposição das raízes ao inóculo do fungo (BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012). Além disso, é um método bastante laborioso e tende a ferir demasiadamente as raízes durante a inoculação e posterior transplante, podendo reduzir o crescimento das plantas ou causar a morte precoce das mesmas, mascarando os resultados da inoculação (BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012).

Um método mais simples e de rápida execução consiste na inoculação junto à base do caule, usando uma seringa. Esse método evita escape, não danifica as

Universidade Estadual da Paraíba/Departamento de Biologia

raízes e pode ser usado em campo (MACHADO *et al.*, 2008). Entretanto, o método não avalia a rota normal de infecção da doença, que seria a partir das raízes. Além disso, quando for necessário avaliar um grande número de isolados, as chances de contaminação são maiores, além de o método tornar-se mais laborioso.

A inoculação também pode ser realizada via semente. Nesse caso as sementes são postas em contato direto com o micélio do fungo previamente desenvolvido em meios de cultura convencionais, ou por meio da imersão das sementes em suspensão de inóculo (MACHADO *et al.*, 2001). Por meio deste método não é garantido o processo de infecção, e sim o de contaminação, pois as estruturas fúngicas ficam aderidas ao tegumento das sementes. O método pode também resultar em níveis insatisfatórios de infecção, pelo fato, principalmente, do tempo de exposição da semente ao fungo (MACHADO *et al.*, 2001). Com o intuito de proporcionar níveis satisfatórios de infecção, esse método foi melhorado por meio do uso da técnica de restrição hídrica (MACHADO *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2008). Esta técnica possibilita a padronização da concentração do inóculo e a utilização das sementes inoculadas por períodos de armazenamento mais prolongados. Entretanto, as chances de contaminações externas são maiores (SOUSA *et al.*, 2008), além do que a infecção da planta também não é garantida.

### **3.3.2 Métodos de inoculação natural**

A técnica de inoculação natural mais comumente utilizada consiste na deposição de suspensão de esporos sobre o substrato de cultivo (MACHADO *et al.*, 2009; SUASSUNA *et al.*, 2008). Este método é eficiente no processo de infecção pelo patógeno e, devido a sua praticidade é adequado para avaliar um grande número de genótipos. Entretanto esse método também está sujeito a ocorrência de escape (MACHADO *et al.*, 2009).

Experimentos em condições de campo, como a deposição de esporos no solo antes do plantio, ou depois com ferimentos nas raízes podem ser ineficientes, devido à falta de capacidade de sobrevivência do patógeno até o prazo do aparecimento das raízes ou a inacurácia do ferimento e deposição do inóculo (CIA *et al.* 1991). Além disso, em estudos de campo, deve-se levar em consideração o

tipo de solo, que pode ser supressivo ao fungo, o clima, a temperatura e os custos do experimento (CIA *et al.* 1991).

Dentre os métodos naturais de infecção, existem ainda aqueles que envolvem a produção do inóculo em um substrato sólido e a posterior incorporação desse inóculo no substrato de cultivo das plantas. Esses métodos têm como vantagens a uniformização da concentração do inóculo, reduzindo a possibilidade de escape, e a simulação do processo natural de infecção, o qual permitiria uma resposta mais realística da reação do genótipo ou da planta à infecção pelo patógeno. Adicionalmente esses métodos são, em geral, menos laboriosos, pois uma vez produzido o inóculo este pode permanecer viável por vários meses, sem comprometimento dos resultados, reduzindo assim os custos e aumentando a eficiência operacional do processo. Dentre esses métodos podemos citar a técnica de “chaff-grain” (LESLIE; SUMMERELL, 2006) utilizada com sucesso em vários patossistemas, envolvendo várias espécies de *Fusarium*, mas que ainda não foi validado para patossistema, objeto desse estudo. Entre as principais vantagens, esse método mostra-se adequado para avaliar um número elevado de genótipos e/ou isolados do fungo, é facilmente reproduzível, simula condições naturais de infecção e não exige que as inoculações sejam feitas por pessoal treinado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 Condução dos experimentos

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação climatizada, sobre bancadas, na Embrapa Algodão (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada em Campina Grande-PB.

### 4.2 Escolha dos genótipos

Os genótipos utilizados foram obtidos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão. A escolha destes foi definida com base nos diferentes níveis de resistência à doença e na disponibilidade de sementes para a realização dos ensaios. Os genótipos utilizados foram: Acala 44, Auburn 56, M-315, Delta Opal, Deltapine 744 e BRS 286, tendo como controle as cultivares: Auburn 56 (Resistente) e Deltapine 744 e Acala 44 (Suscetíveis).

### 4.3 Obtenção dos isolados de *Fov*

Os isolados utilizados no estudo pertencem à Coleção de Culturas de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão (CCMF-CNPA). Foram utilizados sete isolados de *Fov*, obtidos de diferentes áreas de plantio de algodão no país (Tabela 1). Todos estavam sendo mantidos na CCMF-CNPA por meio do método de preservação em areia esterilizada e armazenados em geladeira a 5<sup>o</sup> C.

Tabela 1. Lista dos isolados de *Fov* utilizados no presente estudo.

