

ALISSON CAMPOS PEREIRA

**RESISTÊNCIA DO FEIJÃO-COMUM À MURCHA-DE-FUSÁRIO:
Metodologias de inoculação e de avaliação**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P436r
2013
Pereira, Alisson Campos, 1984-
Resistência do feijão-comum à murcha-de-fusário :
metodologias de inoculação e de avaliação. / Alisson Campos
Pereira. – Viçosa, MG, 2013.
xi, 87f. : il. ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Feijão - Melhoramento genético - Métodos estatísticos.
2. Feijão - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos.
3. Murcha-de-fusarium. 4. Feijão - Inoculação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22 ed. 635.6523

ALISSON CAMPOS PEREIRA

**RESISTÊNCIA DO FEIJÃO-COMUM À MURCHA-DE-FUSÁRIO:
Metodologias de inoculação e de avaliação**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 16 de julho de 2013.

Pedro Crescêncio Souza Carneiro
(Coorientador)

Trazilbo José de Paula Júnior
(Coorientador)

Moacil Alvez de Souza

Rogério Faria Vieira

José Eustáquio de Souza Carneiro
(Orientador)

Aos meus pais, Sebastião e Sandra.

Ao meu irmão, Alessandro.

A minha namorada, Jacqueline.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pela vida e por mais essa conquista.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de participar da pós-graduação em nível de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e orientador José Eustáquio de Souza Carneiro, pelos ensinamentos paciência, compreensão, confiança em mim depositada e, sobretudo, pelas oportunidades concedidas, nesses nove anos em que atuei junto ao Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Ao professor Pedro Crescêncio Souza Carneiro e ao Dr. Trazilbo José de Paula Júnior, meus coorientadores, pela paciência, ensinamentos, apoio e sugestões, os quais foram fundamentais para a realização desta tese.

Aos meus pais, Sebastião e Sandra, e meu irmão, Alessandro, pelo carinho, amor e apoio, os quais foram cruciais na minha vida.

À minha namorada, Jacqueline, pelo amor e companheirismo.

Aos colegas e amigos do Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro, pela contribuição neste trabalho e pela prazerosa convivência em todos esses anos.

Aos funcionários das Estações Experimentais, ao Prof. Diogo Alves de Melo e Coimbra, em especial ao funcionário e amigo Gilberto, por todo auxílio na condução dos experimentos de campo.

A todo o corpo docente da Universidade Federal de Viçosa que contribuiu com minha formação acadêmica.

A todos os meus amigos, pelos momentos de descontração e alegria.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

ALISSON CAMPOS PEREIRA, filho de Sebastião Caetano Pereira e Sandra de Campos Mendes Pereira, nasceu em 2 de fevereiro de 1984, em Unaí, estado de Minas Gerais.

Cursou o primário e o ensino fundamental no Centro Educacional Arlindo Camargo, em Buritis, Minas Gerais.

De 1999 a 2001, completou o ensino médio na Escola Paroquial Frei Cipriano, em Buritis, Minas Gerais.

Em março de 2003, iniciou o curso superior em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, colando grau em janeiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na UFRV, na área de Melhoramento de Plantas, defendendo a dissertação em fevereiro de 2010.

Em março de 2011, iniciou junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFRV o curso de doutorado, na área de Melhoramento de Plantas, defendendo a tese em junho de 2013.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1. A cultura e o melhoramento do feijoeiro.....	3
2.2. Melhoramento para resistência a doenças com ênfase na cultura do feijoeiro.....	4
2.3. Melhoramento visando resistência à murcha-de-fusário do feijoeiro.....	6
2.3.1. Aspectos gerais.....	6
2.3.2. O patógeno causador da murcha-de-fusário do feijoeiro.....	9
2.3.3. Metodologias de inoculação, épocas e escalas de avaliação da severidade da murcha-de-fusário do feijoeiro.....	10
2.3.4. Mecanismo de resistência às murchas vasculares com ênfase na murcha-de-fusário do feijoeiro.....	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 1	28
METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA MURCHA-DE-FUSÁRIO DO FEIJOEIRO.....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
	Página
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. CONCLUSÕES.....	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPÍTULO 2	42
METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE <i>Fusarium oxysporum</i> NO FEIJÃO-COMUM.....	42

RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4. CONCLUSÕES.....	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
 CAPÍTULO 3	 57
REAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJÃO-COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i>) À MURCHA-DE-FUSÁRIO.....	57
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4. CONCLUSÕES.....	72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
 CAPÍTULO 4	 76
INFECTION PROCESS OF <i>F OXYSPORUM</i> F. SP. <i>PHASEOLI</i> ON RESISTANT, INTERMEDIATE AND SUSCEPTIBLE BEAN.....	76
RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	76
1. INTRODUCTION.....	77
2. MATERIAL AND METHODS.....	78
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	79
4. REFERENCES.....	85

RESUMO

PEREIRA, Alisson Campos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Resistência do feijão-comum à murcha-de-fusário: Metodologias de inoculação e de avaliação.** Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro. Co-orientadores: Trazilbo José de Paula Júnior e Pedro Crescêncio Souza Carneiro.

Com o objetivo de identificar eficientemente linhagens de feijoeiro resistentes à murcha-de-fusário foram conduzidos quatro experimentos, onde os objetivos específicos foram: desenvolver e comparar metodologias de avaliação, avaliar metodologias de inoculação, identificar fontes de resistência à murcha-de-fusário e obter informações a respeito do processo de infecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). Assim, primeiramente foi desenvolvida uma nova escala de avaliação da severidade da murcha-de-fusário (Escala relativa a plantas testemunhas saudas – RPTS) que considera, além dos sintomas típicos da murcha-de-fusário (morte, murcha e clorose das folhas e nanismo), o sintoma redução do crescimento dos feijoeiros. Os resultados obtidos por essa escala foram comparados com os resultados obtidos por quatro escalas já descritas na literatura. Para isso, foi instalado um experimento com 15 linhagens de feijoeiro, utilizando o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada parcela representada por um vaso com três plantas. As avaliações foram realizadas aos 21 dias após as inoculações (DAI). De acordo com os resultados obtidos, a escala RPTS é mais precisa em comparação com as metodologias anteriormente descritas. Em seguida, em um segundo experimento foram comparadas quatro metodologias de inoculação de *Fop*, em duas condições ambientais (fevereiro/março (época quente - EQ) e junho/julho (época fria - EF)). Nesse experimento, foram utilizadas as linhagens Manteigão Fosco 11, VP8 e Meia Noite. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com três repetições e parcelas constituídas por dois vasos com três plantas. As avaliações de severidade da murcha-de-fusário foram realizadas a cada três DAI, fazendo-se uso da escala RPTS desenvolvida no primeiro experimento. A época mais adequada para avaliação da severidade da murcha-de-fusário foi aos 22 e 37 DAI, no período quente e frio do ano, respectivamente. A metodologia de inoculação que emprega corte de 1/3 do comprimento das raízes com posterior imersão na suspensão

de conídios de *Fop* por cinco minutos foi a que melhor discriminou as linhagens. No terceiro estudo, fazendo-se uso da escala RPTS, da melhor metodologia de inoculação e época de avaliação de acordo como os experimentos anteriores, caracterizou-se fenotipicamente 197 linhagens elites de feijoeiro avaliadas nos ensaios de Valor Cultivo e Uso (VCU) em Minas Gerais, no período de 2002 a 2012 quanto à reação à murcha-de-fusário. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com duas repetições. Cada parcela foi representada por um vaso com três plantas. Das 197 linhagens avaliadas, 29 se mostraram resistentes. Após se identificar as fontes de resistência, foi conduzido um quarto estudo, onde se visou entender o processo de infecção de *Fop*. Para esse fim, foram utilizadas as linhagens Manteigão Fosco 11 (resistente), VP8 (intermediária) e Meia Noite (suscetível). Aos 43 dias após a inoculação, segmentos de caule foram observados em microscópio eletrônico de varredura. As linhagens Manteigão Fosco 11 e VP8 apresentaram material ocluindo os vasos do xilema, os quais possivelmente restringem a colonização por *Fop*. A resistência de linhagens de feijão a *Fop*, aparentemente, também pode ser explicada pela maior compactação das células do xilema.

