

Influência da porcentagem de areia no solo e *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood sôbre a incidência de murcha de algodoeiro causada por *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (Atk) Snyder e Hansen¹

C. SALGADO²
E. CIA²
E. BALMER³
A. R. MONTEIRO⁴
C. P. DE ABREU⁵

-
- 1 — Trabalho realizado com o auxílio da Agência Norte-Americana para o desenvolvimento Internacional (USAID), da Fundação Rockefeller e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
2 — Bolsistas da Agência Norte-americana, para o desenvolvimento Internacional; 3 — Cadeira de Fitopatologia da E.S.A. "Luiz de Queiroz"; 4 — Cadeira de Zoologia da E.S.A. "Luiz de Queiroz" e 5 — Cadeira de Matemática e Estatística da E.S.A. "Luiz de Queiroz".

RESUMO

O presente trabalho teve por finalidade estudar o efeito das diferentes porcentagens de areia, em substratos artificiais sôbre a severidade de murcha do algodoeiro.

Para êste fim foram utilizados substratos artificiais com quantidades variáveis de areia. Como inóculo foram utilizados suspensões de *Meloidogyne*, *Fusarium* e *Fusarium* mais *Meloidogyne*.

Os três inóculos foram testados em duas variedades de algodão. Os resultados obtidos com a variedade RM2 no 1.º ensaio mostraram uma maior incidência de murcha nos substratos com maior porcentagem de areia, isto é, 90% e 60%. Quanto ao inóculo utilizado, a maior incidência da doença ocorreu nos tratamentos que receberam inoculação conjunta de *Fusarium* mais *Meloidogyne*.

No segundo ensaio, utilizando-se a variedade RM4 não foram obtidos dados que mostrassem diferenças significativas entre substratos. Isto provavelmente se deve a um aumento no potencial de inóculo e uma melhor distribuição do mesmo. No entanto, houve uma diferença significativa para os tipos de inóculo utilizados, sendo que a maior severidade de doença ocorreu quando o inóculo era constituído de fungo e de nematóide, seguindo-se o tratamento cujo inóculo era constituído só de fungo

No ensaio feito com variedade RM4 foi obtida significância para a interação tipos de inóculo versus substratos. A interação mostrou que o inóculo constituído só de *Fusarium* comportou-se diferentemente nos diferentes tipos de substratos utilizados. Tendo a maior severidade da doença ocorrido no substrato contendo a maior porcentagem de areia. No entanto, não houve diferenças significativas para a severidade da doença causada pelo inóculo constituído do fungo mais nematóides nos diferentes substratos, o que mostra efeito do inóculo de *Meloidogyne* sôbre o inóculo em potencial de *Fusarium*.

Os diferentes tipos de inóculo comportaram-se de modo diferentes nos substratos de terra roxa, e nos substratos contendo 60% e 90% de areia, sendo que a maior coloração dos vasos foi obtida nos tratamentos que receberam os inóculos de *Fusarium* e *Fusarium* mais *Meloidogyne*.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho teve como finalidade o estudo da influência da quantidade de areia nos substratos artificiais sobre a incidência de murcha de algodoeiro causada por inóculos constituídos só de *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* e da inoculação conjunta de *Fusarium* mais Nematóides do gênero *Meloidogyne*. A murcha de algodoeiro causada pelo complexo *Fusarium* mais *Meloidogyne* pode ser considerada como a doença que nos últimos tempos causou os maiores prejuízos à lavoura algodoeira principalmente na zona da Sorocabana. A melhor compreensão dos fatores que regem a ocorrência e severidade da doença é de grande valor para os técnicos responsáveis pela criação das variedades resistentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a composição dos diferentes substratos artificiais foi utilizada areia de rio, com partículas de diâmetro inferior ou igual a 0,5 mm, sendo esta misturada em proporções diferentes com terra roxa que continha 81% de argila e 19% de areia. A areia utilizada foi classificada em média e fina segundo o trabalho de BALMER e colaboradores (1965), no qual estudaram os fatores físicos do solo influenciando a incidência de murcha do algodoeiro. A areia foi misturada em diferentes proporções com a terra roxa para a obtenção dos diferentes substratos artificiais, como mostra o quadro I.