<b>Isolado</b>	<b>Origem</b>
CCMF-CNPA 0001	Luiz Eduardo Magalhães-BA
CCMF-CNPA 0002	Desconhecida
CCMF-CNPA 0003	Votuporanga-SP
CCMF-CNPA 0004	Desconhecida
CCMF-CNPA 0005	Campina Grande-PB
CCMF-CNPA 0006	Acreúna-GO
CCMF-CNPA 0007	São Desidério-BA

#### 4.4 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foi utilizada a metodologia de “chaff-grain”, descrita por Leslie e Summerell (2006), adaptada por Costa (2012). Foi preparada inicialmente uma mistura de 5:1 de farelo de trigo e grãos de aveia, em um béquer com capacidade para 2 L ao qual foram adicionados aproximadamente 500 mL desta mistura e completado o volume para 1 L com água de torneira, agitando-se vigorosamente para remover as bolhas de ar e permitir o umedecimento uniforme da mistura. Quando necessário o volume era completado novamente para 1 L. Os beakers foram mantidos por 12 horas em geladeira a 5°C. Decorrido este período o excesso de água foi escorrido por decantação invertendo-se o becker sobre tecido permeável. Posteriormente, a mistura foi prensada para eliminar o máximo de água possível. A seguir foi então transferida para frascos Erlenmeyers de 1 L, até o volume aproximado de 500 ml e autoclavada por 15 minutos, por dois dias consecutivos. Após a segunda autoclavagem foram adicionados 4 mL de uma suspensão de esporos de *Fov*, na concentração de  $1 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, preparada conforme descrito adiante. O material inoculado foi mantido em câmara de crescimento a 25±1°C, e agitado manualmente diariamente, até o quarto dia, para permitir uma colonização uniforme do substrato. Decorridos mais três dias, o substrato, completamente colonizado, foi depositado sobre papel de filtro e deixado secar em temperatura ambiente durante a noite. Em seguida, o material foi forçadamente peneirado em uma peneira de 07 "mesh" para melhor uniformização

das partículas, e depois, acondicionado em sacos de papel e armazenado em geladeira até a realização dos ensaios.

Para o preparo das suspensões de esporos, os isolados de *Fov* foram cultivados em placas de Petri, contendo o meio "synthetic nutrient agar" (SNA) e mantidos em câmara de crescimento à temperatura de 25+1°C com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Decorrido este período foram adicionados, às placas com as colônias de *Fov*, 10 mL de água destilada esterilizada + Tween 20 (1%) e com o auxílio de uma alça de Drigalsky, foi realizada a remoção superficial dos esporos do fungo. A suspensão obtida foi filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada e a concentração inicial de esporos, para cada um dos isolados a serem testados, foi determinada por meio da contagem em câmara de Neubauer. Em seguida foi feito o ajuste para a concentração final de  $1 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, a qual foi então utilizada para inoculação no substrato de cultivo.

#### **4.5 Infestação do substrato e condução dos ensaios**

O substrato de cultivo das plantas consistiu de uma mistura de turfa e vermiculita na proporção de 3:1, respectivamente, a qual havia sido previamente autoclavada por dois dias consecutivos. Após autoclavagem do substrato foi realizada a incorporação do inóculo na proporção de 2% do volume final do substrato de cultivo, com exceção do ensaio de concentração onde o inóculo foi incorporado nas concentrações de 1%, 2% e 3%. Para efetivar a mistura do substrato de cultivo ao inóculo foram conduzidas várias etapas de revolvimento do mesmo até a que esta alcançasse aspecto uniforme.

Sementes de genótipos de algodoeiro foram desinfestadas superficialmente em hipoclorito de sódio (0,5%) por 2 minutos e então semeadas em bandejas, contendo 162 células com capacidade para 25 mL cada, contendo substrato de cultivo. Entre seis a sete dias após emergência foi transplantada uma plântula para cada copo plástico, com aproximadamente 180 mL contendo substrato de cultivo com o inóculo já incorporado, conforme já descrito.

Foram avaliadas a agressividade dos isolados de *Fov*; a concentração do inóculo; a idade de transplântio das plântulas; o tratamento químico das sementes e a reação de genótipos de algodoeiro à *Fov*.

#### **4.5.1 Agressividade de isolados**

Com o objetivo de caracterizar a agressividade dos diferentes isolados de *Fov* (Tabela 1), preparou-se o inóculo de cada um desses isoladamente posteriormente procedeu-se sua incorporação ao substrato de cultivo das plantas, na concentração de 2% do volume final, conforme já mencionado.

Plântulas de algodão da cultivar BRS 286 entre seis a sete dias após emergência, foram transplantadas para copos plásticos contendo aproximadamente 180 mL do substrato infestado. O ensaio foi realizado em casa de vegetação e conduzido sob delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo cada repetição composta por 10 plantas. Plântulas transplantadas para recipientes contendo substrato de cultivo sem incorporação do inóculo foram utilizadas como testemunhas. As avaliações foram feitas a cada dois dias e consistiram da atribuição de notas conforme descrito no item 4.6.

#### **4.5.2 Influência da concentração do inóculo**

Foram testadas três concentrações de inóculo usando-se a mesma metodologia do ensaio anterior. Foi utilizado apenas o isolado CCMF-CNPA 0005, que foi incorporado nas concentrações de 1%, 2% e 3% do volume final do substrato de cultivo. Plântulas de algodoeiro, da cultivar BRS 286, com idade entre seis a sete dias após emergência, foram transplantadas para copos contendo aproximadamente 180 mL do substrato infestado. O ensaio foi realizado em casa de vegetação e conduzido no delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo cada repetição composta por 10 plantas. Como testemunhas, utilizaram-se plântulas transplantadas para recipientes contendo substrato de cultivo sem incorporação do inóculo. As avaliações foram realizadas a cada dois dias e consistiram da atribuição de notas conforme descrito no item 4.6.

