

Índice relativo de clorofila na avaliação da murcha de *Fusarium* em feijoeiro**Relative chlorophyll index in the evaluation of *Fusarium* wilt in bean**

DOI:10.34117/bjdv5n11-142

Recebimento dos originais: 10/10/2019

Aceitação para publicação: 13/11/2019

Jean Fausto de Carvalho Paulino

Doutorando em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia

Instituição: Instituto Agrônômico (IAC).

Endereço: Avenida Barão de Itapura, 1.481, Botafogo

Campinas (SP) Brasil

CEP 13020-902

E-mail: jeanbiotec@gmail.com

Caléo Panhoca de Almeida

Mestrando em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia

Instituição: Instituto Agrônômico (IAC).

Endereço: Avenida Barão de Itapura, 1.481, Botafogo

Campinas (SP) Brasil

CEP 13020-902

E-mail: caleoalmeida@hotmail.com

César Junior Bueno

Pós-doutorado em Proteção de Plantas (Fitopatologia) e Pesquisador Científico

Instituição: Instituto Biológico

Endereço: Alameda dos Videiros, nº 1097, Gramado

Campinas (SP), Brasil

CEP 13101-680

E-mail: cjuniorbueno@gmail.com

Luciana Lasry Benchimol-Reis

Pós-doutorado em Genética Molecular Vegetal e Pesquisadora Científica

Instituição: Instituto Agrônômico (IAC).

Endereço: Avenida Barão de Itapura, 1.481

Botafogo, Campinas (SP), Brasil

CEP 13020-902

Fone (19) 2137-0600

E-mail: llasry@iac.sp.gov.br

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo utilizar o parâmetro índice relativo do teor de clorofila (IRC) nas folhas na avaliação da murcha de fusarium, uma doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), em feijoeiro. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial, com 8 repetições. A repetição foi constituída por um vaso com 2 plantas. Três cultivares de feijoeiro comum (BRS Estilo, A211 e Mortiño) foram avaliadas, com diferentes níveis de resistência ao fungo. O método de inoculação utilizado nas plantas foi o de imersão de raízes podadas em suspensão de inóculo do isolado Fop UFV 01 do fungo. Plantas controle tiveram as raízes imersas em água destilada. Avaliou-se o índice relativo de clorofila nas folhas dos cultivares aos 35 após a inoculação (DAI). Os resultados permitiram observar que o índice relativo de clorofila possibilitou a discriminação dos genótipos quanto à resistência ou não em relação ao isolado inoculado, sendo a cultivar BRS Estilo classificada como suscetível e as A211 e Mortiño resistentes ao isolado do fungo.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L.; *Fusarium oxysporum*; patogenicidade; clorose.

ABSTRACT

The objective of this study was to use the relative chlorophyll index (RCI) in the evaluation of fusarium wilt, a disease caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) in different bean genotypes. The experiment was conducted in a completely randomized design with 8 replications. The experimental plot consisted of a pot with 2 plants. Briefly, common bean cultivars (BRS Estilo, A211 and Mortiño) with different disease resistance levels were used. The inoculation method used was the immersion of inoculated suspension pruned roots and control plants inoculated with water for comparison and severity evaluation. The relative chlorophyll index caused by fungal chlorosis at 35 after inoculation (DAI) was evaluated. The results allowed to observe that the relative chlorophyll index allowed the significant discrimination of the genotypes being the cultivar BRS Estilo characterized with lower CRI compared to A211 and Mortiño.

Key-Words: *Phaseolus vulgaris* L.; *Fusarium oxysporum*; pathogenicity; chlorosis.

1 INTRODUÇÃO

A murcha ou amarelecimento do feijoeiro comum causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder (Fop) é uma importante doença de solo que atualmente encontra-se amplamente disseminada nas principais regiões produtivas do feijoeiro comum, principalmente devido ao aumento do cultivo da cultura em locais sob irrigação com pivô central (RAVA et al., 1996). Além dos sintomas descritos, há a descoloração vascular – avermelhamento provocada pelo fungo também no caule da planta (Nelson et al., 1983).

A identificação de fontes de resistência de plantas ao patógeno são fundamentais no sucesso de um programa de melhoramento genético de uma cultura. Nesse sentido, alguns

estudos já foram conduzidos com o intuito de se conhecer a reação de cultivares e linhagens de feijoeiro comum inoculados com diferentes isolados de *Fop* (PASTOR-CORRALES & ABAWI, 1987; ITO et al., 1997; SALGADO et al., 1993; NASCIMENTO et al., 1995; ALVES-SANTOS et al., 2002).

Os métodos de inoculação de um fungo em mudas bem como critérios adequados de avaliação da incidência e severidade da doença são essenciais no processo de seleção de linhagens visando a incorporar genes de resistência nos programas de melhoramento de culturas, principalmente no patossistema feijoeiro versus *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

O clorofilômetro é um aparelho portátil que permite obter o índice relativo do teor de clorofila (IRC) nas folhas das plantas de modo simples, rápido e não destrutivo. Em doenças como a murcha ou amarelecimento provocados por *Fusarium*, a medição do IRC nas folhas pode ser um parâmetro de avaliação interessante juntamente com outros.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência do clorofilômetro na avaliação da reação de cultivares de feijoeiro comum inoculados com um isolado de *Fop*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados três cultivares de feijoeiro. O acesso A221 e Mortiño, classificados como diferenciadores ao *Fop*, conforme o trabalho de Woo et al. (1996), e uma cultivar do grão tipo carioca comercial, a BRS Estilo, considerada como suscetível ao patógeno *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Batista et al., 2016).