ABSTRACT

PEREIRA, Alisson Campos, D. Sc., Federal University of Viçosa, July, 2013. **Resistance of common bean to fusarium wilt: Methods of inoculation and assessment.** Advisor: José Eustáquio de Souza Carneiro. Co-advisors: Trazilbo José de Paula Júnior and Pedro Crescêncio Souza Carneiro.

We conducted four experiments to efficiently identify common bean lines resistant to Fusarium wilt. The specific objectives were to develop and compare assessment methodologies, evaluate inoculation methodologies, identify sources of resistance to Fusarium wilt and obtain information in respect to the process of infection from *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). Thus, we first developed a new scale for assessment of the severity of Fusarium wilt (healthy control plant relative scale – HCPR) which, in addition to the typical Fusarium wilt symptoms (death, leaf wilting and chlorosis and dwarfism), considers the symptom of reduction in common bean growth. The results obtained through this scale were compared to the results obtained through four scales already described in the literature. For that purpose, we set up an experiment with 15 lines of common bean using a randomized block design with four replications, each plot consisting of a pot with three plants. Assessments were made at 21 days after inoculations (DAI). According to the results obtained, the HCPR scale is more precise than the previously described methodologies. In a subsequent second experiment, we compared four methodologies of inoculation of *Fop* in two environmental conditions (February/March (hot season – HS) and June/July (cold season – CS)). The lines Manteigão Fosco 11, VP8 and Meia Noite were used in this experiment. The experimental design was randomized blocks with three replications, and plots consisted of two pots with three plants. Assessments of the severity of Fusarium wilt took place every three DAI, through use of the HCPR scale developed in the first experiment. The most suitable time period for assessment of the severity of Fusarium wilt was at 22 and 37 DAÍ in the hot and cold periods of the year, respectively. The inoculation methodology that best discriminated the lines was cutting 1/3 of the root length, followed by immersion in the *Fop* conidium suspension for 5 minutes. In the third study, using the HCPR scale from the best inoculation methodology and

assessment time according to the previous experiments, we phenotypically characterized 197 common bean elite lines assessed in the Value for Cultivation and Use (VCU) trials in Minas Gerais in the period from 2002 to 2012 in regard to reaction to Fusarium wilt. A randomized block design with two replications was used. Each plot consisted of a pot with three plants. Of the 197 lines assessed, 29 proved to be resistant. After identifying sources of resistance, we conducted a fourth study where we sought to understand the process of infection from *Fop*. For that purpose, we used the lines Manteigão Fosco 11 (resistant), VP8 (intermediate) and Meia Noite (susceptible). At 43 days after inoculation, stem segments were observed in a scanning electron microscope. The lines Manteigão Fosco 11 and VP8 exhibited material occluding the xylem vessels, which possibly restrict colonization by *Fop*. Apparently, resistance of common bean lines to *Fop* may also be explained by greater compaction of xylem cells.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e também se destaca por ser o maior consumidor (FAO, 2012). Os feijões de origem mesoamericana são preferidos pela população brasileira. O grupo comercial carioca representa aproximadamente 70% do total produzido (CONAB, 2008).

Devido às condições edafoclimáticas do Brasil, o feijão pode ser cultivado em três safras anuais: safras das águas, da seca e do outono/inverno. Isso confere ao país grande potencial de produção desta leguminosa. Em torno de 70% da produção nacional de feijão é obtida por pequenos agricultores (IBGE, 2009), que via de regra utilizam baixa tecnologia. Segundo Menten et al. (2006), em torno de 90% das lavouras de feijão no Brasil utilizam como material de propagação sementes próprias, “salvas”, “piratas” ou grãos. Esse fato é uma das principais causas da baixa produtividade de feijão no Brasil e torna-se fato mais agravante devido à maioria das doenças do feijoeiro serem transmitidas via sementes. Esse quadro de grande variação das condições ambientais associada à má adoção de práticas preventivas de controle e disseminação de patógenos na cultura do feijoeiro fez com que as doenças se tornassem grande problema.

O uso de cultivares resistentes às doenças é considerado uma estratégia eficiente, segura, barata e de fácil adoção pelos produtores, além de ser menos agressivo ao meio ambiente. Na cultura do feijoeiro, mesmo para doenças mais estudadas como a antracnose, a mancha-angular e a ferrugem, apesar do grande avanço obtido até o presente momento, ainda não se dispõem de cultivares de feijão de grãos do tipo “carioca” com uma ampla resistência a estas moléstias. Isto se deve à grande variabilidade desses patógenos e à dificuldade de associar em um mesmo cultivar, pelos métodos convencionais, alelos de resistência às múltiplas raças de diferentes patógenos (Carrijo et al., 1980; Rava et al., 1994; Faleiro et al., 1999). Assim, um dos principais objetivos buscados pelos melhoristas do feijoeiro é a obtenção de cultivares resistentes aos principais patógenos (Paula Júnior et al., 2004; Alzate-Marin et al., 2006; Melo et al., 2006; Couto et al., 2008).

Apesar dos danos causados pelas doenças anteriormente referidas, patógenos de solo como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum* e

Fusarium solani f. sp. *phaseoli*, agentes etiológicos da murcha-de-fusário, mofo-branco e podridão-radicular-seca, respectivamente, figuram entre as doenças mais importantes do feijoeiro (Paula Júnior et al., 2004). Trabalhos de melhoramento visando resistência a estes patógenos ainda são incipientes. Para doenças como a murcha-de-fusário, em que o controle químico é pouco eficiente, a utilização de cultivares resistentes é a principal estratégia de controle (Vieira, 1983; Paula Júnior et al., 2004).

Uma grande variação nos resultados de trabalhos que abordam o melhoramento à resistência à murcha-de-fusário do feijoeiro é observada na literatura. A falta de padronização de metodologias de inoculação e avaliação e a grande influência ambiental na severidade da murcha-de-fusário, possivelmente, têm contribuído para a discrepância dos resultados. Somado a isso, nenhuma das metodologias de avaliação da severidade da murcha-de-fusário do feijoeiro aborda o sintoma “redução do crescimento” das plantas (Abawi, 1989). Assim, objetivou-se com este trabalho um melhor entendimento da resistência do feijão-comum à murcha-de-fusário, comparar metodologias de inoculação e de avaliação, além da identificação de fontes de resistência à murcha-de-fusário.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A cultura e o melhoramento do feijoeiro

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) tem grande importância alimentar, sócio-econômica e cultural no Brasil. Esta leguminosa está presente em praticamente todos os lares brasileiros e é importante fonte proteica (Ferreira et al., 2002). Além disso, é uma cultura que emprega grande volume de mão de obra e é geradora de renda, sendo especialmente importante para a agricultura familiar (IBGE, 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão da espécie *Phaseolus vulgaris* (FAO, 2012) e vem apresentando grandes avanços quanto à produção e à produtividade. O país produziu no ano agrícola de 1976/1977, 2.215 mil toneladas de feijão com produtividade de 488 kg ha⁻¹ (CONAB, 2012). Esses valores em 2010/2011 atingiram o patamar de 3.500 mil toneladas e 951 kg ha⁻¹ (IBGE, 2012). Assim, a cultura apresentou incremento de 158,0 e 194,9% na produção e na produtividade, respectivamente. Parte disso se deve às pesquisas, destacando-se o desenvolvimento de cultivares de feijoeiro mais produtivas e adaptadas (Ramalho et al., 2002; Carneiro et al., 2004; Abreu, et al., 2006; Carneiro et al., 2006; Abreu et al., 2011).

Minas Gerais é o segundo maior produtor nacional. Na safra de 2009/10 esse Estado produziu 624 mil toneladas (18,7% da produção nacional) e a produtividade média foi de 1.486 kg ha⁻¹, semelhante à do Paraná maior produtor nacional (CONAB, 2012).

O consumo per capita de feijão ao longo dos últimos 40 anos apresenta uma tendência decrescente da ordem de 1,3% ao ano, porém, o decréscimo não ocorre de forma contínua, existindo oscilações e atualmente tem ocorrido estabilização do consumo (Wander & Chaves, 2011). As possíveis causas da baixa do consumo nas últimas décadas foram o êxodo rural, com alteração nos hábitos alimentares da população, a redução do preço de outras fontes proteicas e a inserção da mulher no mercado de trabalho (Ferreira et al., 2002; Borém & Carneiro, 2006). Assim, o consumo *per capita* que era de 27 kg hab⁻¹ ano⁻¹, na década de 1970, atualmente encontra-se em 17 kg hab⁻¹ ano⁻¹ (Wander & Chaves, 2011).