#### **4.5.3 Influência da idade da plântula**

Neste ensaio foram testadas duas idades de transplântio das plântulas, sendo uma com sete e outra com 14 dias após emergência (DAE). A semeadura foi  
Universidade Estadual da Paraíba/Departamento de Biologia

feita com intervalo de sete dias, de forma que as plântulas a serem usadas estivessem com as idades de 7 e 14 dias no momento do transplântio. Este foi feito para copos plásticos contendo aproximadamente 180 mL do substrato previamente infestado com inóculo do fungo. Foi utilizada a cultivar BRS 286 e o isolado CCMF-CNPA 0005, na concentração de 2% do volume final do substrato. O ensaio foi realizado em casa de vegetação e conduzido sob delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição constituída de 10 plântulas. Como testemunhas foram utilizadas plântulas transplantadas para substrato sem inoculação. As avaliações foram feitas a cada dois dias e consistiram da atribuição de notas conforme descrito no item 4.6.

#### **4.5.4 Influência do tratamento químico das sementes**

Neste ensaio foi avaliado o efeito do tratamento químico das sementes em relação ao progresso da doença e expressão dos sintomas da infecção de *Fov*. O ensaio foi realizado seguindo-se a mesma metodologia descrita anteriormente. Foi utilizada a cultivar BRS 286, com e sem tratamento químico das sementes. Para o tratamento químico utilizou-se o produto comercial Vitavax-Thiram<sup>®</sup> utilizando-se os procedimentos e dose recomendada pelo fabricante (500 mL do produto para cada 100 Kg de sementes). As sementes foram pré-germinadas em substrato composto por turfa e vermiculita na proporção de 3:1, respectivamente. Aos sete dias, após a emergência, as plântulas foram transplantadas para copos plásticos contendo aproximadamente 180 mL do substrato infestado na proporção de 2% do volume final do substrato. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, empregando-se um delineamento inteiramente casualizado com seis repetições, sendo cada repetição constituída de 10 plântulas. As testemunhas consistiram de plântulas transplantadas para copos sem incorporação do inóculo. As avaliações foram realizadas a cada dois dias e consistiram da atribuição de notas conforme descrito no item 4.6.

#### **4.5.5 Reação de genótipos de algodoeiro à *Fov***

Foram testados seis genótipos de algodoeiro, sendo um considerado resistente (Auburn 56), dois considerados suscetíveis (Acala 44 e Deltapine 744) e três cuja reação não era conhecida (M-315, BRS 286 e Delta Opal). Plântulas dos diferentes genótipos, com idade entre seis a sete dias após a emergência, foram transplantadas para copos plásticos contendo aproximadamente 180 mL do substrato de cultivo contendo uma mistura proporcional dos isolados CCMF-CNPA 0003, CCMF-0005, CCMF-CNPA 0006 e CCMF-CNPA 0007, na concentração de 2% em relação ao volume final do substrato. O ensaio foi realizado em casa de vegetação e conduzido sob delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo 10 plântulas por repetição. Como testemunhas, utilizaram-se plântulas sem inoculação. As avaliações foram feitas a cada três dias e consistiram da atribuição de notas conforme descrito no item 4.6.

#### **4.6 Avaliações dos ensaios**

As avaliações da severidade da doença foram realizadas a cada dois dias para todos os ensaios, com exceção do ensaio 4.5.5, a qual foi realizada a cada três dias, durante 30 dias consecutivos, a partir do sexto dia após o transplante. As avaliações consistiam da atribuição de uma nota de severidade, para cada planta, com base em uma escala de notas adaptada de Machado *et al.* (2009), conforme especificado na Figura 1. As notas de severidade da doença em cada plântula na parcela foram utilizadas para calcular um índice de intensidade de infecção (I), expresso como  $I = \sin^2 \omega$ , para cada distribuição de frequência obtida na parcela (AMARAL, 1969), com as modificações propostas por Czermainski (1999). Os dados diários da variável  $\omega$ , 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).

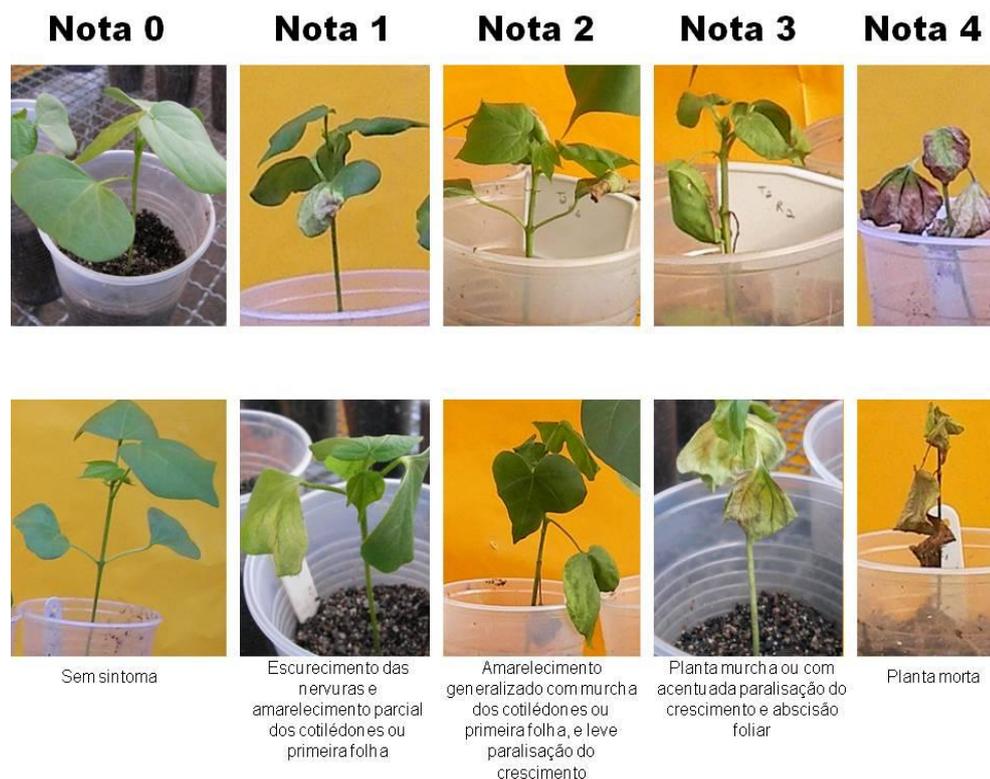


Figura 1. Escala descritivo-diagramática de notas para avaliação de genótipos de algodoeiro a infecção por *Fov*.

