

III. FITOSSANIDADE

NOTA

TENTATIVA DE INFESTAÇÃO ARTIFICIAL DO SOLO COM *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *VASINFECTUM* EM CONDIÇÕES DE CAMPO (1)

EDIVALDO CIA (2,5), MILTON GERALDO FUZATTO (2), EDERALDO JOSÉ
CHIAVEGATO (2), CHRISTINA DUDIENAS (3), IMRE LAJOS GRIDI-PAPP (2,5),
ANTONIO PEREIRA DE CAMARGO (4,5), OSVALDO PARADELA FILHO (3,5)
e JACIRO SOAVE (3,5)

RESUMO

Com o objetivo de estabelecer um campo experimental para trabalhos de melhoramento genético do algodoeiro para resistência à marcha de *Fusarium*, uma gleba de aproximadamente 8.000m² foi plantada com cultivar suscetível e inoculada artificialmente, durante sete anos seguidos. Avaliada mediante sintomas externos e internos típicos, a incidência da doença, mesmo após as 14 inoculações, mostrou-se fraca e insatisfatória para os fins visados. Entre as possíveis causas do insucesso são discutidas as condições climáticas, a textura do solo, os métodos de inoculação, a eventual supressividade do solo para *Fusarium* e a ausência de interação fungo + nematóides.

Termos de indexação: algodoeiro, marcha-de-*Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), infestação artificial.

ABSTRACT

A TRIAL TO ESTABLISH ARTIFICIAL SOIL INFESTATION WITH *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *VASINFECTUM* UNDER FIELD CONDITIONS

In order to establish an experimental breeding field for *Fusarium* wilt resistance, in cotton, an area of about 8,000m² was artificially inoculated with the pathogen twice during the crop season. A total of 14 inoculations was performed along the 7 consecutive years of experimentation. However, taking into account the typical external and internal symptoms exhibited by the plants, the incidence of the diseases was considered low and unsatisfactory, as the final purposes are concerned. The possible causes of the unsuccess, such as climatic conditions, soil texture, method of inoculation, suppressiveness of the soil to *Fusarium* and absence of *Fusarium* x nematodes interaction, are discussed.

Index terms: cotton, *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), artificial infestation.

(1) Recebido para publicação em 15 de fevereiro e aceito em 9 de maio de 1991.

(2) Seção de Algodão, Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 28, 13001 Campinas (SP).

(3) Seção de Fitopatologia, IAC.

(4) Estação Experimental de Piracicaba, IAC.

(5) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

Desde que a murcha-de-*Fusarium* foi constatada em lavouras de algodoeiro no Estado de São Paulo, em 1957, tornou-se obrigatória a presença de resistência genética ao patógeno nos cultivares liberados para plantio. Para isso, trabalhos de seleção e de teste de todos os materiais genéticos obtidos têm sido efetuados pelo Instituto Agronômico de Campinas, em condições de campo, utilizando glebas com infestação natural do fungo, localizadas em propriedades particulares nas regiões de ocorrência da doença. Todavia, diversos fatores têm dificultado o uso de tais áreas, entre eles a diminuição da cotonicultura nas regiões de maior infestação; o predomínio, nestas, de culturas itinerantes, feitas por arrendatários, em esquema de reforma de pastagens; a diminuição do potencial de inóculo, com uso de cultivares resistentes; a dificuldade de se manter uniformidade de infestação em tais glebas, em se tratando de propriedades particulares, uma vez que isso demandaria dividi-las para plantio de material suscetível em uma das partes, promovendo-se, então, um rodízio anual do experimento; a dificuldade, enfim, da utilização de tais glebas por muito tempo, sobretudo, como é comum, quando o proprietário não mais se dedica à cultura do algodão. A exigência de que os trabalhos de melhoramento genético considerem prioritariamente essa doença, e os fatores apontados, que dificultam a localização e manutenção de áreas propícias ao seu estudo, induziram à realização do presente trabalho, objetivando infestar com o patógeno uma área localizada em uma Estação Experimental do Instituto Agronômico.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado durante sete anos, em 1978-84, na Estação Experimental de Piracicaba, em uma área de aproximadamente 8.000m², a uma altitude de cerca de 570m em um latossolo vermelho-amarelo distrófico, textura argilosa. No período considerado, a precipitação pluvial média anual foi de 1.394mm e a temperatura do ar foi de 27,9, 20,2 e 15,4°C, respectivamente, para as médias das máximas, das médias e das mínimas.