O melhoramento genético do feijoeiro no Brasil é realizado basicamente por empresas públicas. Dentre essas, destacam-se o Instituto Agronômico de Campinas (IAC), o Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), a Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP), a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) e as Universidades Federais de Viçosa e Lavras (UFV e UFLA). Minas Gerais é o estado que conta com um dos maiores contingentes de especialistas e instituições atuando nessa área. Isso é fruto de uma parceria efetiva entre as instituições de pesquisa atuantes no Estado (Ramalho et al., 2004).

Nos últimos 10 anos, 13 novas cultivares foram recomendadas para Minas Gerais (Paula Júnior et al., 2010). Dessas, cinco são de grãos do tipo carioca, o mais cultivado no Brasil, dois são do grupo comercial preto e seis são do grupo comercial grãos especiais (vermelhos, roxos e manteigões).

Alguns objetivos são comuns aos programas de melhoramento do feijoeiro, destacando-se a obtenção de cultivares com grãos do tipo carioca, o mais consumido no país. Outros objetivos buscados pelos programas são: aspecto comercial dos grãos, produtividade, boa qualidade culinária, porte ereto, precocidade e resistência às principais doenças (Alzate-Marin et al., 2006; Melo et al., 2006; Couto et al., 2008; Menezes Júnior et al., 2008).

2.2. Melhoramento para resistência a doenças com ênfase na cultura do feijoeiro

Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de feijão (FAO, 2012), a produtividade média ainda é baixa e gira em torno de 951 kg ha⁻¹ (IBGE, 2012). Segundo White (1993), as doenças são as principais causas da baixa produtividade de feijão no mundo. No Brasil, da mesma forma, as doenças que acometem o feijoeiro são frequentemente citadas como uma das causas da baixa produtividade da cultura (Vieira, 1983; Paula Júnior et al., 2004; Borém & Miranda, 2005).

No melhoramento visando resistência a doenças, algumas informações são importantes. Entre essas podem ser citadas: estudo da etiologia e variabilidade do patógeno, identificação de fontes de resistência e o estudo do controle genético desta resistência. De posse dessas informações pode-se planejar qual a melhor estratégia para se realizar o melhoramento (Borém & Miranda, 2005).

Os programas de melhoramento do feijoeiro para resistência a doenças têm explorado basicamente mecanismos de resistência de herança simples (Pereira et al., 2004; Costa et al., 2006; Couto et al., 2008; Marcondes et al., 2010). A resistência genética de herança monogênica atrai os melhoristas por ser de fácil manipulação e assim poder ser rapidamente introgridida em materiais suscetíveis por meio da utilização de métodos simples, com o retrocruzamento. Esse procedimento, embora amplamente utilizado, faz com que as cultivares tenham um período de vida útil curto em virtude da pressão de seleção que causa e da grande capacidade de variação patogênica dos organismos causadores de doenças. Isto leva à constante exploração da variabilidade genética existente na espécie em busca de novas fontes de resistência (Johnson, 1984; Crute & Pink, 1996; Dias et al., 1998; Gonçalves et al., 2007).

Outro tipo de resistência que pode ser explorada pelos melhoristas é a resistência horizontal. Esta se caracteriza por ser conferida por um conjunto de genes de efeitos secundários, aferindo um efeito quantitativo sobre a severidade da doença (Camargo, 1995). A resistência horizontal é efetiva contra um número maior de raças, se comparada à resistência vertical (Borém & Miranda, 2005). Para esse tipo de resistência, a seleção recorrente vem sendo utilizada no feijoeiro. Trabalhos relataram boa eficiência dessa estratégia quando se deseja trabalhar com a resistência poligênica (Amaro et al., 2007; Arantes et al., 2010).

O emprego de multilinhas é outra estratégia possível de ser utilizada no melhoramento visando resistência a doenças. Esta consiste na utilização de mistura, em proporções previamente estabelecidas, de linhagens fenotipicamente semelhantes, mas que contenham diferentes genes de resistência (Borém & Miranda, 2005). Esta estratégia permite a redução na densidade de plantas suscetíveis frente ao inóculo inicial, diminui a produção de inóculo no caso de doenças policíclicas, instala efeito barreira à disseminação de esporos e diminui a pressão de seleção sobre o patógeno (Matiello et al., 1997; Martinelli, 1993; Botelho et al., 2011; Ramalho & Araújo, 2011). Entretanto, a utilização e a produção de multilinhas apresentam alguns problemas práticos. Consumidores e produtores requerem uniformidade em algumas características agronômicas como cor e formato de grãos e uniformidade na maturação, entretanto, estas características já são problemas enfrentados por programas de melhoramento de feijão mesmo utilizando-se linhagens puras. Somado

a esse problema, a produção de multilinhas demanda mais tempo e recursos se comparada à obtenção de uma linhagem (Crute & Pink, 1996).

2.3. Melhoramento visando resistência à murcha-de-fusário do feijoeiro

2.3.1. Aspectos gerais

Mais de 45 enfermidades podem acometer o feijoeiro. Contudo a maioria não apresenta grande relevância (Vieira, 1983). Dentre essas, a antracnose, a mancha-angular, a ferrugem, o mofo-branco, a podridão-radicular-seca e a murcha-de-fusário estão atualmente entre as que causam maiores perdas (Paula Júnior et al., 2004).

A ausência ou a inadequada rotação de culturas, principalmente em áreas de pivô central, a falta de medidas preventivas de controle da disseminação e o aumento da compactação do solo fizeram com que a murcha-de-fusário se tornasse uma das principais doenças da cultura no Brasil (Paula Júnior et al., 2004; Pereira et al., 2009).

O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), penetra pelo sistema radicular e se move inter e intracelularmente até invadir os elementos de vasos do xilema. A infecção progride por meio do crescimento do micélio e do transporte de microconídios pela seiva bruta. Os conídios podem ficar presos nas perfurações e nos tabiques dos vasos, germinam e penetram as paredes celulares e produzem microconídios nos vasos adjacentes. Este ciclo é repetido até que o sistema vascular seja colonizado (Costa et al., 2006). Como sintoma, inicialmente ocorre amarelecimento das folhas basais da planta, progredindo posteriormente para as folhas da parte superior. É também possível observar a perda da turgescência das folhas, podendo levar, em casos mais severos, à morte das plantas. A doença pode afetar apenas parte das folhas ou ramos, devido à localização dos vasos colonizados. Quando plantas jovens são afetadas, observa-se redução do crescimento e nanismo. O crescimento do fungo no interior dos vasos pode dar ao tecido vascular coloração enegrecida podendo facilmente ser observado em cortes transversais de caules doentes. Sob condições de alta umidade, desenvolvem-se sobre o caule estruturas de coloração rosada, constituídas de micélio e conídios do patógeno (Vieira, 1983; Abawi, 1989). O patógeno é favorecido por temperaturas de 24 a 28°C, solos arenosos e ácidos (Paula Júnior et al., 2004).

Fop pode ser transmitido via sementes, sobrevive em restos culturais e no solo na forma de estruturas de resistência denominadas clamidósporos. Este fungo pode ser disseminado por vento, enxurradas, água de irrigação, solo aderido a máquinas e equipamentos agrícolas e até mesmo pelo próprio homem. Assim, esse patógeno que inicialmente apresenta seus danos em reboleiras, com o passar do tempo pode se propagar por toda área de cultivo. Uma vez que o patógeno esteja instalado em determinada área, seu controle é difícil de ser alcançado. Assim, a alternativa mais eficaz e viável é a utilização de cultivares resistentes (Abawi & Pastor-Corrales, 1990; Sartorato & Rava, 1994; Paula Júnior et al., 2004).