Adicionalmente para o ensaio 4.5.5 foi utilizada a metodologia de avaliação do índice de escurecimento vascular (vascular browning index – VBI) modificada por Becerra Lopez-Lavalle *et al.* (2012) conforme a Tabela 2.

Após a última avaliação da severidade da doença, aos 36 dias depois do transplante, as plântulas consideradas vivas foram retiradas do substrato, seccionando-as na região do colo, cortadas ao meio verticalmente, com o auxílio de um bisturi e, por meio de inspeção visual, foi feita a avaliação do escurecimento do sistema vascular.

Tabela 2. Escala de notas para avaliação de acordo com os sintomas em VBI.

<b>Nota</b>	<b>Sintomas</b>
<b>0</b>	Sem descoloração vascular.
<b>1</b>	Descoloração vascular restrita a base do caule.
<b>2</b>	Descoloração vascular até a região do 1º entrenó (abaixo dos cotilédones).
<b>3</b>	Descoloração vascular acima do 1º entrenó (acima dos cotilédones).
<b>4</b>	Descoloração vascular completa.
<b>5</b>	Planta morta na sexta semana.
<b>6</b>	Planta morta na quinta semana.
<b>7</b>	Planta morta na quarta semana.
<b>8</b>	Planta morta na terceira semana.
<b>9</b>	Planta morta na segunda semana.
<b>10</b>	Planta morta na primeira semana.

(Fonte: BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012 adaptada de McFadden *et al.*, 2004)

Os valores em VBI foram utilizados para calcular o ranking de resistência à murcha-de-fusário (fusarium wilt resistance ranks – FWRR), determinado a partir do número de plantas agrupadas nas seguintes categorias: A = notas 0 ou 1; B = notas 2 ou 3; C = notas 4 ou 5 e D = notas 6 a 10, e estimada usando a equação abaixo:

$$FWRR = 10 \left( \frac{A}{N} \right) + 5 \left( \frac{B}{N} \right) + 2.5 \left( \frac{C}{N} \right) + 0.5 \left( \frac{D}{N} \right)$$

Figura 2. Fórmula do cálculo do ranking de resistência a murcha-de-fusário (BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012)

Onde, N = número total de plantas marcadas por linha. Com base neste sistema de pontuação, as cultivares de algodoeiro foram classificadas conforme especificado na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação das cultivares de acordo com o FWRR.

<b>Valores em FWRR</b>	<b>Classificação</b>
10 – 5	Altamente resistente
4.9 - 2.5	Moderadamente resistente
2.49 – 0.5	Altamente suscetível

(Fonte: BECERRA LOPEZ-LAVALLE *et al.*, 2012)

#### **4.7 Análises estatísticas**

As análises de variância dos ensaios foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar<sup>®</sup> 5.1 Built 72. As médias da variável AACPD, de cada tratamento foram comparadas entre si pelos testes de Scott-Knott ou Tukey.

Adicionalmente para o ensaio 4.5.5 foi realizado um estudo de correlação entre as metodologias de avaliação da AACPD e FWRR, utilizando-se a correlação de Spearman ( $r_s$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1 Agressividade de isolados

Houve diferença significativa quanto à agressividade entre os isolados de *Fov* testados. Foram observados três grupos distintos, sendo um formado pelo isolado CCMF-CNPA 0002, considerado o menos agressivo; um pelo isolado CCMF-CNPA 0003, de comportamento intermediário, e outro formado pelos isolados CCMF-CNPA 0001, 0004, 0005, 0006 e 0007 considerados os mais agressivos. Apesar de não diferir estatisticamente dos isolados CCMF-CNPA 0001, 0004, 0005 e 0006, o isolado CCMF-CNPA 0007 foi o que apresentou a maior AACPD dentre os isolados testados (Tabela 4).

Tabela 4. Agressividade de 7 isolados de *Fov* à cultivar BRS 286, determinado com base nos valores de AACPD.

<b>Isolado</b>	<b>AACPD</b>
CCMF-CNPA 0002	940,51 a
CCMF-CNPA 0003	1584,90 b
CCMF-CNPA 0001	1926,86 c
CCMF-CNPA 0006	2004,38 c
CCMF-CNPA 0005	2039,58 c
CCMF-CNPA 0004	2098,53 c
CCMF-CNPA 0007	2218,72 c

A existência de variações quanto à agressividade dos isolados testados era esperada, uma vez que em estudos anteriores já havia sido detectada uma alta variabilidade genética entre diferentes isolados de *Fov*, obtidos de campos de cultivo de algodoeiro no Brasil (BIBANCO *et al.*, 2010). Mesmo considerando o fato de que, supostamente, no Brasil, só tenha sido relatada a raça 6 de *Fov* (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1978) é importante que em estudos de resistência Universidade Estadual da Paraíba/Departamento de Biologia

sejam utilizados mais de um isolado do patógeno, devido, principalmente, à existência de isolados com diferentes níveis de agressividade, conforme demonstrado no presente estudo.