Neste experimento foi utilizado um isolamento de *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* proveniente de planta de algodoeiro da região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. Este fungo é encontrado na micoteca da Seção de Fitopatologia sob código PPA1H.

Para a obtenção do inóculo foi utilizado o meio usado por Armstrong (1948) com modificações no teor de Nitrato de cálcio para 0,015 M e utilização do açúcar comum (sacrose) como fonte de carbono.

QUADRO I — Composição dos tipos de substratos artificiais e tipos de inóculo utilizados nos ensaios.

n.º trat.	tipos de substratos	tipos de inóculo	% de areia	% de limo + argila
01	terra roxa	Meloidogyne	19	81
02	terra roxa	Fusarium	19	81
03	terra roxa	Fusarium + Meloidogyne	19	81
04	terra roxa + areia média e fina	Meloidogyne	30	70
05	terra roxa + areia média e fina	Fusarium	30	70
06	Terra roxa + areia média e fina.	Fusarium + Meloidogyne	30	70
07	Terra roxa + areia média e fina.	Meloidogyne	60	40
08	idem,	Fusarium	60	40
09	idem,	Fusarium + Meloidogyne	60	40
10	idem,	Meloidogyne	90	10
11	idem,	Fusarium	90	10
12	idem,	Fusarium + Meloidogyne	90	10

Um pequeno disco de meio sólido de MARTIN modificado usado por WENSLEY e Mc KEEN (1962) contendo o crescimento do fungo foi colocado em um recipiente contendo 1,1 litro de solução nutritiva, e deixado à temperatura ambiente por 3 dias. Durante o período de obtenção do inóculo o frasco contendo o crescimento do fungo foi agitado 3 vezes por dia. Findo este prazo, o inóculo foi transferido para vasos contendo o substrato previamente molhado, nos quais havia sido feita uma depressão, pressionando-se a boca de um funil invertido contra substrato. O inóculo foi colocado na razão de 250 ml na depressão feita no substrato de cada vaso

A população de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood, utilizada no experimento foi obtida cultivando-se tomateiro da variedade Santa Cruz, em solo de campo de algodão infestado com nematóides.

De raízes de tomateiro com galhas foram obtidas 35 ootecas que foram colocadas em 1 ml de água destilada, à qual foram adicionados 2 ml de QBoa, solução comercial de

hipoclorito de sódio, contendo 5% de cloro ativo. O material foi agitado até a dissolução completa da matriz gelatinosa. Liberados todos os ovos das ootecas foram adicionados 350 ml de água destilada à solução acima mencionada. A transferência do inóculo de nematóides para o substrato foi feita tomando-se 10 ml de suspensão de ovos de nematóides e regando com eles a depressão no substrato, na mesma ocasião em que o inóculo do fungo foi transferido para os diferentes substratos .

Para o primeiro experimento foi utilizada a variedade RM2 sendo plantadas de 15 a 20 sementes, previamente deslindadas com ácido sulfúrico comercial, na depressão circular feita em cada vaso. Em seguida, as sementes foram cobertas com o substrato de cada tratamento. Após a germinação o número de plantas em cada caso foi reduzido para 10.

No segundo experimento foram utilizadas sementes da variedade RM4, tratadas e plantadas 2 meses após a colheita do primeiro ensaio do mesmo modo que as sementes da variedade RM2.

Os vasos utilizados nos ensaios continham um volume de aproximadamente 3,5 litros de substrato sendo os vasos e o substrato autoclavados separadamente a 1 atmosfera durante 2 horas para o 1.º ensaio.

Uma vez por semana foi colocada em cada tratamento aproximadamente 400 ml da solução de elementos nutritivos para plantas. A formulação usada foi a solução nutritiva comercial recomendada por MALAVOLTA (1964) não tendo sido usados os sulfatos de cálcio e manganês. A composição da solução é dada no Quadro II.