Alguns trabalhos relatam a existência de variabilidade de *Fop*. Ribeiro & Hagerdorn (1979) verificaram variabilidade de *Fop* pelo estudo do comportamento patogênico de isolados provenientes dos Estados Unidos, Holanda e Brasil. Woo et al. (1996), utilizando técnicas moleculares, relataram a presença de cinco raças. Fato interessante é que as raças foram correspondentes às regiões geográficas e foram denominadas de raça 1, 2, 3, 4 e 5, conforme origem na Carolina do Sul, Brasil, Colômbia, Colorado e Grécia, respectivamente. Mais recentemente, Alves-Santos et al. (2002) publicaram a existência de mais duas raças oriundas da Grécia: raças 6 e 7. Nascimento et al. (1995a), estudaram a variabilidade de 17 isolados de *Fop* provenientes dos estados de São Paulo, Paraná e Pernambuco, constataram somente a ocorrência da raça 2, o que indicou uma possível prevalência desta raça no Brasil. Entretanto, Ito et al. (1997), em estudo de variabilidade deste mesmo fungo envolvendo sete isolados de diferentes regiões do Brasil, constataram a presença de três raças.

Dois genes de resistência a *Fop* constam na lista de genes relatados em BIC (2010): *Fop-1* presente nas cultivares Tenderette, Early Gallatin e Pintado que confere resistência à raça 2 e *Fop-2* encontrado na 'Preto Uberabinha' que confere resistência a raça 1.

A obtenção de fontes de resistência é uma das principais etapas de um programa de melhoramento que visa à resistência a doenças, e com esse objetivo alguns trabalhos já foram realizados para identificar fontes de resistência à *Fop*. Rava et al. (1996), testando 99 genótipos (70 cultivares e 29 linhagens) de feijão-comum, relataram que somente seis das cultivares (IAPAR 44, Milionário 1732, FT Tarumã, Serrano, São José e Rico 1735) apresentaram resistência aos dois isolados utilizados. Maringoni & Lauretti (1999) publicaram que os genótipos Xan 160, PI 150414, A

417, PI 175829 roxo, Xan 161, A 420, PI 163117 e PI 175829 branco foram resistentes à *Fop*. Pereira et al. (2002) avaliaram a reação de 12 cultivares ao isolado FOP 46, observaram que Pérola, Vi 13-8-3, EEP 558, CF 880065, Vi 12-1-2, Vi 3-13-1, Vi 10-2-1, Vi 16-3-3, Carnaval e Novirex foram resistentes, enquanto Turmalina e Rosinha foram suscetíveis. Neste mesmo intuito, Brick et al. (2006) inocularam 194 acessos com às raças 1, 4 e 5 de *Fop*, e encontraram que 21, 15 e cinco genótipos foram resistentes à raça 1, raça 4 e às três raças, respectivamente. Avaliando a reação de 27 cultivares e 142 linhagens quanto a *Fop*, Rocha Júnior et al. (1998) encontraram que das cultivares avaliadas somente a Carioca MG, Ouro Negro, Diacol Calima, CNF 05, Jalo e Negro Argel comportaram-se como resistentes; das linhagens avaliadas oito apresentaram resistência e as 134 restantes apresentaram reações intermediárias ou de suscetibilidade. Com o propósito de avaliar as reações de 104 genótipos frente a quatro raças de *Fop*, Sala et al. (2006) encontraram que 35 mostraram-se resistentes. Nascimento et al. (1995b), visando a avaliação da reação de 46 variedades e 21 linhagens, encontraram que 21 variedades e 13 linhagens foram resistentes. Uma proporção muito maior de genótipos resistentes, se comparado com os trabalhos anteriormente citados, foi encontrado por Pastor-Corrales & Abawi (1987), em que 40 dos 66 genótipos testados foram resistentes. Esses autores justificaram este resultado relatando que os genótipos utilizados eram linhagens melhoradas e altamente produtivas.

Segundo Sartorato & Rava (1994), a resistência à murcha-de-fusário é mono ou oligogenicamente controlada. Entretanto, resultados contraditórios são encontrados na literatura. Cândida et al. (2009) com o objetivo de determinar o controle genético da resistência das cultivares de feijoeiro Milionário 1732 e FT-Tarumã quanto à *Fop*, conduziram famílias resultantes do cruzamento desses genitores com a cultivar suscetível Macanudo até a geração $F_{2,3}$. Esses autores concluíram, de acordo a segregação observada (1:2:1), que a resistência se tratava de ação gênica de dominância incompleta. Pereira et al. (2009) realizaram seis cruzamentos, que envolveram três cultivares resistentes a *Fop*: Carioca MG, ESAL 583 e ESAL 5660 e quatro suscetíveis: Carioca, CNFC 10443, Uirapuru e ESAL 522 para se estudar a herança desse caráter. Verificaram que o controle da característica envolve genes com dominância. Contudo, a presença de efeitos aditivos também foi expressiva. Brick et al. (2004) inocularam a raça 4 de *Fop* em progênies F_2 dos cruzamentos LEF-ERB x Viva, Sierra x Viva e LEF-ERB x Sierra, em que LEF-ERB e Sierra

eram cultivares resistentes e ‘Viva’ suscetível a *Fop*, com o objetivo de averiguar a herança dessa característica. Os autores concluíram que a resistência das cultivares LEF-ERB e Sierra à raça 4, foi devida a um único gene com efeito de dominância. Musoni et al. (2010) utilizaram as cultivares Vuninkingi (G685) e Flora como genitores doadores de resistência a *Fop* para a obtenção de famílias oriundas de cruzamentos com o genitor suscetível Umubano (G2333). Esta é a cultivar de feijão mais popular em Ruanda (África). De acordo com os resultados, concluíram que a resistência é governada por um gene dominante.

2.3.2. O patógeno causador da murcha-de-fusário do feijoeiro

A murcha-de-fusário é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, pertencente à divisão de fungos mitospóricos (imperfeitos), classe Hyphomycetes (conídios fora de corpos de frutificação) e ordem Tuberculariales (conidióforos agrupados em esporodóquio) (Alexopoulos et al., 1996). O *Fusarium oxysporum* é a espécie mais importante do gênero *Fusarium* (Sartorato & Rava, 1994).

Esse fungo produz macroconídios, microconídios e clamidósporos. Macroconídios são raros em algumas raças. Os microconídios podem ser ovais ou cilíndrico-elipsoidais, retos ou curvos, com três a cinco septos, medindo de 5 a 12 μm de comprimento e de 2,2 a 3,5 μm de largura. Os macroconídios são fusóides e pontiagudos nas duas extremidades, apresentam paredes finas e de três a sete septos. Os tamanhos dos macroconídios variam com relação ao número de septos e estes podem medir de 27 a 66 μm de comprimento e de 3 a 5 μm de largura. Os clamidósporos apresentam parede lisa ou rugosa são terminais ou intercalares, geralmente solitários, mas podem-se apresentar em pares ou cadeias (Sartorato & Rava, 1994). Em meio batata-dextrose-ágar (BDA) as colônias crescem rapidamente, em média 1,1 cm ao dia. No início os micélios que crescem sobre o meio apresentam coloração branca, mas com o passar do tempo adquirem coloração púrpura, alaranjada, azul escuro e roxa (Booth, 1977).

O primeiro relato da doença no Brasil foi na região de Laranjal Paulista, no estado de São Paulo, no ano de 1966. Em Minas Gerais, a doença foi primeiramente identificada no município de Mercês, na Zona da Mata, no ano de 1983, e posteriormente em Alto do Rio Doce, Viçosa e Coimbra (Zambolim et al., 1987).

2.3.3. Metodologias de inoculação, épocas e escalas de avaliação da severidade da murcha-de-fusário do feijoeiro

No melhoramento visando resistência às doenças a adoção de processos corretos visando à classificação de genótipos é de primordial importância. Assim, metodologias de inoculação e de avaliação e a decisão da melhor época para efetuá-las devem ser bem definidas. Deste modo, pode-se aumentar a eficiência do uso do tempo e de recursos e, sobretudo, garantir bons resultados.

Dongo & Müller (1969), em trabalho visando averiguar a reação de 103 variedades de feijão quanto à resistência à murcha-de-fusário, utilizaram a metodologia de inoculação desenvolvida por Weels et al. (1949) para inoculação do patógeno em ervilha. Esta metodologia consiste em se extrair plantas do substrato com 11 a 14 dias de idade, lavar as raízes e posteriormente cortar 1/3 do comprimento destas. Logo em seguida deve-se submergi-las em suspensão de esporos na concentração de $1,2 \times 10^6$ conídios mL^{-1} por 30 segundos. A época de avaliação neste trabalho não foi referida pelos autores.