Em cada ano, realizaram-se duas inoculações: a primeira no sulco de plantio, imediatamente antes de este ser efetuado, e a outra aos 20-25 dias após a emergência das plantas. No primeiro caso, o terreno era preparado para plantio, com sulcos de cerca de 10cm de profundidade, no espaçamento de 80cm. Nesses sulcos, era aplicado o inóculo, efetuando-se, logo a seguir, a adubação e a semeadura conjugadas, com plantadeira de tração animal. Desse modo, procurava-se evitar que o inóculo permanecesse muito tempo exposto ao sol, na superfície do solo. Na segunda inoculação, a aplicação era feita no colo das plantas, atingindo também um sulco previamente aberto com um cultivador, lateralmente e próximo às plantas, de modo a expor e ferir as raízes. De modo geral, tal operação foi realizada quando o solo se encontrava úmido.

Para preparo do inóculo, o fungo foi cultivado em meio líquido de batata-dextrose, utilizando-se dez isolados provenientes de diferentes regiões paulistas onde

a doença ocorre. Para cada recipiente contendo 3 litros do meio de cultura, repicaram-se seis discos de 0,5cm de diâmetro, com micélio retirado de uma cultura do fungo em batata-dextrose-ágar (B.D.A), com sete dias de idade. Os frascos eram agitados três vezes ao dia e permaneciam em ambiente de laboratório por dez dias. No dia da inoculação, seu conteúdo era homogeneizado em liquidificador e filtrado em gaze medicinal. Preparavam-se, assim, em laboratório, cerca de 50 litros de suspensão de esporos, que, diluídos em água, na proporção de 1:1, resultavam em cerca de 100 litros da suspensão usada para inoculação. Desse modo, a concentração final do inóculo era de aproximadamente 10^4 conídios/mililitro de água.

No primeiro e nos últimos dois anos, o inóculo, da forma descrita, foi aplicado por meio de um pulverizador costal manual, dotado de um bico do tipo cônico, com vazão aproximada de 150litros/hectare. Nos outros quatro anos, além da suspensão de conídios obtida em laboratório, acrescentava-se solo contaminado com o fungo e com nematóides, proveniente de glebas com alta incidência desses parasitas. Nesse caso, cerca de 30kg de solo e 2,5 litros de suspensão concentrada de esporos e micélio do fungo eram diluídos em 60 litros de água e o inóculo, assim obtido, aplicado por meio de regadores, na base de 0,3 litro por metro linear de sulco.

Em todos os anos, utilizou-se para plantio uma mistura de sementes de cultivares suscetíveis ao patógeno. Visando contribuir para aumento da infestação, após a colheita as plantas eram roçadas e os restos, incorporados ao solo, mediante gradagem.

Dois tipos de avaliação dos resultados foram adotados. No primeiro, a área era percorrida e, mediante exame visual, buscava-se detectar plantas que apresentassem os sintomas externos típicos da doença (perda de turgescência das folhas; áreas amareladas nestas, posteriormente necrosadas; seca das plantas), confirmando-os mediante exame interno dos caules. No outro, mais rigoroso, realizavam-se 20 amostragens ao acaso, em toda a área e, em cada uma delas, procedia-se ao corte do caule de 10 plantas para observação da presença de vasos escurecidos, o que constitui sintoma interno também característico da doença. Nesse caso, a observação de um único feixe vascular escurecido era suficiente para considerar a planta infectada. As avaliações, conforme descrito, foram feitas a partir do segundo ano, realizando-se o exame de sintomas externos na segunda inoculação e repetindo-o na colheita, quando se fazia o corte dos caules.

