



TRANSFERÊNCIA DA RESISTÊNCIA A *FUSARIUM OXYSPORUM* f. *VASINFECTUM* BASEADA EM INOCULAÇÕES DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODOEIRO E EM TESTES SOB CONDIÇÕES NATURAIS (1)

IMRE LAJOS GRIDI-PAPP (2), EDIVALDO CIA (2), *Seção de Algodão*, e JACIRO SOAVE (2), *Seção de Microbiologia Fitotécnica, Instituto Agrônomo*

SINOPSE

No programa de melhoramento da Seção de Algodão do Instituto Agrônomo, frequentemente são obtidas linhagens melhoradas que não podem ser lançadas na lavoura do Estado de São Paulo por serem suscetíveis ao fungo da murcha de *Fusarium*. Tal foi o caso da IAC 67/59, híbrido entre variedades paulistas e mocó. Foi projetada a transferência de resistência ao patógeno para essa linhagem a partir da variedade 'IAC 17'. Realizaram-se cinco retrocruzamentos para a IAC 67/59, sem passagem por gerações autofecundadas, assegurando-se a retenção dos heterozigotos para resistência através de uma técnica de inoculação em caixas de germinação, nas gerações retrocruzadas. Estas e as gerações F₁ e F₂ foram comparadas em testes de campo com infestação natural pelo agente patogênico, e avaliadas em função das populações paternas e da testemunha resistente, através de índices relativos de tolerância e de resistência. A seleção em caixas foi eficiente em aumentar o índice de tolerância, o vigor e a uniformidade das populações, conferindo ao material resistência do tipo horizontal. A técnica de "dipping" pareceu ser mais eficiente na seleção de genes específicos para resistência. Foram isoladas linhagens promissoras, tanto por seleção em F₂ quanto pelo processo de retrocruzamentos seguidos de autofecundação e seleção em condições de campo.

1. INTRODUÇÃO

A murcha do algodoeiro causada por *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen cons-

titui um desafio permanente para os melhoristas de algodão do Instituto Agrônomo. Em razão da larga

(1) Trabalho realizado com apoio financeiro do Convênio Ministério da Agricultura/FAPESP/Instituto Agrônomo. Apresentado na 29.ª Reunião Anual da SBPC — São Paulo (SP) de 6 a 13 de julho de 1977. Recebido para publicação em 4 de abril de 1979.

(2) Com bolsa de suplementação do CNPq.

disseminação desse fungo no Estado, torna-se antieconômico o cultivo de variedade suscetível de algodoeiro. Frequentemente são obtidas linhagens melhoradas, visando a determinadas características econômicas, que não podem ser distribuídas por não apresentarem resistência ao **Fusarium**. Este foi o caso da linhagem IAC 67/59, que teve origem num projeto de hibridação entre o algodoeiro mocó e variedades paulistas.

Programou-se a transferência da resistência à murcha para a IAC 67/59 pelo procedimento de cinco retrocruzamentos. Um dos fatores considerados na escolha da metodologia foi o tempo necessário para realizar os cinco retrocruzamentos. A fim de se reduzir esse tempo, foram combinadas as possibilidades de plantio de três gerações por ano, em casas de vegetação, com uma técnica de inoculação das sementes durante a germinação. Tais trabalhos foram realizados em três anos civis, sendo os resultados examinados à luz do mendelismo e dos conceitos de resistência vertical e horizontal, definidos e discutidos por ROBINSON (11) e FLOR (4).

2. MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas populações híbridas obtidas por cruzamento da linhagem IAC 67/59 com a variedade comercial paulista 'IAC 17' e retrocruzamentos para a IAC 67/59.

A linhagem IAC 67/59 foi obtida por seleção genealógica em populações descendentes de cruzamento Texas big boll IA-028 x mocó x IAC 10. Chegou a ser estudada em ensaios regionais de variedades, onde

revelou alta produtividade e fibra de alta qualidade, aliadas, porém, à suscetibilidade a **Fusarium**. Por outro lado, a 'IAC 17' provém, por seleção genealógica, da 'Auburn 56', da qual recebeu os genes de resistência ao patógeno, sendo, atualmente, a variedade paulista de melhor comportamento em solos infestados pelo agente patogênico.