A semeadura dos cultivares foi realizada em bandejas de 128 células contendo substrato para hortaliças Topstrato®. Após plantio, as mesmas foram mantidas em casa de vegetação para germinação e crescimento das plântulas até o estágio V2 (folha primária completamente expandida).

2.2 INOCULAÇÃO, CONDUÇÃO E AVALIAÇÃO DO ENSAIO

Foi utilizado um isolado de *Fop* obtido da Universidade Federal de Viçosa, denominado *Fop* UFV 01. Esse isolado é proveniente de plantas de feijoeiro da cv. Meia Noite do município de Coimbra, MG.

O método de inoculação do isolado *Fop* UFV01 nas plantas foi o de imersão de raízes podadas em suspensão de inóculo (Pastor Corrales & Abawi, 1987). O preparo do inóculo do isolado *Fop* UFV 01 consistiu-se em colocar um disco de BDA colonizado com o fungo em

placas de Petri contendo o mesmo meio. As placas foram mantidas em estufa BOD por 14 dias, a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas de luz. A suspensão de esporos do isolado foi preparada uma hora antes da inoculação, calibrando-a para 1×10^6 conídios. mL⁻¹, incluindo macro e microconídios do fungo.

Para a inoculação, as plântulas foram cuidadosamente retiradas das bandejas, suas raízes lavadas com água corrente e 1/3 do seu comprimento foram cortadas. As raízes das plântulas foram imersas por 5 minutos na suspensão de esporos do fungo. As raízes das plantas controle foram imersas em água destilada autoclavada.

Após as inoculações, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 0,8 L de substrato Biomix® e mantidas em câmara Fitotron regulada para temperatura de 25°C \pm 2°C e luminosidade controlada com fotoperíodo de 12 horas com iluminação e 12 horas no escuro. Diariamente, as plântulas foram irrigadas e 10 dias após a inoculação (DAI), cada vaso recebeu 0,5 g de uréia como fonte de nitrogênio.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso com 8 repetições. A repetição foi constituída por um vaso com 2 plantas. Aos 35 dias após inoculação (DAI), clorose drástica nas folhas das plantas dos tratamentos foi observada. Neste momento, efetuou-se a medição do Índice Relativo de Clorofila (IRC) com o aparelho clorofilômetro (SPAD-502, Minolta) com cinco medições realizadas na face adaxial da terceira folha trifoliolada.

Os índices de clorofila das plantas inoculadas ou não foram analisados estatisticamente aplicando a análise de variância seguido do teste de Scott-Knott com 5% de significância. Para visualização dos dados foi utilizado um gráfico do tipo *Boxplot* elaborado pelo pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O IRC por cultivar de feijoeiro foi significativo ($P < 0,01$), demonstrando diferenciação entre os materiais (Tabela 1). Isso já demonstra acerto no uso deste índice na avaliação do amarelecimento do feijoeiro provocada por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Tabela 1. Análise de variância do índice relativo do teor de clorofila (IRC) em folhas de cultivares de feijoeiro inoculados pelo método de imersão de raízes podadas em suspensão de inóculo do isolado UFV 01 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Análise de Variância (ANOVA)					
	Gl	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Genótipos (G)	2	273,82	136,91	11,16	<0.009***
Resíduo	6	73,63	12,27		
Total	8	347,45			
CV%				10,78	
Shapiro-Wilk				0,65	

***Significativo a 0,1% de probabilidade; CV: Coeficiente de Variação.

O genótipo BRS Estilo foi o mais afetado pelo isolado *Fop* UFV 01. Os materiais A 211 e Mortiño foram menos afetados pelo isolado do fungo e não diferiram entre si (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2. Índice relativo do teor de clorofila (IRC) nas folhas dos cultivares de feijoeiro inoculados pelo método de imersão de raízes podadas em suspensão de inóculo do isolado UFV 01 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*

Genótipos	IRC
BRS Estilo	24,96 a ¹
A 211	34,56 b
Mortiño	38,00 b

¹Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si, segundo o teste de Scott Knott com a 5% de probabilidade.