Resultados e Discussão

Do ponto de vista prático, considerando os objetivos do trabalho, entendeu-se que o critério mais eficiente para avaliar o sucesso da inoculação deveria levar em conta a ocorrência de plantas bem infectadas, exibindo sintomas externos da doença ou, pelo menos, quantidade apreciável de feixes vasculares escurecidos, facilmente observáveis mediante corte transversal dos caules. Plantas nessas

condições foram observadas a partir do segundo ano, mas em pequeno número e dispersas na área. Essa situação se manteve até o sétimo ano, sem indícios de aumento gradativo de plantas com tal nível de infecção. Na ocorrência mais numerosa, foram observadas 50 delas, em toda a área, o que representava cerca de 0,1% de plantas afetadas. A insuficiência de tal infestação pode ser constatada pela comparação com o que ocorre nas glebas naturalmente infestadas, nas quais os autores vêm desenvolvendo trabalhos com essa doença. Em tais áreas, quando se trata de material genético suscetível, é comum encontrar, logo aos 25-30 dias após a emergência, cerca de 50% das plantas com sintomas externos, algumas já mortas. Ao final do ciclo, a maioria delas se encontra morta ou definhada e mesmo nas mais resistentes é comum uma ocorrência de 20-30% de plantas com sintomas internos bem pronunciados, muitas também com os sinais externos da doença.

A avaliação mediante secção dos caules tampouco foi animadora, a despeito das seguintes médias de plantas com sintomas observados do segundo ao sétimo ano: 30; 31; 40; 62; 47 e 33%. De fato, esses números, aparentemente promissores, não têm implicação prática na medida em que, na maioria dos casos, os sintomas vasculares se limitaram a um único ponto escuro, nem sempre facilmente identificável e localizado na parte inferior, próximo ao colo das plantas. Tais condições são reveladoras de baixo nível de infecção, sobretudo com respeito à altura de penetração do fungo na planta (BALMER et al., 1965).

Admitindo o insucesso do projeto, tendo em vista os fins e, portanto, os níveis de infestação visados, é útil analisar possíveis explicações para a não-obtenção de resultados positivos. De início, pode-se descartar a hipótese de não-patogenicidade do inóculo, uma vez que, embora em nível geral incipiente, a doença ocorreu com alta intensidade em algumas plantas. Além disso, em condições de casa de vegetação, vários dos isolados mostraram alto grau de virulência.

Com respeito ao clima, as condições locais de chuva, sobretudo no período de desenvolvimento da cultura, não diferem das que ocorrem em regiões de alta incidência da doença, no oeste do Estado. Também quanto à temperatura, a diferença com relação às regiões mencionadas não é substancial e os dados observados no período da cultura situam-se dentro dos limites (25-32°C) apontados por KIMATI (1980) como satisfatórios para o desenvolvimento da doença.

Como mencionado, o solo em questão possui textura argilosa e é sabido que a doença tem sido observada com maior intensidade em solos arenosos (BROWN & WARE, 1958; RIDGWAY et al., 1984). Embora isso também seja observado em São Paulo, convém assinalar que neste Estado, assim como no Paraná e em Minas Gerais, a murcha de *Fusarium* tem ocorrido também em solos argilosos do tipo latossolo roxo. Essa possibilidade, aliás, foi demonstrada experimentalmente por BALMER et al. (1965). Ademais, a ocorrência da doença com a mesma intensidade, em vários tipos de solos com diferentes texturas, foi relatada por MINTON & MINTON (1966).