Procurou-se adotar uma técnica de inoculação por **Fusarium** que permitisse o teste de milhares de indivíduos em tempo relativamente reduzido e a passagem direta de um retrocruzamento para o seguinte sem a necessidade de autofecundação. As técnicas normalmente utilizadas, compreendendo a inoculação do substrato das plantas (1, 3, 13), a imersão das raízes das plântulas em suspensão de esporos ou "dipping" (9, 14), a injeção direta de suspensão nas plântulas (2) requerem 15 a 20 dias para a avaliação dos resultados após a inoculação e oferecem limitações quanto ao número de indivíduos testáveis. Optou-se por uma técnica de inoculação das sementes em germinação que se mostrou promissora em estudos preliminares, embora MINTON & MINTON (10) não tivessem observado efeito de **Fusarium oxysporum** f. **vasinfectum** inoculado, no substrato, sobre a germinação das sementes.

As sementes, previamente deslindadas com ácido sulfúrico concentrado, foram postas a germinar sobre espuma de náilon de 5mm de espessura, em caixas de plástico com tampa, de 22 x 17 x 9cm, à temperatura de 28°C, em estufa incubadora, colocando-se 25 sementes por caixa. Tanto as caixas como as sementes foram desinfetadas com

solução de hipoclorito de sódio a 1%. O pH do substrato foi acertado a 6,5 com ácido clorídrico ou hidróxido de potássio para a germinação.

A inoculação foi realizada 48 horas após a colocação das sementes nas condições mencionadas, através da pulverização de 3ml por caixa de suspensão de esporos, na concentração de $5 \cdot 10^6$ esporos/mililitro, obtidos pelo cultivo do isolado do **Fusarium** registrado como Fito-Cia 21-4, em meio líquido de batata e dextrose, durante sete dias. Utilizou-se um pulverizador de Vilbis a 15 psi. Ensaio preliminar mostrou que diluições de 1:10 e 1:100 não permitiam a diferenciação entre material resistente e suscetível.

Foi efetuada seleção das sementes germinadas e não afetadas por **Fusarium** nas radículas 42-48 horas após a inoculação. As sementes selecionadas, sem qualquer sintoma de manchas ou podridão nas radículas, foram plantadas em vasos de barro ou em canteiros, em casa de vegetação, em solo próprio para a produção de semente suficiente à continuação dos trabalhos.

Inoculação e seleção prévia foram efetuadas na linhagem IAC 67/59, usando-se a técnica das caixas (C) acima descrita, assim como de "dipping" (D), e a combinação de ambas (CD), com o objetivo de concentrar nas plantas-mães os genes favoráveis à resistência ao fungo que eventualmente existissem no material. As plantas assim obtidas foram cruzadas com a 'IAC 17' e retrocruzadas para a IAC 67/59 original. Cada uma das populações retrocruzadas, RC₁, RC₂, RC₃... , foi submetida à inoculação e seleção em caixas, sendo as plantas obtidas das sementes elei-

tas utilizadas no retrocruzamento seguinte. Admitiu-se que, desse modo, foram selecionados somente indivíduos com genes para resistência no estado heterozigoto. As gerações derivadas por autofecundação, F₂, (RC)₂, (RC₂)₂, (RC₃)₂... , foram plantadas em condições naturais de infestação, em ensaios e em campos de seleção. Os ensaios continham duas repetições com testemunhas resistente ('IAC RM₃') e suscetível ('IAC 12-2') intercaladas a cada sete-oito linhas. A avaliação de comportamento foi baseada nos índices de sobrevivência (tolerância) e de resistência de GRIDI-PAPP et alii (5, 6).