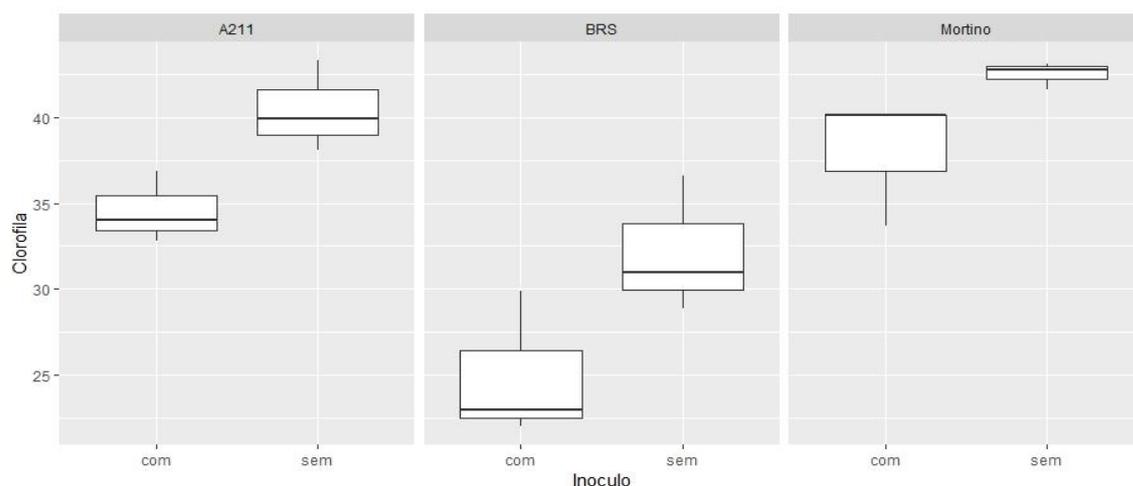


Figura 2. *Boxplot* demonstrando o índice relativo do teor de clorofila (IRC) nas folhas dos genótipos inoculados (com) e controle (sem) pelo método de imersão de raízes podadas em suspensão de inóculo do isolado UFV 01 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Conforme Amarante et al. (2009), o maior sucesso nas melhores estimativas dos teores de clorofila expressos em unidade de área ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) foram obtidas por meio de medição feita na face adaxial, ou seja, superior das folhas, não só com o colorímetro CR-400, mas também com o SPAD-502. Portanto, a superfície mais uniforme na face adaxial permite melhor estimativa do teor de clorofila, tanto no método baseado na refletância (Minolta CR-400) quanto na absorvância (SPAD-502) da luz pela folha. No presente estudo, a medição do IRC nos diferentes cultivares de feijoeiro foi realizada na face adaxial da terceira folha trifoliolada.

Com base no parâmetro IRC, a cultivar BRS Estilo foi considerada suscetível ao isolado *Fop* UFV 01. No estudo de Batista et al. (2016), essa cultivar foi descrita como suscetível para *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Assim, o método IRC é confiável e pode ser adotado como um parâmetro para se avaliar linhagens ou acessos de feijoeiro em programa de melhoramento genético da cultura na busca por genes de resistência contra ação do patógeno. *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Além do IRC, outros parâmetros podem ser avaliados, tais como a murcha com aparelho de medição de turgescência da folha e por fim a extensão da necrose/avermelhamento do sistema vascular da região do colo da planta. A murcha e o avermelhamento são sintomas e sinais característicos da doença provocada por *F. oxysporum* em plantas hospedeiras.

4 CONCLUSÕES

O parâmetro IRC avaliado por clorofilômetro pode ser utilizado juntamente com outros critérios para diferenciar materiais de feijoeiro comum quanto a resistência ou suscetibilidade em relação ao patógeno *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPESP pelas bolsas de estudo concedidas e pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ALVES-SANTOS, F. M.; CORDEIRO-RODRIGUES, L.; SAYAGUÉS, J. M.; MARTÍN-DOMINGUEZ, R.; GARCÍA BENAVIDES, P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M.; ESLAVA, A. P. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**, 51: 605-611, 2002.

AMARANTE, C.V.T et al. Quantificação não destrutiva da área e do teor de clorofila nas folhas de videiras jovens 'Cabernet Sauvignon'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.5, p.680-686, 2009.

BATISTA R.O.; OLIVEIRA A.M.C.; SILVA J.L.O.; NICOLI A.; CARNEIRO P.C.S. Resistance to Fusarium wilt in common bean. **Crop Breed Appl Biotechnol**, vol.16, n.3, p.226-233, 2016.

ITO, M. F.; CARBONELL, S. A. M.; POMPEU, A. S.; RAVAGNANI, R. C.; LOT, R. C.; RODRIGUES, L. C. N. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 270-271, 1997.

NASCIMENTO, S. R. C.; MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C. Comportamento de variedades e linhagens de feijoeiro ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 458-463, 1995.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. Pennsylvania state University Press; University Park, Pennsylvania, USA, 1983.

PASTOR-CORRALES M.A.; ABAWI G.S. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant Disease** v. 71: 990-993, 1987.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A.; COSTA, J. G. C. Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 296-300, 1996.

SALGADO, M. O.; SCHWARTZ, H. F. Physiological specialization and effects of inoculum concentration on *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in common beans. **Plant Disease**, v. 79, n. 5, p. 492-496, 1993.

WICKHAM H: ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag New York**, 2016.

WOO, S. L.; ZOINA, A.; DEL SORBO, G.; LORITO, M.; NANNI, B.; SCALA, F.; NOVIELLO, C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. **Phytopathology**, v. 86, n. 9, p. 966-973, 1996.