Ainda com respeito ao solo utilizado, poderia ser aventada a hipótese de que ele fosse supressivo para *Fusarium* (ALABOUVETTE et al., 1979; BAKER & COOK,

c1982), o que impediria o desenvolvimento da doença. Embora nenhum estudo relativo ao assunto tenha sido realizado, pode-se afirmar que esse tipo de solo não possui reação alcalina nem argila montmorilonita, características apontadas por esses autores como prováveis responsáveis pelas condições que favorecem essa propriedade, nos casos por eles relatados. A propósito, embora não se trate da mesma gleba, nesse tipo de solo e em outros da mesma formação geológica e com características físicas e químicas semelhantes, já foram observadas fortes incidências de murcha de *Fusarium* em tomateiro. Considerando que solos supressivos para um patótipo de *F. oxysporum* usualmente também o são para outros patótipos da mesma espécie (BAKER & COOK, c1982), e associando-se isto às características mencionadas da gleba, a hipótese de supressividade parece pouco sustentável.

Uma causa plausível poderia ser a ineficiência no método de inoculação. Com efeito, na primeira aplicação, o inóculo era colocado na superfície do solo e misturado a ele no processo de sementeação, feito logo a seguir. Mesmo que houvesse condições favoráveis para germinação das sementes, o patógeno só encontraria raízes das plantas nascidas, para penetrar, cerca de uma semana depois. Pode ser questionada, portanto, nessas condições, tanto a capacidade de sobrevivência do patógeno quanto a de provocar doença intensa e generalizada a curto e a médio prazo, como se objetivara neste trabalho. Por outro lado, na segunda inoculação, a técnica consistia em ferir e expor as raízes das plantas para, a seguir, atingi-las diretamente com o inóculo. Essa operação, todavia, por meio de um cultivador de tração animal, era difícil de fazer com a precisão desejada, sobretudo quando as plantas eram pequenas e o ato de aproximar muito a ferramenta delas implicava o risco de soterrá-las. Nesse aspecto, é de assinalar que num dos anos, quando a operação foi realizada manualmente com instrumento cortante, em trecho de pequena extensão e aplicando-se o inóculo sem diluição, os sintomas de vasos escurecidos foram observados na totalidade das plantas. Mesmo assim, tais sintomas revelavam um nível baixo de infecção, tendo-se notado uma única planta com sintomas externos. O que vale ressaltar, contudo, é que mesmo que esse processo manual e com inóculo concentrado se mostrasse eficiente, é questionável a viabilidade de seu uso em área com as dimensões da gleba utilizada.

Por fim, deve-se destacar a importância, comprovada em numerosos trabalhos, da presença de nematóides na intensidade da incidência da murcha de *Fusarium* no algodoeiro (TAYLOR et al., 1940; SMITH, 1941, 1948; NEWSON & MARTIN, 1953; MARTIN et al., 1956; PERRY, 1963; MINTON & MINTON, 1966, e JORGENSEN et al., 1978). De acordo com GARBER et al. (1979), foi necessária uma quantidade cem vezes maior de inóculo de *Fusarium* na ausência de nematóides do que na presença deles, para provocar a mesma incidência e intensidade da doença.

Essa interação foi considerada no desenvolvimento deste trabalho, na medida em que, durante quatro anos seguidos, o inóculo aplicado continha solo altamente infestado por nematóides e, em alguns casos, com estes mais *Fusarium*. Esse solo era coletado e mantido úmido, até sua utilização, a fim de garantir a

sobrevivência dos nematóides. Todavia, a despeito das oito inoculações contendo estes parasitas, nenhuma planta com sintomas de seu ataque foi observada, ao contrário do que usualmente acontece nas áreas de ocorrência natural da murcha de *Fusarium*.