3. RESULTADOS

A seleção prévia, realizada em março de 1971, em 1.150 sementes inoculadas da linhagem IAC 67/59, forneceu 75 plantas pela inoculação nas caixas (C), das quais sobraram 46 boas após transplante em vasos. Destas, 17 foram constituir plantas (C) e 23 foram inoculadas também por "dipping", permitindo a seleção de uma só planta (CD). Paralelamente, foram germinadas e inoculadas por "dipping" 14 plantinhas, das quais foram selecionadas duas (D). As populações correspondentes IAC 67/59(C), IAC 67/59(D) e IAC 67/59(CD) foram aumentadas em condições de campo, em 1971/72, e usadas nos cruzamentos com 'IAC 17'. A comparação com a população original de IAC 67/59 mostrou que a inoculação nas caixas proporcionou um aumento de vigor das plantas, que apresentaram também aspecto mais uniforme na população IAC 67/59 (C).

Nas inoculações posteriores, procurou-se manter populações iguais e constantes. As pressões de seleção exercidas foram 120:1.200 na população total RC₁, 170:2.000 em (RC₂), 174.1.996 em RC₃ e 167:4.452 em RC₄. De maio de 1972 a novembro de 1976, foram realizados os cinco retrocruzamentos e obtidas as populações autofecundadas descendentes. No quadro 1 são apresentados os resultados médios obtidos para essas populações, nos anos de 1973/74 a 1976/77, em termos de índices relativos aos das testemunhas resistentes mais próximas. Nota-se que a seleção prévia nas caixas (C) resultou num aumento do índice de tolerância em relação à população original de IAC 67/59, sem aumentar, porém, o índice de resistência. Por "dipping" (D), obteve-se melhoria nos dois índices, sendo superiores, no entanto, os resultados obtidos pela

combinação das duas técnicas (CD). As seleções posteriores, nas populações retrocruzadas, resultaram numa melhoria gradual do índice de resistência.

Os índices de 'IAC 17', obtidos nos mesmos testes, não diferiram significativamente da testemunha IAC RM₃. Por outro lado, as populações F₃ e F₄ foram obtidas a partir de seleção massal realizada na população F₂, em 1973/74, em condições de intensa infestação por **Fusarium**.

Em 1975/76 e 1976/77 foram plantados campos de seleção das populações (RC₂)₂, (RC₃)₂, (RC₄)₂ e (RC₅)₂, cujos índices relativos são apresentados no quadro 2. Esses campos continham, cada um, 100 a 300 plantas deixadas na raleação. Foi selecionado o total de 23 plantas para estudo posterior das descendências.

QUADRO 1. — Índices relativos médios da população IAC 67/59 original, das obtidas por seleção em caixas (C), "dipping" (D), e combinação das duas técnicas (CD), assim como das populações híbridas com 'IAC 17', sendo referência a testemunha resistente

População	Número de anos de teste	Índice de tolerância	Índice de resistência
67/59 original	2	0,432	0,001
67/59(C)	2	0,516	0,001
67/59(D)	2	0,649	0,057
67/59(CD)	2	0,623	0,154
F ₁	1	0,699	0,001
F ₂	2	0,828	0,589
RC	1	0,622	0,193
(RC ₂) ₂	1	0,575	0,198
(RC ₃) ₂	1	0,877	0,228
(RC ₄) ₂	1	0,556	0,243
(RC ₅) ₂	1	0,810	0,197
F ₃ (SM)	1	1,080	0,697
F ₄ (SM)	1	1,001	0,947

QUADRO 2. — Índices relativos médios das populações retrocruzadas, plantadas em campos de seleção, sendo referência a testemunha resistente plantada na mesma gleba

População	Índice de tolerância	Índice de resistência
IAC 67/59 (C) - (RC ₂) ₂	0,360	0,001
(D) - (RC ₂) ₂	0,613	0,019
(CD) - (RC ₂) ₂	0,785	0,001
IAC 67/59 (C) - (RC ₃) ₂	0,429	0,001
(D) - (RC ₃) ₂	0,404	0,097
(CD) - (RC ₃) ₂	0,918	0,097
IAC 67/59 (C) - (RC ₄) ₂	1,027	0,001
(D) - (RC ₄) ₂	1,105	0,089
(CD) - (RC ₄) ₂	1,047	0,227
IAC 67/59 (C) - (RC ₅) ₂	0,855	0,227
(D) - (RC ₅) ₂	0,720	0,091
(CD) - (RC ₅) ₂	0,855	0,272

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os dados mostraram que a seleção preliminar nas caixas aumentou o índice de tolerância da população original de IAC 67/59, assim como o vigor e uniformidade da população.