Embora se considere que no Brasil só ocorra a raça 6, a constatação dessa raça foi verificada à mais de 30 anos e nenhum estudo complementar foi realizado mais recentemente para a determinação de quais raças podem ou não estar presentes hoje nos campos de cultivo de algodoeiro no Brasil. Se considerarmos a constante importação e exportação de material genético, por meio do comércio de sementes, e levando em consideração que *Fov*, pode ser facilmente disseminado por essa via, fica evidente a necessidade de se utilizar diferentes isolados de *Fov* na seleção de cultivares de algodoeiro para resistência à murcha-de-fusário.

Adicionalmente, de acordo com Davis *et al.* (2006) apenas genótipos com resistência a múltiplas raças ou biótipos do patógeno deveriam ser usadas em programas de melhoramento para a resistência a murcha-de-fusário.

## **5.2 Influência da concentração do inóculo**

Com base na análise de variância, foi possível observar que houve diferença significativa entre as concentrações de inóculo utilizadas quanto ao processo de infecção pelo patógeno. A concentração de 3% foi a que apresentou a maior AACPD, diferindo das concentrações de 1% e 2%, que não diferiram entre si.

De acordo com Leslie e Summerell (2006), para o método em questão, pode-se usar uma concentração de 1% a 2% de inóculo em relação ao volume final do substrato de cultivo das plantas. Neste ensaio apesar da concentração de 3% ter resultado em uma maior AACPD, os valores finais dessa variável foram muito próximos para todas as concentrações, de modo que a resposta das plantas ao processo de infecção, nas diferentes concentrações, foi praticamente idêntica (Figura 3).

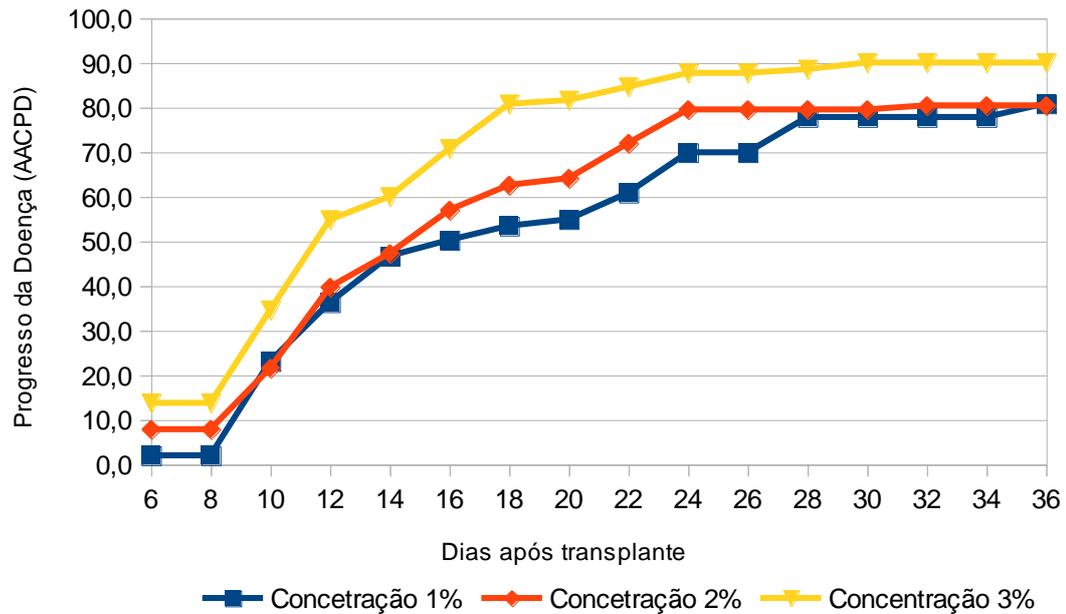


Figura 3. Progresso da murcha-de-fusário do algodoeiro em relação a diferentes concentrações de inóculo de *Fov* no substrato de cultivo.

Observando-se os resultados e levando-se em consideração que a concentração do inóculo pode ser um fator determinante na reação de genótipos ao processo de infecção, optou-se por utilizar em todos os ensaios subsequentes a concentração de 2%, visto que a mesma, apesar de não diferir da concentração de 1%, representaria um menor risco de escape da infecção pelo patógeno. A concentração de 3% apesar de resultar em um maior índice de infecção, implicaria em um aumento significativo da quantidade de inóculo necessária para a realização dos ensaios, sem que, no entanto, houvesse uma resposta biológica distinta daquela observada para a concentração de 2%.

### 5.3 Influência da idade da plântula sobre a infecção por *Fov*

Houve diferença significativa entre a idade de transplante das plântulas em relação à AACPD. As plântulas transplantadas aos 7 DAE apresentaram os sintomas da infecção pelo patógeno, mais precocemente e de forma mais intensa do que as plântulas transplantadas aos 14 DAE. Esse comportamento pode estar

associado à maior lignificação dos tecidos e capacidade de reação das plântulas com 14 dias de idade ao processo de infecção, como, por exemplo, maior capacidade de formação de géis e gomas nos vasos condutores, restringindo assim o movimento do patógeno (BUGBEE, 1970).

Observa-se com base na Figura 4, que a doença progrediu mais rapidamente nas plântulas transplantadas aos 7 DAE, em relação as plântulas transplantadas aos 14 DAE. Adicionalmente nota-se que a partir de 26 a 28 dias após o transplante ocorreu uma estabilização da curva de progresso observada principalmente para as plântulas transplantadas aos 14 DAE. Esse comportamento poderia resultar em uma superestimação do nível de resistência das plântulas avaliadas, visto que as plantas mais jovens apresentaram um comportamento distinto. Considerando-se ainda que a velocidade da resposta da reação é um dos requisitos avaliados na escolha de um método de avaliação de resistência, onde o uso de plantas com 7 DAE, proporcionaria uma resposta de reação mais rápida quando comparado a plantas transplantadas aos 14 DAE, representando um ganho significativo no tempo necessário para a realização dos testes de resistência.