O papel dos nematóides, no aumento da incidência e severidade da doença, não está bem explicado (RIDGWAY et al., 1984). Considerando que ferimentos mecânicos nas raízes também contribuem para isso, muitos atribuem a esses parasitas a função de simplesmente proporcionar uma abertura para entrada do fungo. Isso implicaria uma acumulação do fungo nos pontos de penetração do nematóide. Segundo PERRY (1963), tal fato não é normalmente observado, o que o levou a admitir que o processo se deva a uma interação fisiológica entre fungo, nematóide e planta. Se assim for, a falta de infestação natural por nematóides na gleba e a insuficiência da inoculação realizada com esse parasita, não permitindo a ocorrência da interação referida, podem estar entre as causas principais de baixa incidência da murcha de *Fusarium* no experimento. Este, finalmente, por razões práticas, foi encerrado no sétimo ano, o que deixa dúvidas se em prazo mais longo a doença se manifestaria com a intensidade desejada.

RECONHECIMENTO

Este trabalho teve a participação e responsabilidade local do Engenheiro-Agrônomo José Cione, Pesquisador Científico do Instituto Agronômico, falecido em 25 de junho de 1990 e que, na época de sua realização, era chefe da Estação Experimental de Piracicaba.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABOUVETTE, C.; ROUXEL, F. & LOUVET, J. Characteristics of *Fusarium* wilt-suppressive soils and prospects for their utilization in biological control. In: SCHIPPERS, B. & GAMS, W., eds. *Soil-borne plant pathogens*. London, Academic Press, 1979. p.165-182.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. *Biological control of plant pathogens*. St. Paul, American Phytopathological Society, c1982. 433p.
- BALMER, E.; KIEHL, E.J.; GALLI, F.; CAMPOS, H.; SALGADO, C. & CIA, E. 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 & Hansen. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 22:247-258, 1965.
- BROWN, H.B. & WARE, J.O. *Cotton*. 3.ed. New York, McGraw-Hill, 1958. 566p.
- GARBER, R.H.; JORGENSON, E.C.; SMITH, S. & HIER, A.H. Interaction of population levels of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita* on cotton. *Journal of Nematology*, Riverside, 11(2):133-137, 1979.
- JORGENSON, E.C.; HYER, A.H.; GARBER, R.H. & SMITH, S.N. Influence of soil fumigation on the *Fusarium*-root-knot nematode complex disease of cotton in California. *Journal of Nematology*, Riverside, 10(3):228-231, 1978.

- KIMATI, H. Doenças do algodoeiro - *Gossypium* spp. In: GALLI, F., coord. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1980. v. 2, cap. 4, p.29-48.
- MARTIN, W.J.; NEWSOM, L.D. & JONES, J.E. Relationship of nematodes to the development of **Fusarium** wilt in cotton. **Phytopathology**, St. Paul, **46**(5):285-289, 1956.
- MINTON, N.A. & MINTON, E.B. Effect of root-knot and sting nematodes on expression of **Fusarium** wilt of cotton in three soils. **Phytopathology**, St. Paul, **56**(3):319-322, 1966.
- NEWSOM, L.D. & MARTIN, W.J. Effects of soil fumigation on populations of parasitic nematodes, incidence of **Fusarium** wilt, and yield of cotton. **Phytopathology**, St. Paul, **43**(5):292-293, 1953. (Abstract)
- PERRY, D.A. Interaction of root-knot and **Fusarium** wilt of cotton. **Empire Cotton Growing Review**, London, **40**(1):41-47, 1963.
- RIDGWAY, R.L.; BELL, A.A.; VEECH, J.A. & CHANDLER, J.M. Cotton protection practices in the USA and world. In: KOHEL, R.J. & LEWIS, C.F., eds. **Cotton**. Madison, American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America, 1984. p.226-365.
- SMITH, A.L. Control of cotton wilt and nematodes with a soil fumigant. **Phytopathology**, St. Paul, **38**(12):943-947, 1948.
- . The reaction of cotton varieties to **Fusarium** wilt and root-knot nematode. **Phytopathology**, St. Paul, **31**(12):1099-1107, 1941.
- TAYLOR, A.L.; BARKER, H.D. & KIME, P.H. Further observations on the nematode-**Fusarium**-wilt-experiments at Lumberton, North Carolina. **Phytopathology**, St. Paul, **30**(8):710, 1940. (Abstract)