As técnicas (D) e (CD), além de aumentar a tolerância, melhoraram também o índice de resistência (Quadro 1). Essa diferença entre técnicas de inoculação empregadas na população original de IAC 67/59 se manteve nas populações RC, com exceção da última após cruzamento com 'IAC 17' (Quadro 2). Aparentemente, em particular nas populações (CD), houve a seleção de algum gene para resistência preexistente na população original.

JONES (7), trabalhando com as linhagens resistentes ao **Fusarium**,

'Delfos 425' e 'Coker 100Ga', e com 'Half & Half', suscetível, concluiu que a resistência era baseada em vários genes, menos que quatro pares, e que em populações F₃ a segregação se aproximava da de caracteres quantitativos. Por outro lado, SMITH & DICK (12) apontaram a influência, em testes de campo, de fatores de resistência a nematóides que geralmente estão associados a **Fusarium** na murcha do algodoeiro. Esses autores diferenciaram, pelo uso de fumigantes, três tipos de genes, gene dominante maior, genes modificadores ou menores, para **Fusarium**, e genes de resistência para nematóides.

No presente trabalho os dados mostraram uma situação bastante complexa. No caso do índice de resistência, parece ter havido um bloqueio do efeito de genes de resistência

na população F_1 . No entanto, esse índice tendeu ao valor de 0,250 (valor relativo) do primeiro ao quinto retrocruzamento, tanto na avaliação global (Quadro 1) quanto no caso particular de 67/59 (CD) $(RC_5)_2$ (Quadro 2). Considerando-se a possibilidade de existência de um gene maior de ação intermediária, é de esperar que 25% da população tenha comportamento semelhante ao do pai resistente. Então o valor obtido parece indicar que houve a "estabilização gradual" de um gene de ação intermediária, para resistência, ou de um complexo de genes que passou a funcionar em bloco como tal. Por outro lado, o valor obtido para F_2 se aproxima mais do valor esperado no caso de dominância (75% iguais ao pai resistente).

Considerando-se o índice de tolerância, houve resposta à seleção em todos os casos. Sendo os índices relativos dos pais 1,000 (IAC 17) e 0,432 (IAC 67/59), os valores esperados no caso de um gene de ação intermediária seriam 0,716 para F_1 e 0,716 para RC $(0,25 \times 1,000 + 0,50 \times 0,716 + 0,25 \times 0,432)$. Os valores observados aproximaram-se do esperado. Tanto o valor obtido para F_2 como os índices dos campos de seleção se situaram entre dominância e ação intermediária, chegando a su-

perar a testemunha nas populações dos campos de $(RC_4)_2$. Possivelmente houve concentração de genes menores, sem ação específica para resistência, cujo conjunto conferiu resistência horizontal ao material que se somou ao efeito de genes específicos.

Em semelhantes casos de transferência, o método geralmente adotado é o dos retrocruzamentos repetidos (8). Os resultados alcançados, porém, por seleção, nas populações F_2 e F_3 , recolocam este processo em igualdade de probabilidade com o de retrocruzamentos quanto à obtenção do resultado almejado, pelo menos no caso em que ambos os pais são materiais melhorados de constituição genética não muito próxima, mas da mesma espécie.

Em conclusão, a seleção em caixas foi eficiente para concentrar fatores para resistência do tipo horizontal, aumentando o índice de tolerância, o vigor e a uniformidade das populações. A técnica de "dipping" pareceu mais eficiente em selecionar genes específicos para resistência. Foram obtidas linhagens promissoras tanto por seleção em F_2 quanto pelo processo de retrocruzamentos seguidos de autofecundação e seleção em condições de campo.