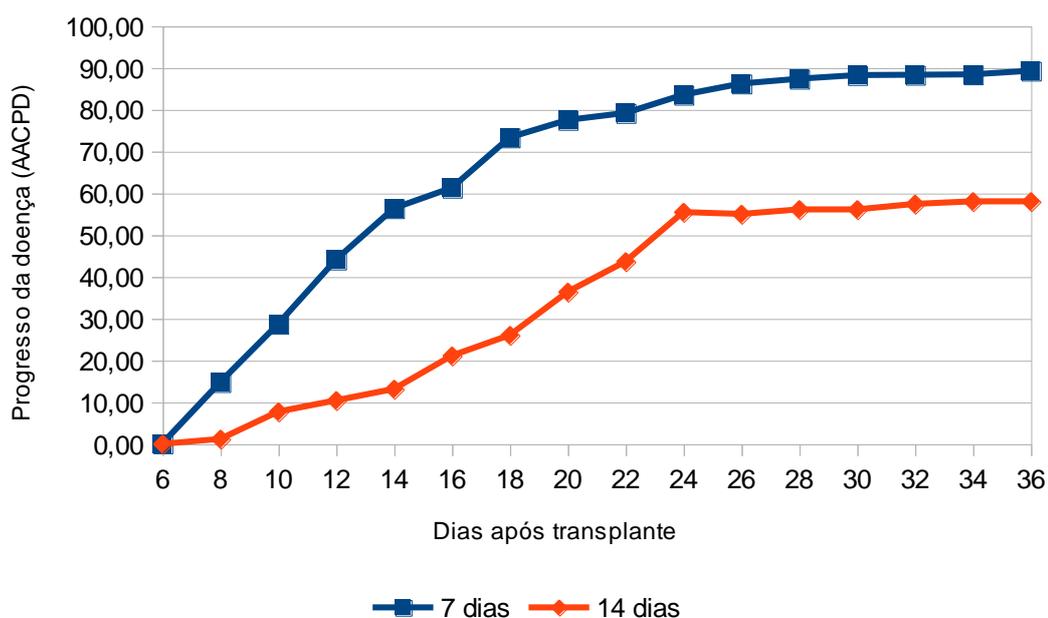


Figura 4. Curvas de progresso da murcha-de-fusário em relação à idade de transplante de plântulas de algodoeiro cultivadas em substrato contendo inóculo de *Fov*.

#### 5.4 Influência do tratamento químico das sementes

Não houve diferença significativa em relação à variável AACPD para as plântulas obtidas a partir de sementes com ou sem tratamento químico.

O produto utilizado, Vitavax-Thiram® 200 SC está registrado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o tratamento de sementes e é considerado efetivo contra *Fov* (SOARES *et al.* 2012). Porém como as plântulas só foram expostas ao fungo sete dias após o transplante, já havia decorrido pelo menos 14 dias desde o tratamento das mesmas com o fungicida, de modo que o efeito residual do mesmo provavelmente já não se fazia presente nas plântulas quando estas foram expostas ao inóculo do fungo.

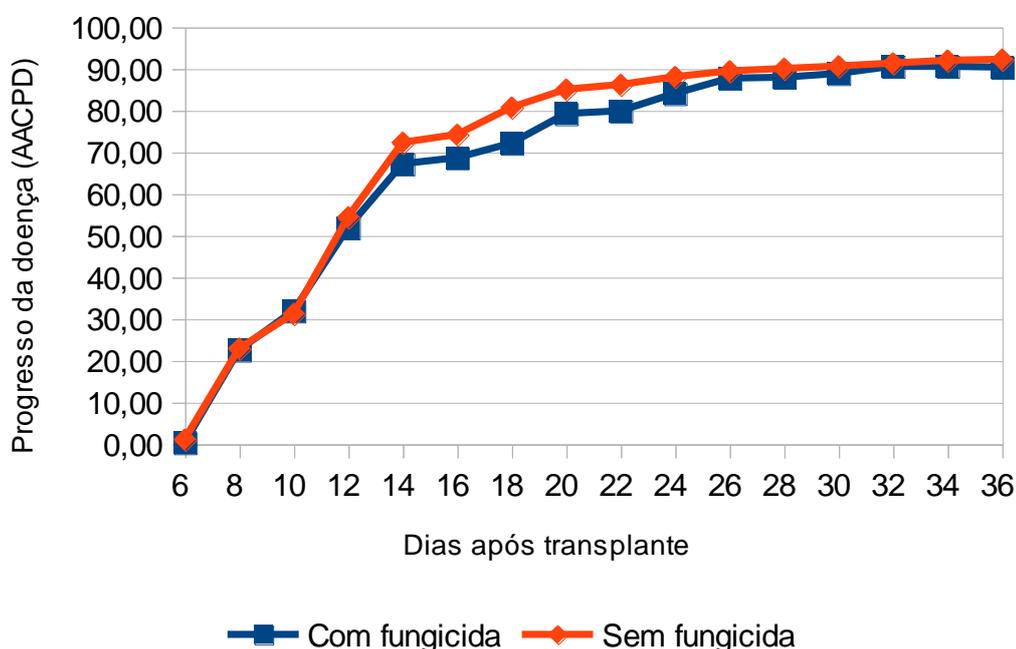


Figura 5. Curvas de progresso da murcha-de-fusário em plântulas oriundas de sementes de algodoeiro tratadas e não tratadas com fungicidas.