Ribeiro & Hagedorn (1979) avaliaram os efeitos da temperatura e da concentração do inóculo na sintomatologia de cultivares de feijão quanto à murcha-de-fusário. Esses autores testaram as concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios mL^{-1} e as temperaturas de 20, 24 e 28°C. Para isso inocularam plantas de feijoeiro com sete dias de idade, empregando metodologia semelhante a utilizada por Dongo & Müller (1969), entretanto não especificaram a proporção de raízes que foram cortadas. As avaliações foram realizadas 30 dias após a inoculação (DAI). Estes autores relataram que apesar da temperatura de 28°C ser a ótima para crescimento do fungo *in vitro*, esta não foi eficiente para o desenvolvimento dos sintomas em plantas de feijão, sendo 20°C a melhor temperatura para isto. A concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} foi a que apresentou melhor eficácia para a classificação das cultivares de feijão.

Pastor-Corrales & Abawi (1987) realizaram modificações na metodologia de inoculação descrita por Ribeiro & Hagedorn (1979) e fizeram uso desta para realizar um trabalho visando estudar a reação de germoplasma de feijão frente à infecção por *Fop*. Assim, plantas de feijão foram retiradas do substrato e as raízes lavadas com água. Posteriormente as raízes foram cortadas em 1 cm e imersas numa suspensão de esporos na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} por 5 minutos. Estes mesmos

autores descrevem esta metodologia em Abawi & Pastor-Corrales (1990). As avaliações foram realizadas aos 15 e 22 DAI. Neste mesmo trabalho foi realizado outro experimento onde se almejava averiguar qual a melhor concentração da suspensão de conídios de *Fop*, visando o desenvolvimento de sintomas. Para tal, usaram a mesma metodologia descrita anteriormente e as seguintes concentrações da suspensão foram testadas: 0 (controle), 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 conídios mL⁻¹. Os autores, em acordo com Ribeiro & Hagedorn (1979), definiram que a melhor concentração da suspensão era de 1×10^6 conídios mL⁻¹. A presente metodologia de inoculação de *Fop* foi citada em diversos outros estudos que envolvem o patossistema *Fop*-feijoeiro, entretanto a idade das plantas no momento da inoculação e a época de avaliação variam. Alves-Santos et al. (2002), estudando a patogenicidade e a caracterização de raças de *Fop* em isolados provenientes da Grécia e Espanha, inocularam plantas com 8 a 10 dias após a emergência (DAE) e avaliaram as plantas em três épocas (28, 35 e 42 DAI). Woo et al. (1996), caracterizaram isolados de *Fop* com a utilização de técnicas moleculares, inocularam plantas de feijoeiro com 5 a 7 DAE e realizaram as avaliações entre 3 e 5 semanas após as inoculações. Rocha Júnior et al. (1998), estudaram a reação de cultivares à *Fop*, inocularam plantas de feijoeiro com aproximadamente 10 dias de idade e avaliaram o experimento aos 30 DAI.

Alguns trabalhos foram realizados utilizando-se metodologia de inoculação de *Fop* semelhante à realizada por Dongo & Müller (1969), mas fazendo uso da concentração da suspensão definida nos trabalhos de Ribeiro & Hagedorn (1979) e Pastor-Corrales & Abawi (1987). Assim, a inoculação consiste na extração das plantas de feijoeiro do substrato, lavagem das raízes, corte de 1/3 do comprimento dessas e imediata imersão na suspensão de 1×10^6 conídios mL⁻¹. Entretanto, nesses trabalhos a idade das plantas no momento da inoculação, o tempo de imersão na suspensão de conídios, e o período de avaliação dos sintomas causados pela murcha-de-fusário são variáveis. Cândida et al. (2009) e Costa et al., (2007) inocularam plantas com 8 DAE imergindo as raízes cortadas durante um minuto na suspensão de conídios e as avaliações foram realizadas 12 DAI. Rava et al. (1996), estudaram a reação de genótipos de feijoeiro comum quanto a *Fop*, também utilizaram o tempo de imersão das raízes na suspensão de conídios após corte de um minuto para inocular plantas com 8 DAE, entretanto avaliaram os sintomas aos 11 DAI. Nascimento et al. (1995a, 1995b), Maringoni & Lauretti (1999) e Pereira et al. (2002), inocularam plantas com 7 DAE imergindo as raízes na suspensão de conídios

por 10 minutos e as avaliações foram realizadas aos 30 DAI. Pereira et al. (2009) e Pereira et al. (2011), visaram estudar o controle genético da resistência de genótipos de feijoeiro quanto a *Fop* e a reação de linhagens de feijoeiro quanto à *Fop*, respectivamente, inocularam plantas com 9 a 10 dias após a semeadura e avaliaram os experimentos aos 21 DAI.

Cavalcanti et al. (2002) realizaram um experimento com a finalidade de comparar duas metodologias de inoculação de *Fop* no feijoeiro. Uma das metodologias de inoculação consistiu na perfuração do solo e conseqüentemente ferimento das raízes das plantas de feijão e deposição de 10 mL de suspensão de conídios. No outro método, as plantas foram obtidas em areia lavada com posterior arranquio e lavagem das raízes em água corrente. Em seguida, foi cortado 1 cm das raízes. Imediatamente após o corte as raízes foram imersas numa suspensão de conídios por cinco minutos. Em ambas as metodologias as plantas foram inoculadas com sete dias de idade e a concentração da suspensão utilizada foi de 1×10^6 conídios mL⁻¹. Foram realizadas avaliações aos 15, 20, 25 e 30 DAI. Os autores relataram a melhor eficiência do método de imersão de raízes e da época de avaliação de 30 DAI.

Pereira et al. (2008) estudaram estratégias de seleção de feijoeiros quanto à resistência à murcha-de-fusário. Compararam sete metodologias de inoculação, em quatro linhagens de feijoeiro. Nesse trabalho, um experimento foi conduzido com o objetivo de verificar a melhor época de avaliação dos sintomas da murcha-de-fusário. Assim, avaliaram 18 linhagens com 15 repetições aos 7, 14, 21 e 28 DAI. Nesse experimento também foi simulado o efeito do número de repetições. A concentração da suspensão utilizada em ambos os experimentos foi de 1×10^6 conídios mL⁻¹. Dentre as metodologias de inoculação testadas as que apresentaram maior eficiência foram as com imersão das raízes na suspensão de conídios por cinco minutos, com ou sem corte das raízes. A melhor época de avaliação foi aos 21 DAI e os autores concluíram que cinco plantas são suficientes para discriminar eficientemente linhagens de feijoeiro quanto a reação a *Fop*.

As metodologias de inoculação, o tempo de imersão das raízes na suspensão de conídios e a época de avaliação dos sintomas causados por *Fop* não estão definidos. Para uma mesma metodologia de inoculação trabalhos realizaram avaliações entre 11 e 30 DAI. Os tempos de imersão encontrados variam de 30 segundos a 10 minutos. As metodologias de inoculação mais utilizadas são semelhantes, no entanto são

muito agressivas e existem tentativas de se desenvolver uma nova forma de inoculação. Algumas metodologias já foram testadas, porém apenas aquelas envolvendo o corte de raízes e imersão na suspensão de conídio têm se mostrado eficientes. A utilização da concentração da suspensão de conídios (1×10^6 conídios mL^{-1}) parece ser consenso entre os pesquisadores e vêm sendo utilizada nos trabalhos mais recentes. As discordâncias encontradas nos trabalhos aqui discutidos podem estar gerando divergências e erros, de forma que a padronização dos processos se faz necessária.

Até o presente momento, cinco metodologias para avaliação da severidade da murcha-de-fusário no feijoeiro foram propostas. As mesmas encontram-se descritas abaixo.

Índice de severidade de murcha-de-fusário desenvolvido pelo CIAT (Pastor-Corrales & Abawi, 1987), cujos valores variam de 1 a 9, no qual: 1 = plantas sem sintomas da doença; 3 = poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, que representam 10% ou menos da folhagem), sintoma acompanhado de descoloração vascular limitada aos tecidos radiculares e ao hipocótilo; 5 = aproximadamente 25% das folhas e hastes com murcha e clorose; 7 = aproximadamente 50% das folhas e hastes com murcha, clorose e necrose limitada; planta com nanismo e 9 = 75% ou mais das folhas e dos ramos com murcha, nanismo severo e necrose com desfolha prematura, o que frequentemente resulta em morte da planta. São considerados resistentes linhagens com nota média de 1 a 3; de 3,1 a 6, intermediárias e, de 6,1 a 9, suscetíveis.