Os ensaios foram feitos em casa de vegetação procurando-se manter a temperatura na faixa de 25°C-32°C. Para diminuir os possíveis efeitos ambientais foi feito um rodízio sistemático, na posição dos vasos.

QUADRO II — Fórmula utilizada para irrigação das plantas em vasos.

Os números se referem a quantidade em gramas por 1000 l d'água			
Nitrato de Potássio-KNO ₃	1.200	Citrato férrico amoniacal	80
Sulfato de Magnésio-MgSO ₄	550	Ácido bórico	1,03
Superfosfato triplo-Ca(H ₂ PO ₄) ₂	350	Sulfato de Cobre-CuSO ₄	0,025
Sulfato de Amônio-(NH ₄) ₂ SO ₄	150	Sulfato de Zinco-ZnSO ₄	0,050

Nêstes experimentos procurou-se estudar o efeito dos diferentes substratos sôbre a severidade da doença, causada por 3 tipos de inoculações, feitas sômente para o primeiro ensaio, sendo o inóculo dêste aproveitado para o 2.º ensaio. Os 3 tipos de inoculações foram os seguintes: 1 — tratamentos recebendo só inóculo de *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*; 2 — tratamentos recebendo inóculo só de *Meloidogyne incognita* e o 3.º tratamento recebendo ambos os inóculos. O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos ao acaso com 4 repetições. Foi também incluído no teste uma testemunha para cada tratamento com a finalidade de ter-se um noção da possível contaminação no ensaio.

A análise da variância foi feita baseando-se no índice médio de alteração de côr dos vasos lenhosos, transformado em porcentagem e posteriormente a arco-seno.

O índice de coloração dos vasos lenhosos foi obtidos artibuido-se uma nota a cada planta do vaso. As notas variavam de zero (0) a seis (6). A nota zero era dada às plantas sem coloração no sistema vascular. Quando só a raiz apresentava coloração dos vasos era dada a nota um (1). As notas 2, 3, 4 e 5 foram dadas respectivamente às plantas cuja coloração dos vasos lenhosos atingiu a altura das fôlhas cotiledonares, primeira, segunda e terceira fôlhas verdadeiras. A nota 6 foi atribuída às plantas mortas.

RESULTADOS

Os resultados para o primeiro ensaio usando a variedade RM2 são apresentados no Quadro III.

QUADRO III — Índices médios para a coloração do sistema vascular, obtidos no 1.º ensaio, para a variedade RM2.

N.º Trat.	1.ª Rep.	2.ª Rep.	3.ª Rep.	4.ª Rep.
01	2	1	4	3
02	11	8	4	8
03	44	12	40	27
04	3	11	6	0
05	8	10	4	14
06	37	35	30	38
07	1	15	18	8
08	7	13	10	17
09	47	52	48	42
10	7	4	2	7
11	14	27	12	13
12	53	46	52	39

A análise da variância para o primeiro ensaio é apresentada no Quadro IV.

QUADRO IV — Análise da variância para o primeiro ensaio com a variedade RM2 baseada no índice de coloração dos vasos lenhosos das plantas.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetições	3	121,73	40,57	0,60
Tipo substrato (S)	3	1.086,79	362,26	5,59**
Tipo inóculo (I)	2	13.025,40	6.512,70	97,7**
Interação SxI	6	181,77	30,29	0,45
Resíduo	33	2.195,37	66,52	
Total	47	16.611,06		

A análise da variância para o primeiro ensaio acusou diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade para os diferentes tipos de substrato e diferentes tipos de inóculo.

As médias para os substratos de terra roxa, terra roxa mais 30%, 60% e 90% de areia foram respectivamente: 25,90; 28,76; 37,22; 35,95; e as médias para inóculo de *Meloidogyne*, *Fusarium* e *Meloidogyne* mais *Fusarium* respectivamente 16,21; 25,07 e 54,09. O teste de Tuckey revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade para o inóculo constituído de *Fusarium* + *Meloidogyne* e os outros dois tipos de inóculo constituídos de *Fusarium* e *Meloidogyne* separadamente. Não houve diferenças significativas entre estes dois últimos tipos de inóculo ao nível de 1%, porém houve diferença ao nível de 5% para os tratamentos em questão.