Com base nesses resultados recomenda-se, para estudos de reação de genótipos de algodoeiro a *Fov*, a realização do tratamento das sementes de algodoeiro com fungicida para melhorar o estande inicial das plantas e eliminar possíveis efeitos não controlados devido à presença de outros patógenos, ou

Universidade Estadual da Paraíba/Departamento de Biologia

mesmo *Fov*, nas sementes, os quais poderiam mascarar os resultados dos testes de reação.

### 5.5 Reação de genótipos de algodoeiro à *Fov*

Houve diferença significativa para a variável AACPD entre os genótipos testados. Houve correlação ( $r_s = -0,83$ ), significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os métodos de avaliação via AACPD e FWRR. O valor negativo da correlação deve-se ao fato de que quanto maior o valor de AACPD menor é o valor do FWRR. Os genótipos Auburn 56, M-315 e Delta Opal apresentaram maior resistência quando comparados aos genótipos BRS 286, Acala 44 e Deltapine 744 em relação à variável AACPD. Considerando o FWRR, apenas as cultivares Acala 44 e BRS 286 foram consideradas suscetíveis, enquanto os demais genótipos foram considerados moderadamente resistentes (Tabela 5).

Tabela 5. Reação de genótipos de algodoeiro à murcha-de-fusário utilizando o método de inoculação de “chaff-grain” e avaliados por meio da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e do ranking de resistência a murcha-de-fusário (FWRR).

Genótipo	AACPD*		FWRR	
Delta Opal	820,78	a	4,10	MR
Auburn 56	868,82	a	3,71	MR
M 315	964,89	a	3,20	MR
BRS 286	1049,45	b	2,25	AS
Deltapine 744	1089,63	b	3,23	MR
Acala 44	1154,05	b	1,29	AS
			$r_s$	0,83**

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5 % de probabilidade; \*\* Significativo a 5 % de probabilidade pelo test *t*.

Com exceção da cultivar BRS 286, desenvolvida no Brasil, as demais cultivares utilizadas nesse estudo foram desenvolvidas no Estados Unidos onde predominam as raças 1 e 2 e mais recentemente a raça 4 de *Fov* (DAVIS *et al.*,

2006). Dessa forma, o fato de nenhuma das cultivares ter apresentado níveis resistência considerados elevados pode, em parte, ser explicado pelas diferenças quanto à agressividade das diferentes raças do patógeno para as quais essas cultivares foram desenvolvidas, uma vez que, no Brasil, supostamente só existe a raça 6 de *Fov* (DAVIS *et al.*, 2006).

A cultivar Deltapine 744 considerada um padrão de suscetibilidade (R. M. DAVIS, 2011, Comunicação Pessoal), e pela metodologia de avaliação da AACPD comportou-se como tal. Entretanto, considerando a metodologia do VBI (índice de escurecimento vascular), a mesma foi classificada como moderadamente resistente. A explicação para a discrepância em relação a esse genótipo entre as metodologias utilizadas é a de que a maioria das plantas receberam nota 3 em ambas as escalas, porém diferentemente da escala de VBI, que possui 11 níveis, sendo a nota 3 correspondente a plantas com descoloração vascular acima da região do cotilédone – o que na prática corresponderia a plantas severamente afetadas –, a escala utilizada para determinação da AACPD, possui apenas 5 níveis, sendo a nota 3 correspondente a plantas com severa redução do crescimento e abscisão foliar. Dessa forma apesar das plantas estarem severamente afetadas pela doença, o número de plantas mortas foi reduzido, e a escala de VBI, que prioriza, em seus níveis mais elevados, a ocorrência de plantas mortas (notas 5 a 10), permitiu a diferenciação desse genótipo em relação aos que apresentaram maior número de plantas mortas, enquanto a metodologia de avaliação pela AACPD, apesar de também considerar plantas mortas (nota 4), a velocidade com que esse estágio é atingido não é levado em consideração e fica diluído ao longo do processo de avaliação.

Com base nos resultados aqui obtidos, o método de “chaff-grain” mostrou-se eficaz na distinção de genótipos de algodoeiro quanto à infecção por *Fov*. A metodologia de avaliação por meio da AACPD, calculada a partir da atribuição das notas da escala descritivo-diagramática é facilmente empregada e possui alta correlação com o método FWRR de avaliação da resistência.

## 6 CONCLUSÕES

---

- Os isolados de *Fov* testados apresentaram variação quanto à agressividade.
- Houve diferença em relação ao progresso da murcha-de-fusário em relação à concentração de inóculo incorporado ao substrato de cultivo.
- A idade de transplântio das plântulas influenciou no progresso da doença, sendo que plantas mais jovens expressaram os sintomas de forma mais rápida e intensa.
- O tratamento químico das sementes não reduziu o progresso da doença nas condições em que o estudo foi conduzido.
- O método de inoculação testado foi eficaz em discriminar a resistência de genótipos de algodoeiro à *Fov*.
- O método de avaliação testado neste estudo foi correlacionado com o método FWRR empregado na avaliação da resistência de genótipos de algodoeiro a infecção por *Fov*.

## REFERÊNCIAS

ABRAPA. **Associação Brasileira dos Produtores de Algodão**. Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 13 de Abril de 2012.

AMARAL, E. Novo índice de intensidade de infecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.4, n.2, p.1-2. 1969.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. A new race (race 6) of cotton-wilt *Fusarium* from Brasil. **Plant Disease Report**, v. 62, p. 421-423. 1978.

ATKINSON, G. F. Some diseases of cotton. Alabama **Agric. Exp. Station Bull.**, v.41, n.3, p.3-65, 1892.

BELTRÃO, N. E. M. B.; AZEVEDO, D. M. P. de. **O agronegócio do algodão no Brasil**, Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, v.2, 2ª ed. rev. & ampl. 2008. p.14-15.