A escala proposta por Nascimento et al. (1995a, 1995b), possui 5 notas de severidade, em que: 0 = ausência de sintomas; 1 = ausência de sintomas externos de murcha e presença de escurecimento vascular confinado a raiz principal; 2 = sintomas iniciais de clorose e murcha; e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule; 3 = sintomas bem definidos da doença (clorose, murcha, lesões foliares e seca das folhas) e escurecimento vascular visível no terço médio da planta; 4 = sintomas bem definidos da doença e escurecimento visível no terço superior da planta ou plantas mortas. Nessa escala é considerada reação de resistência linhagens apresentando nota média abaixo de 2 e média acima desta, suscetível.

Escala de 9 notas foi proposta por Rava et al. (1996), onde: 1 = ausência de sintomas; 2 = até 5% da folhagem com sintomas de murcha; 3 = 6 a 10% da folhagem com sintomas de murcha; 4 = 11 a 15% da folhagem com sintomas de murcha; 5 = 16 a 25% da folhagem com sintomas de murcha; 6 = 26 a 35% da

folhagem com sintomas de murcha; 7 = 36 a 50% da folhagem com sintomas de murcha; 8 = 51 a 75% da folhagem com sintomas de murcha e, 9 = mais de 75% da folhagem com sintomas de murcha. Neste trabalho não foi indicada nota média para aferição de resistência e suscetibilidade, no entanto, sugerem utilizar o teste de Dunnett à 5% de significância para comparação das notas de severidade. Desse modo, utilizaram duas linhagens de testemunhas, sendo uma sabidamente resistente e outra suscetível. As linhagens que não diferirem da testemunha resistente e da suscetível, respectivamente, serão consideradas resistentes e suscetíveis. As demais linhagens serão intermediárias.

Ribeiro & Hagedorn (1979), propuseram escala de 5 notas para avaliação dos sintomas causados por *Fop*, em que: 1 = plantas com escurecimento vascular, mas sem sintomas externos; 2 = plantas com sintomas externos leves, mas com recuperação; 3 = plantas com clorose, nanismo, folhas caídas prematuramente, mas plantas ainda vivas; 4 = plantas com desfolha severa e plantas mortas e 5 = plantas mortas. Plantas que com notas de 1 e 2, são consideradas resistentes; 3, reação intermediária e, acima desta suscetíveis.

Ribeiro & Ferraz (1984), usaram escala de avaliação da severidade da murcha-de-fusário com seis notas baseadas na descoloração vascular e na recuperação do patógeno, ou seja, no reisolamento do mesmo do caule das plantas. As notas eram aferidas do seguinte modo: 0 = nenhuma descoloração/recuperação; 1 = até 3 cm de altura; 2 = até 6 cm de altura; 3 = até 9 cm de altura; 4 = até 12 cm de altura e 5 = Até 15 cm de altura. Plantas que apresentaram o nota 0, são consideradas imunes; nota 1 e 2, resistentes; nota 3, intermediárias e, 4 e 5 suscetíveis.

Conforme visto, as metodologias de avaliação da severidade da murcha-de-fusário adotam diferentes formas de avaliação e sintomas a serem julgados. Algumas metodologias são de difícil utilização e deste modo podem gerar erros exacerbados por parte dos avaliadores. A metodologia proposta por Ribeiro & Ferraz (1984), apesar de interessante, uma vez que diminui o efeito do avaliador, é inviável quando se deseja avaliar um grande número de genótipos. A proposta por Rava et al. (1996), aborda somente a murcha como sintoma a ser observado, assim a acérea na discriminação dos genótipos pode ser comprometida, visto que a murcha é apenas um dos sintomas da murcha-de-fusário.

Todas as escalas apresentadas desconsideraram o sintoma redução do crescimento (Ribeiro & Hagedorn, 1979; Ribeiro & Ferraz, 1984; Pastor-Corrales &

Abawi, 1987; Nascimento et al., 1995; Rava et al., 1996). A escala proposta por Pastor-Corrales & Abawi (1987) leva em consideração o nanismo, que seria o extremo da redução do crescimento. Segundo Bianchini et al. (1997), a redução do crescimento é observada quando plantas jovens são infectadas. Assim é esperado que esse sintoma fosse algumas vezes observado, pois, em trabalhos com *Fop* plantas de feijoeiro são inoculadas em torno dos 10 dias de idade. De modo geral, em trabalhos para avaliação de genótipos de feijão quanto à resistência à murcha-de-fusário, empregam-se como controle alguns genótipos sabidamente resistentes e suscetíveis, de modo que a redução do crescimento não é geralmente percebida, uma vez que não se tem o mesmo genótipo não inoculado como base para comparação.

2.3.4. Mecanismos de resistência às murchas vasculares com ênfase na murcha-de-fusário do feijoeiro

Na natureza, as plantas estão expostas a uma quantidade incalculável de microrganismos, entretanto somente alguns são agentes fitopatogênicos. Desta forma, pode-se dizer que a resistência é regra e a suscetibilidade exceção. A interação compatível entre dois organismos resultando em doença é resultado da co-evolução entre patógeno e hospedeiro (Pascholati & Leite, 1995). A resistência pode ser entendida como o resultado de todos os fatores, os quais tendem a diminuir a agressividade ou a atividade patogênica de um patógeno quando em contato com um potencial hospedeiro (Barnett, 1959).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em estruturais, que funcionam como barreiras físicas impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos e, bioquímicos que tendem a gerar condições adversas ao patógeno. Ambos os mecanismos podem ter respostas formadas pré e pós-infecção (Pascholati & Leite, 1995).

Duas condições necessitam ser atendidas para a instalação das murchas vasculares: o patógeno deve conseguir entrar no sistema vascular e posteriormente continuar se desenvolvendo dentro dele (Talboys, 1972). Assim, plantas que apresentem células da epiderme e do córtex mais cutinizadas e/ou suberizadas tendem a ser mais resistentes a patógenos causadores de murchas vasculares por dificultar a entrada e a colonização. Do mesmo modo atuam a hipertrofia das paredes celulares com deposição de lignina e a produção de tiloses. A produção de

substâncias como géis, gomas, caloses e outras nas células do xilema, também são sabidamente responsáveis pela resistência de plantas a patógenos causadores de murchas. Estas substâncias funcionam como barreiras ao desenvolvimento dos patógenos, dificultando o desenvolvimento de hifas de fungos e a livre circulação de esporos e células bacterianas pelos elementos de vaso do xilema. De forma semelhante aos mecanismos de resistência estruturais, produtos químicos podem estar relacionados à resistência por impedir a entrada e a colonização do sistema vascular por patógenos causadores de murchas. As fitoalexinas e algumas substâncias relacionadas à terpenóides são as substâncias químicas mais citadas quando se trata de resistência à murchas vasculares (Barnett, 1959; Beckman et al., 1961; Beckman, 1964; Dimond, 1970; Talboys, 1972).

Estudos a respeito do processo infeccioso e dos mecanismos de resistência à *Fop* no feijoeiro são escassos. Existem evidências da não existência de imunidade do feijoeiro quanto a *Fop*. Dongo & Müller (1969) e Ribeiro & Ferraz (1984), em trabalhos visando a seleção de cultivares de feijoeiro resistentes à murcha-de-fusário, relataram ter isolado *Fop* dos tecidos de caule das linhagens que não apresentavam sintomas externos da doença, mesmo sem observação de escurecimento vascular.

López-Duque & Müller (1969) realizaram estudos histológicos com a utilização de microscopia de luz em cultivares de feijão resistentes e suscetíveis a *Fop*, e relataram a presença de gomas no xilema do caule de cultivares de feijão infectadas por *Fop*. No entanto, deduziram que estas substâncias não estavam envolvidas na resistência, pois as maiores severidades dos sintomas correlacionaram-se com as maiores quantidades de gomas. Estes mesmos autores não observaram diferenças anatômicas em tecidos de caule de cultivares de feijoeiro tolerantes e suscetíveis quando inoculadas com *Fop*.