A coloração dos vasos foi menor para os tratamentos que só receberam inóculo constituído de *Meloidogyne*, seguido dos tratamentos que receberam só *Fusarium* e o mais alto índice foi obtido no tratamento resultante da associação *Fusarium* + *Meloidogyne*.

Estudando-se o efeito do substrato sobre a severidade de murcha, determinada pela coloração dos vasos, o Teste de Tuckey mostrou que a maior severidade da doença ocorreu nos substratos contendo 90 e 60% de areia os quais não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A menor incidência da doença ocorreu no substrato contendo terra roxa o qual diferiu significativamente ao nível de 5% de probabilidade da incidência de murcha dos substratos contendo 90% e 60% de areia, sendo que a incidência da doença na terra roxa não diferia dos tratamentos contendo 30% de areia.

Os dados obtidos no segundo experimento, quando foi utilizada a variedade RM4, são apresentados no Quadro V.

QUADRO V — Índices médios para a coloração do sistema vascular. obtidos no 2.º ensaio, para a variedade RM4.

N.º trat.	1.ª Rep.	2.ª Rep.	3.ª Rep.	4.ª Rep.
01	0	0	0	0
02	2	1	2	0
03	14	6	4	0
04	0	0	0	0
05	2	0	1	0
06	2	0	4	4
07	4	0	0	0
08	2	1	1	1
09	2	7	5	9
10	2	0	0	0
11	8	9	4	8
12	2	6	5	0

A análise da variância para o segundo ensaio no qual foi utilizada a variedade RM4 é apresentada no Quadro VI.

QUADRO VI — Análise da variância do segundo ensaio, no qual foi utilizada a variedade RM4, para os índices de coloração dos vasos das plantas.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetição	3	214,09	71,36	2,10
Tipo inóculo (I)	3	194,03	64,67	1,90
Tipo substrato (S)	2	1.129,95	564,97	16,65**
Interação SxI	6	585,70	97,61	2,87
Resíduo	33	1.119,66	33,93	
Total	47	3.243,43		

A análise da variância revelou diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade para os diferentes tipos de inóculo. Ao nível de 1% de probabilidade a coloração dos vasos das plantas resistentes causadas pelo inóculo constituído por *Meloidogyne* diferiu significativamente da coloração dos vasos de plantas que receberam os outros tipos de

inóculo, isto é, só com fungo e fungo mais nematóide, sendo que estes últimos não diferiram entre si ao nível de 1% de probabilidade mas sim ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ensaio, a análise da variância revelou diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade para a interação inóculo x substrato. A análise da variância para as interações é apresentada nos Quadros VII e VIII.

QUADRO VII — Análise da variância para o segundo ensaio, para a verificação do efeito do inóculo dentro dos substratos.

Fontes de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Repetição	3	214,09	71,36	2,10
Tipo inóculo	2	1.129,95	564,97	16,65**
Efeito de <i>Fusarium</i> (F) d. de substratos	3	582,68	194,22	572
Efeito de <i>Meloidogyne</i> (M) d. de substratos	3	42,64	14,21	0,41
Efeito de M + F d. de substratos	3	154,38	51,46	1,51
Resíduo	33	1.119,69	33,93	
Total	47	3.243,43		

Análise da variância mostrou diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade para a incidência de murcha causada por *Fusarium* nos diferentes substratos utilizados. A maior incidência de murcha ocorreu no substrato contendo 90% de areia. Não houve diferenças significativas para a incidência de murcha causada pelo inóculo, constituído de *Fusarium* + *Meloidogyne* nos diferentes substratos.

QUADRO VIII — Análise da variância para o segundo ensaio, para verificação do substrato dentro dos inóculos.