TRANSFER OF FUSARIUM WILT RESISTANCE BASED ON INOCULATION OF GERMINATING COTTON SEEDS AND ON FIELD TESTS

SUMMARY

Due to the importance of *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen in the State of São Paulo, improved strains, obtained by the cotton breeders of the "Instituto Agronômico", are often discarded because they are susceptible to *Fusarium*. This was the case of IAC 67/59. Wilt resistance was transferred to this line from 'IAC 17' by five backcrosses, without passing through selfed generations. The selection of the

heterozygotes was assured, in each generation, by inoculating the germinating backcrossed seeds. The selfed seeds of each heterozygous backcrossed generation were planted in naturally infested field tests. These populations, as well as the F_1 , F_2 and parental generations, were compared by the use of resistance and tolerance indices, relatively to a resistant control line. Selection was carried out, before crossing, by seed inoculation, dipping and by both methods, in the parental IAC 67/59. Data showed that dipping was more effective in selecting specific genes for resistance while the steady increase of the tolerance index observed from (BC₁) to (BC₂), apparently indicated a gradual accumulation of horizontal resistance as a result of selection by seed inoculation. There was also a gain in vigor and uniformity within populations during this process.

LITERATURA CITADA

1. ARMSTRONG, G. M. A solution-culture infection method used in the study of **Fusarium** wilts. *Phytopathology*, **31**:549-553, 1941.
2. BUGBEE, W. M. & PRESLEY, J. T. A rapid inoculation technique to evaluate resistance of cotton to **Verticillium albo-atrum**. *Phytopathology*, **57**:1:264, 1967.
3. ——— & SAPPENFIELD, W. P. Varietal reaction of cotton after stem or root inoculation with **Fusarium oxysporum** f. *vasinfectum*. *Phytopathology*, **58**:212-214, 1968.
4. FLOR, H. H. Current status of the gene for gene concept. *A. Rev. Phytopathol.*, **9**:275-296, 1971.
5. GRIDI-PAPP, I. L.; FUZZATTO, M. G.; FERRAZ, C. A. M. & CIA, E. Seleção do algodoeiro para resistência à fusariose em área onde ocorre doença semelhante em plantas de labelabe (**Dolichos lablab** L.). *Bragantia*, Campinas, **29**:67-72, 1970.
6. ———; CIA, E.; FERRAZ, C. A. M.; CAVALERI, P. A.; FUZZATTO, M. G.; SILVA, N. M. da & SABINO, N. P. Resposta do algodoeiro à seleção para resistência à fusariose em condições de campo. *Bragantia*, Campinas, **32**:261-273, 1978.
7. JONES, E. J. Inheritance of resistance to **Fusarium** wilt in Upland cotton. *Diss. Abstr.*, **22**(1), 1961.
8. KNIGHT, R. L. The genetical approach to disease resistance in plants. *Emp. Cott. Grow. Rev.*, **33**:191-196, 1956.
9. MILLER, D. A. & COOPER, W. E. Greenhouse technique for studying **Fusarium** wilt in cotton. *Crop Science*, **7**:75-76, 1967.
10. MINTON, N. A. & MINTON, E. B. Effect of root knot and sting nematodes on expression of **Fusarium** wilt of cotton in three soils. *Phytopathology*, **56**:319-322, 1966.
11. ROBINSON, R. A. Horizontal resistance. *Rev. Plant. Pathol.*, **52**:483-501, 1973.
12. SMITH, A. L. & DICK, J. B. Inheritance of resistance to **Fusarium** wilt in Upland and Sea Island cottons as complicated by nematodes under field conditions. *Phytopathology*, **50**:44-48, 1960.
13. THARP, W. H. A sand-nutrient infection technique for the study of **Fusarium** wilt of cotton. *Phytopathology*, **28**:206-209, 1939.
14. WILES, A. B. Comparative reactions of certain cottons to **Fusarium** and **Verticillium** wilts. *Phytopathology*, **53**:586-588, 1963.