Alguns estudos têm sugerido que a arquitetura do sistema radical e a presença de numerosas raízes adventícias em plantas de feijoeiro têm contribuído para a resistência desta leguminosa à *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Snapp et al., 2003; ; Román-Avilés et al., 2004; Cichy et al., 2007). Nenhum estudo específico com este mesmo objetivo foi realizado para *Fop*. Entretanto, Dongo & Müller (1969) relataram que algumas variedades de feijão resistentes apresentavam raízes laterais em maior número e vigor se comparadas às variedades suscetíveis a *Fop*.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S. Root Rots. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.) **Bean production problems in the tropics**. 2nd. Ed. CIAT, Cali, 1989. p. 105-157.

ABAWI, C.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rots of bean in Latin American and África: diagnosis, research methodologies, and management strategies**. CIAT, Cali, 1990. 114 p.

ABREU, A.F.B.; CARNEIRO, J.E.S.; RAMALHO, M.A.P.; MELO, L.C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PEREIRA FILHO, I.A.; MARTINS, M.; PEREIRA, H.S.; CARNEIRO, P.C.S.; DEL GIÚDICE, M.P.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; DEL PELOSO, M.J.; FARIA, L.C.; SANTOS, J.B.; COSTA, J.G.C.; MOREIRA, J.A.A.; WENDLAND, A. BRSMG Madrepérola: cultivar de feijão tipo carioca com escurecimento tardio dos grãos. Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP), Santo Antônio de Goiás, 4 p. 2011. **Comunicado Técnico, 200**.

ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.S.; CARNEIRO, J.E.S.; DEL GIUDICE, M.P.; PAULA JÚNIOR, T.J.; FARIA, L.C.; MELO, L.C.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; PEREIRA FILHO, I.A.; MARTINS, M.; RAVA, C.A.; COSTA, J.G.C. BRSMG Majestoso: mais uma opção de cultivar de grão carioca para o Estado de Minas Gerais. Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP), Santo Antônio de Goiás, 2 p. 2006. **Comunicado técnico, 134**.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.J.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4.ed. New York: J. Wiley, 1996. 880 p.

ALVES-SANTOS, F.M.; CORDEIRO-LOPEZ, L.; SAYAGUÉS, J.M.; MARTÍN-DOMINGUES, R.; GARCIA-BENAVIDES, P.; CRESPO, M.C.; DÍAS-DOMINGUES, 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.

ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; ARRUDA, K.M.A.; SILVA, M.G.M.; CHAGAS, J.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Reação do cultivar de feijoeiro-comum Vermelhinho à ferrugem, antracnose e mancha-angular. **Revista Ceres**, 56:164-170, 2006.

AMARO, G.B.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; SILVA, F.B. Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with carioca-type grains for resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, 30:584-588, 2007.

ARANTES, L.O.; ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P. Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 10:232-237, 2010.

BARNETT, H.L. Plant disease resistance. **Annual Review Microbiology**, 13:191-210, 1959.

BECKMAN, C.H. Host responses to vascular infection. **Annual Review of Phytopathologic**, 2:231-252, 1964.

BECKMAN, C.H.; MACE, M.E.; HALMOS, S.; McGAHAN, M.W. Physical barriers associated with resistance in fusarium wilt of bananas. **Phytopathology**, 51:507-515, 1961.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In. KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. V. 2, pp.376-399.

BOOTH, C. **Fusarium: laboratory guide to the identification of the major species**. Common wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1977.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão**. 2. Ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. pp. 13-18.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 4.ed. Viçosa: UFV, 2005. v.1. 525 p.

BOTELHO, F.B.S.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; ROSA, H.J.A. Multiline as a strategy to reduce damage caused by *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Journal of Phytopathology**, 159:175-180, 2011.

BRICK, M.A.; BYRNE, P.F.; SCHWARTZ, H.F.; OGG, J.B.; OTTO, K.; FALL, A.L.; GILBERT, J. Reaction of three races of *Fusarium* wilt in the *Phaseolus vulgaris* core collection. **Crop Science**, 46:1245-1252, 2006.

BRICK, M.A.; OGG, J.B.; SCHWARTZ, H.F.; BYRNE, P.F.; KELLY, J.D. Resistance to multiple races of *Fusarium* wilt in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:131-132, 2004.

CAMARGO, L.E.A. Análise da Resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 470-491.

CÂNDIDA, D.V.; COSTA, J.G.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, M.S. Controle genético da murcha de fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum. **Tropical Plant Pathology**, 34:379-384, 2009.

CARNEIRO, J. E.S.; SILVA, L.C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; ARAÚJO, G.A.A.; CARNEIRO, P.C.S.; GIÚDICE, M.P.; MENEZES JÚNIOR, J.A.N.; RAMALHO, M.A.P.; DEL PELOSO, M.J.; ABREU, A.F B.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. ‘Ouro Vermelho’: New red bean cultivar for Minas Gerais, Brasil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 49:281-282, 2006.

CARNEIRO, J.E.S.; FARIA, L.C.; PEREIRA, P.A.A.; DEL PELOSO, M.J. RAVA, C.A.; COSTA, J.G.C.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; CABRERA DÍAS, J.L. MELO, L.C.; MESQUITA, A.N.; FARIA, J.C.; SILVA, H.T.; SARTORATO,

A.; BASSINELO, P.Z.; ZIMMERMANN, F.J.P. BRS Campeiro: a new black bean cultivar recommended for the south region of Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 47:313-314, 2004.

CARRIJO, I.V.; CHAVES, G.M.; PEREIRA, A.A. Reação de vinte e cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* a trinta e nove raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth., em condições de casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, 5:245-255, 1980.

CAVALCANTI, L.S.; COELHO, R.S.B.; PEREZ, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, 32:1-5, 2002.

CICHY, K.A.; SNAPP, S.S.; KIRK, W.W. Fusarium root rot incidence and root architecture in grafted common bean lines. **Plant Soil**, 300:233-244, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção de feijão 1^a, 2^a e 3^a safras.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 18 out. 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Estudos de prospecção de mercado – Safra 2008/2009.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/d0137017babb4acfd60b29cf534b609a..pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2013.

COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; PURÍSSIMO, J.D. Linhagens de feijoeiro comum resistentes a murcha-de-fusarium. Embrapa Arroz e Feijão, 2006. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 21.**

COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; PURÍSSIMO, J.D. Obtenção de linhagens de feijoeiro comum resistentes a murcha-de-fusário. **Revista Ceres**, 54:447-542, 2007.

COUTO, M.A.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, J.L. Melhoramento do feijoeiro comum com grão tipo carioca, visando resistência à antracnose e à mancha angular. **Ciência e Agrotecnologia**, 32:1643-1648, 2008.

CRUTE, I. C.; PINK, D. A. Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. **The Plant Cell**, 8:1747-1755, 1996.

DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; KIIHL, R.A.S.; HIROMOTO, D.M.; ABDELNOOR, R.V. Quebra de resistência da cv. Hartwig por população de campo do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33:971-974, 1998.

DIMOND, A.E. Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome. **Annual Review of Phytopathologic**, 8:301-322, 1970.

DONGO, S.L.; MÜLLER, L.E. Estudios sobre la patogenicidad de *Fusarium osysporum* f. sp. *phaseoli* en el frijol. II. Pruebas varietales. **Turrialba**, 19:82-90, 1969.

FALEIRO, F.G.; VINHADELI, W.S.; RAGAGNIN, V.A.; PAULA JÚNIOR, T.J.; MOREIRA, M, A.; BARROS, E.G. Resistência do feijoeiro-comum a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, 46:11-18, 1999.

FERREIRA, C.M.; DEL PELOSO, M.J.; FARIA, L.C. **Feijão na economia nacional**. Embrapa - CNPAF, 2002. 47 p. (Documentos, 135).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Faostat**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acessado em: 19 novembro. 2012.

GONÇALVES, M.C.; SANTOS, A.S.; MAIA, I.G.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R. Caracterização de um isolado do *Sugarcane mosaic virus* que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, 32:32-39, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Agropecuário - Agricultura Familiar 2006**. Comunicação Social, IBGE, 2009. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1466>. Acesso em 11 de novembro de 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores IBGE – Estatística da produção agrícola**. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf> Acesso em 11 de novembro de 2012.

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**, 22:270-271, 1997.

JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopathologic**, 22:309-330, 1984.

LÓPEZ-DUQUE, S.L.; MÜLLER, L.E. Estudio sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en frijol. I. Patogenesis histológica sintomatológica. **Turrialba**, 19:71-81, 1969.