Fonte de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Repetição	3	214,09	71,36	2,10
Tipo substrato	3	194,03	64,67	1,90
Efeito do substrato terra roxa d. de inóculos	2	484,84	242,42	7,14**
Efeito do substrato com 30% de areias d. de inóculos	2	203,46	101,73	2,99
Efeito do substrato com 60% de areia d. de inóculos	2	415,03	207,51	6,14**
Efeito do substrato com 90% de areia d. de inóculos	2	612,30	306,15	9,02**
Resíduo	33	1.119,68	33,93	
Total	47	3.243,43		

A análise da variância mostrou diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade para a incidência de murcha nos substratos constituídos de terra roxa, esta mais 60% e 90% de areia dentro dos diferentes inóculos.

DISCUSSÃO

No primeiro ensaio no qual foi usada a variedade RM2, com resistência moderada à murcha, a diferença obtida para os diferentes substratos mostra que a maior incidência da doença ocorreu, considerando-se todos os tipos de inoculação, nos substratos contendo 90% e 60% de areia, enquanto que a menor incidência ocorreu nos substratos de terra roxa e aquela contendo 30% de areia. De modo geral os resultados obtidos mostram mesma tendência que aqueles obtidos por BALMER e colaboradores (1965).

A maior incidência de murcha foi obtida utilizando-se o inóculo constituído de *Fusarium* + *Meloidogyne*. A incidência da doença causada por este inóculo diferiu da incidência de doença causada pelos outros inóculos usados. O índice de coloração dos vasos das plantas nos tratamentos que receberam inóculo constituído só de *Meloidogyne* foi o mais baixo de todos os tratamentos, ficando o escurecimento confinado na maioria das vezes a tecidos da raiz. É pouco provável que os nematóides causem uma coloração dos tecidos da raiz, o que pode ser atribuído a outros organismos contaminantes do solo ou mesmo a uma pequena contaminação entre os tratamentos.

No segundo ensaio, no qual foi utilizada a variedade RM4, resistente a murcha, a análise da variância revelou diferenças significativas entre tratamentos ao nível de 1% para tipos de inóculo o que já havia ocorrido no primeiro ensaio. A maior severidade da doença ocorreu nos tratamentos que receberam o inóculo constituído do fungo mais nematóides, o qual diferiu ao nível de 5% de probabilidade do tratamento cujo inóculo era constituído só do fungo. Este fato parece estar de acôrdo com estudos feitos por SMITH e DICK (1960), que mencionam o fato de que a expressão de resistência do algodoeiro a *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* pode ser mascarada pela presença de nematóides. É interessante ressaltar que apesar da variedade RM4 ter sido plantada nos vasos contendo os mesmos substratos utilizados para o primeiro ensaio, somente 2 parcelas

que continham o tratamento constituído só de *Meloidogyne* apresentavam algumas plantas com coloração nos vasos. Neste ensaio não houve efeito significativo para tipos de substratos. Fato idêntico foi observado por BALMER e colaboradores (1965) que procuraram justificar o acontecido lançando a hipótese de que, após um período mais longo desde a inoculação do solo, e com uma quantidade razoável de raízes que permaneceram no substrato e melhor distribuído, mudaria o efeito obtido no primeiro ensaio para tipos de substratos.

A significância obtida para interação entre inóculo e substrato revelou que a severidade da doença quando causada só por *Fusarium* foi diferente nos diferentes substratos. A maior severidade foi obtida no substrato contendo 90% de areia. Por outro lado é interessante observar-se que para o inóculo constituído de fungo mais nematóides não houve diferenças significativas que pudessem ser atribuídas a interações, o que vem dar mais ênfase a importância dos nematóides na incidência de murcha do algodoeiro.

A análise da variância mostrou diferenças significativas para a severidade de doença nos substratos de terra roxa, terra roxa mais 60% e 90% de areia dentro dos inóculos. A significância destes dados mostra que os diferentes inóculos comportam-se de modo diferente dentro dos substratos mencionados. A maior quantidade de descoloração dos vasos sempre resultou dos inóculos constituídos de *Fusarium* e *Fusarium* mais *Meloidogyne*.