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**, Brasília, v.35, p.241-244, 2010.

BIBANCO, K. R. P.; NUNES, M.P.; CIA, E.; PIZZINATTO, M. A.; SCHUSTER, I.; MEHTA, Y. R. Identification of genetic variability among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* of cotton. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p.241-244, 2010.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O.; JUNIOR, P. V.; LEITE, S. F. **Cadeia produtiva do algodão/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura**, Brasília: IICA: MAPA/SPA, v.4, p.121-123, 1970.

BUGBEE, W. M. Vascular response of cotton to infection by *Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum*. **Phytopathology**. v.60, p.121-123, 1970.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York City: John Wiley & Sons, 1990.

CIA, E.; FUZATTO, M. G.; CHIAVEGATO, E. J.; DUDIENAS, C.; GRIDI-PAPP, I. L.; CAMARGO, A. P.; FILHO, O. P.; SOAVE, J. Tentativa de infestação artificial do solo com *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* em condições de campo. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.2, p. 261-267, 1991.

CIA, E.; SALGADO, C. L. **Doenças do algodoeiro**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds). Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 3ª ed. 1995-1997. P.40-55.

CONAB. **Décimo Primeiro levantamento da safra 2010/2011: Março-2012**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_03\\_08\\_10\\_37\\_20\\_boletim\\_marco\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_08_10_37_20_boletim_marco_2012.pdf)>. Acesso em: 13 de Abril de 2012.

COSTA, R.V.S. da. **Avaliação de genótipos de mamoneira quanto a resistência à *Fusarium oxysporum f. sp. ricini*, agente causal da murcha-de-fusário**. 2012. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual da Paraíba, Lagoa Seca, 2012.

COUTO, E. F.; COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D.; COELHO, R. S. B. Avaliação de métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* (Atk.) Snyder e Hansen em genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39., 2006, Salvador. **Resumos...** Salvador: 2006. P. S 141 (Suplemento).

COYLER, P. D. **2001 Current Status of *Fusarium* Wilt in the United States and Future Challenges**. 2007.

CZERMAINSKI, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n.9, p.1545-1555. 1999.

DAVIS, R. M.; COLYER P. D.; ROTHROCK, C. S; KOCHMAN, J. K. *Fusarium* wilt of cotton: Population, Diversity and Implications for Management. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p.692-703, 2006.

FUZATTO, M. G.; CIA, E.; CHIAVEGATO, E. J. Estabilidade da produção de genótipos de algodoeiro em face da ocorrência de doenças e nematoides. **Bragantia**. v.53, n.1, p.47-52, 1994.

JULIATTI, F. C.; RUANO, O. **Controle de doenças causadas por fungos e bactérias**. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. Controle de doenças de plantas. Grandes Culturas. V.2. UFV. Departamento de Fitopatologia, Brasília, Distrito Federal: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997, p.555-570.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

MACHADO, L. P. MICHEREFF, S. J.; FALLEIRO, B. A. S.; OLIVEIRA, M. G.; COUTINHO, W. M.; MORELLO C. L.; SUASSUNA N. D. Um método simples e rápido de seleção para resistência à murcha-de-fusário em genótipos de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**. Lavras, v. 34, n.1, p.51-55, 2009.

MACHADO, L. P. **Seleção para resistência à murcha-de-fusário em genótipos de algodoeiro**. Recife, PE, 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**. v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Inoculação Artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 23, nº 2, p. 95-101, 2001.

MCFADDEN H, BEASLEY D, BRUBAKER C. L, 2004. Assessment of *Gossypium sturtianum* and *G. australe* as potential sources of *Fusarium* wilt resistance to cotton. **Euphytica** 138, 61–72.I., 2004.

RUANO, O. **Resistência do algodoeiro (*Gossypium spp.*) a *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* (ATK) Snyder e Hansen e a associação desses organismos**. 1984. 19f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

SILVA, V. A. S.; JULIATT, F. C.; JULIATT, F. C. Estudo preliminar da variabilidade de *Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum* em *Gossypium hirsutum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 1, p. 1-6, 2007.

SOARES, D. J.; CURVÊLO, C. R. S.; ARAÚJO, A. E.; PEREIRA, O. L.; COUTINHO, W. M. **Patologia de sementes de algodoeiro**. In: LUZ, W. C. (Ed.) Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.20, p.1-41, 2012.

SOUSA, M. V.; MACHADO, J. C.; PFENNING, L. H.; KAWASAKI, V. H.; ARAÚJO, D. V.; SILVA, A. A.; NETO, A. M. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**. v. 33, n.1, p.41-48, 2008.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. **Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro**. In: FREIRE, E. C (Ed.) Algodão no cerrado brasileiro. Brasília: ABRAPA. 2007. p.479-521.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M.; MORELLO, C. L. **Resistência genética do algodoeiro a doenças**. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. (Eds). O Universidade Estadual da Paraíba/Departamento de Biologia

Agronegócio do Algodão no Brasil. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, v. 1, 2ª ed. rev. & ampl. 2008a. p. 327-339.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M.; CHITARRA, L. G. **Manejo de doenças do algodoeiro**. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. (Eds). O Agronegócio do Algodão no Brasil. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, v. 2, 2ª ed. rev. & ampl. 2008b. p. 983-1032.

ULLOA, M.; HUTMACHER, R. B.; DAVIS, R. M.; WRIGHT, S. D.; PERCY, R.; MARSH, B. Breeding for *Fusarium* Wilt Race 4 Resistance in Cotton under Field and Greenhouse Conditions. **The Journal of Cotton Science**, v. 10, p. 114–127, 2006.