CONCLUSÕES

A maior severidade da doença, medida em termos de coloração dos vasos das plantas e plantas mortas, ocorreu nos tratamentos nos quais o inóculo foi constituído de fungo e nematóides, vindo em seguida o inóculo constituído só de fungo. A doença também ocorreu com maior severidade nos substratos com maior porcentagem de areia, considerando-se todos os tipos de inóculo, o que sugere que uma alta porcentagem de areia favoreça as relações patógeno hospedeiro no início, provavelmente devido a uma melhor disseminação do patógeno. Com o tempo, este efeito não é mais notado.

O inóculo só de *Fusarium* no segundo experimento causou diferentes graus de severidade da doença nos diferentes substratos, sendo a maior incidência de murcha obtida no substrato contendo maior porcentagem de areia. Inóculo constituído de *Fusarium* e *Meloidogyne* não causou diferentes graus de doença em diferentes substratos. Isto sugere que o efeito do inóculo de *Fusarium* pode ser aumentado em presença de nematóides do gênero *Meloidogyne*.

Nos substratos de terra roxa, 60% e 90% de areia os 3 tipos de inóculo se comportaram de modo diferente sendo a maior intensidade de coloração dos vasos obtida para os tratamentos que receberam os inóculos constituídos de *Fusarium* + *Meloidogyne* e só *Fusarium*.

SUMMARY

The cotton wilt incidence caused by Fusarium oxysporum f. vasinfectum separate and mixed with Meloidogyne incognita, was studied on artificial substrates containing different sand percentages.

When a susceptible cotton variety was used the highest wilt incidence occurred in the substrates containing 60 and 90 percent sand. The inoculum that caused the highest amount of wilt was the mixture of Nematodes and Fusarium.

When a resistant variety was used no differences in wilt incidence were observed that could be attributed to differences in sand percentage of the different substrates. Again the highest wilt incidence was obtained with the inoculum consisting of the mixture of nematodes and Fusarium. The inoculum versus substrate interection showed that the incidence of wilt caused by the inoculum consisting only of Fusarium was highest in the substrate containing 90% sand. On the other hand the inoculum of Nematodes and Fusarium caused about the same amount of wilt in the different substrates. This shows the importance of the nematodes on the Fusarium inoculum.

The interection also showed that the differences in wilt incidence caused by the different inocula was different in the same substrates, with the exception of the substrate containing 30% sand.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ARMSTRONG, G. M. e J. K. ARMSTRONG, 1948 — Monsusceptible Hosts as carriers of Wilt Fusaria — *Phytopathology* 38:808-826.
- ARMSTRONG, J. K. e G. M. ARMSTRONG, 1958 — A Race of the Cotton-Wilt *Fusarium* Causing Wilt of Yebredo Soybean and Flue-Cured Tobacco. *Plant Disease Reporter* — Vol. 42, n.º 1:147-151.
- BALMER, E. e colaboradores, 1965 — Contribuição ao estudo da influência dos fatores físicos do Solo, sobre a incidência da murcha do algodoeiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (ATK) Snyder e Hansen. *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"*. Vol. XXII: 247-258.
- MALAVOLTA, E. e H. P. HAAG, 1964 — Ensaio com solução nutritiva. Curso Internacional de Diagnose Foliar. IICA. E.S.A.Q. Piracicaba — São Paulo.
- SMITH, A. L. e J. B. DICK, 1960 — Inheritance of Resistance to *Fusarium* wilt in Upland and Sea Island Cottons as Complicated by Nematodes under field conditions. *Phytopathology*. Vol. 50, n.º 1:44-48.
- WENSLEY, R. N. e C. D. McKEEN, 1962 — A Soil Suspension-plating Method of Estimating Populations of *Fusarium oxysporum* f. *melonis* in Muskmelon Wilt Soils. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 8:57-64.