MARCONDES, E.H.K.; SANTOS, J.B.; PEREIRA, H.S. Seleção de linhagens de feijoeiro com tipo de grão carioca e com os alelos *co-4* e *co-5* de resistência à antracnose. **Ciência e Agrotecnologia**, 34:975-982, 2010.

MARINGONI, A.C.; LAURETTI, R.L.B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34:535-542, 1999.

MATIELLO, R.R.; BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Resistência de plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, 27:161-168, 1997.

MARTINELLI, J.A. Uso de misturas varietais para o controle de doenças de plantas. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1:121-125, 1993.

MELO, C.L.P.; CARNEIRO, J.E.S.; CARNEIRO, P.C.S.; CRUZ, C.D.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Linhagens de feijão do cruzamento 'Ouro Negro' x 'Pérola' com características agronômicas favoráveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:1593-1598, 2006.

MENEZES JÚNIOR, J.A.N.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Seleção recorrente para três caracteres do feijoeiro. **Bragantia**, 67:833-838, 2008.

MENTEN, J.O.M; MORAES, M.H.D.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; ITO, M.A. Qualidade das sementes de feijão no Brasil. **Pesquisa & Tecnologia**, 2006. Disponível em: < http://www.aptaregional.sp.gov.br/index.php/component/docman/doc_view/404-qualidade-das-sementes-de-feijao-no-brasil?Itemid=284>. Acesso em: 13 de novembro de 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **BRASIL PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO 2011/2012 a 2021/2022**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: Acesso em 11 de novembro de 2012.

MUSONI, A.; KIMANI, P.; NARLA, R.D.; BURUCHARA, R.; KELLY, J. Inheritance of fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) resistance in climbing beans. **African Journal of Agricultural Research**, 5:399-404, 2010.

NASCIMENTO, S.R.C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A.C. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 20:214-217, 1995a.

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

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, pp. 417-453.

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

PAULA JÚNIOR, T.J.; CARNEIRO, J.E.S.; VIEIRA, R.F.; ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P.; DEL PELOSO, M.J.; TEIXEIRA, H. **Cultivares de feijão comum para Minas Gerais**. EPAMIG, Belo Horizonte, 2010. 40 p.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, 25:99-112, 2004.

PEREIRA, H.S.; SANTOS J.B.; ABREU, A.F.B. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnose selecionadas quanto a características agronômicas desejáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39:209-215, 2004.

PEREIRA, J.M.; VIEIRA, R.F.; MARARRA, L.O. Reação de cultivares e linhagens de feijão a murcha-de-fusarium. **Revista Ceres**, 49:71-74, 2002.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Estratégias para a eficiência da seleção de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusário. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43:721-728, 2008.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* brazilian race 2 in common bean. **Scientia Agrícola**, 66:788-792, 2009.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, 35:940-947, 2011.

PORCH, T.G. List of genes: *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative (BIC)**, 2010. Disponível Em: <http://www.css.msu.edu/bic/PDF/Bean_Genes_List_2010.pdf>. Acesso em 10 de novembro de 2012.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; CARNEIRO, J.E.S. Cultivares. **Informe Agropecuário**, 25:99-112, 2004.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; CARNEIRO, J.E.S.; GONÇALVES, F.M.A.; SANTOS, J.B.; DEL PELOSO, M.J.; FARIAS, L.C.; CARNEIRO, G.E.S.; PEREIRA FILHO, I.A. O 'Talismã' de sua lavoura de feijoeiro. Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP), Santo Antônio de Goiás, 4 p. 2002. Comunicado Técnico, 36.

RAMALHO, M.A.P.; ARAÚJO, L.C.A. Breeding self-pollinated plants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, S1:1-7, 2011.

RAVA, C.A.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, 19:167-172, 1994.

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**, 21:296-300, 1996.

RIBEIRO, R.L.D.; HAGEDORN, D.J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* the causal agent of bean yellows. **Phytopathology**, 69:272-276, 1979.

RIBEIRO, C.A.G.; FERRAZ, S. Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 9:37-44, 1984.

ROCHA JÚNIOR, W.C.; SANTOS, J.B.; MENDES-COSTA, M.C. Reação de cultivares e linhagens de feijão à *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 23:407-409, 1998.

ROMÁN-AVILÉS, B.; SNAPP, S.S.; KELLY, J.D. Assessing root traits associated with root rot resistance in common bean. **Field Crops Research**, 86:147-156, 2004.

SALA, G.M.; ITO, M.F.; CARBONELL, S.A.M. Reação de genótipos de feijoeiro comum a quatro raças de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, 32:286-287, 2006.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Murcha ou amarelecimento de Fusarium. In: SARTORATO, A. RAVA, C.A. (Eds). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Embrapa-SPI. 1994. p 175-190.

SNAPP, S.; KIRK, W.; ROMÁN-AVILÉS, B.; KELLY, J. Root traits play a role in integrated management of *Fusarium* root rot in snap beans. **HortScience**, 38:187-191, 2003.

TALBOYS, P.W. Resistance to vascular wilt fungi. **Proceedings of the Royal Society**, 181:319-332, 1972.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 231 p.

WANDER, A.E.; CHAVES, M.O. Consumo per capita de feijão no Brasil de 1998 a 2010: uma comparação entre consumo aparente e consumo domiciliar. **10º Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão (CONAFE)**, 2011. Goiânia, Anais... Goiânia: Embrapa Arros e Feijão, 2011.

WELLS, D.G.; HARE W.W.; WALKER J.C. Evaluation of resistance and susceptibility in garden peas to near wilt in the greenhouse. **Phytopathology**, 39:771-779, 1949.

WHITE, J. W. Implications of carbon isotope discrimination studies for breeding common bean under water deficits. In: EHLRINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D.; SAUGIE, B. (Ed.). **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 387-398.

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**, 86:966-973, 1996.

ZAMBOLIM, L.; VIEIRA, C.; ARAÚJO, G.A.A.; CHAGAS, J.M.; SILVA, C.C.
Ocorrência de murcha-de-fusarium em feijoeiros na zona da mata de Minas Gerais.
Fitopatologia Brasileira, 12:287-288, 1987.

CAPÍTULO 1

METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA MURCHA-DE-FUSÁRIO DO FEIJOEIRO

RESUMO - O objetivo com este trabalho foi propor uma nova escala de avaliação da severidade da murcha-de-fusário que considerasse, além dos sintomas clássicos da doença, a redução do crescimento dos feijoeiros e comparar com quatro escalas já existentes. Também se objetivou averiguar a possibilidade da utilização da porcentagem relativa da massa fresca e seca de plantas inoculadas em relação às testemunhas sadias na avaliação da resistência de linhagens quanto à murcha-de-fusário. Para isso, foi conduzido um experimento com as linhagens BRS Executivo, BRS Horizonte, BRS Cometa, Diacol Calima, Manteigão Fosco 11, CVIII-85-11, VP11, VC1, VC12, CNFR8149, Carnaval, MAI-2-5, RP2, VP8 e Meia Noite. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições, sendo cada parcela representada por um vaso com três plantas. As inoculações foram realizadas 10 dias após o plantio, utilizando-se suspensão de macro e microconídios de *Fusarium oxysporum* na concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹. As avaliações da severidade da murcha-de-fusário foram realizadas aos 21 dias após as inoculações fazendo-se uso de quatro escalas já descritas e por uma nova proposição (Escala relativa a plantas sadias - RPTS). Para avaliação com a nova escala foi conduzido junto a cada parcela um vaso com três plantas, onde essas passaram pelo processo de inoculação, contudo utilizando-se água destilada em substituição a suspensão de conídios. Após as avaliações com as escalas, as plantas foram cortadas na altura do nó cotiledonar e logo em seguida pesadas. Essas foram levadas à estufa de secagem a 65°C por 72 horas e novamente pesadas. Esse mesmo procedimento também foi realizado para as parcelas de testemunhas sadias. As massas das plantas testemunhas sadias frescas e secas foram utilizadas para se calcular a porcentagem relativa das massas das plantas inoculadas frescas (%MF) e secas (%MS) em relação às testemunhas sadias, respectivamente. A escala RPTS, proposta neste trabalho, é mais precisa em comparação com as metodologias anteriormente descritas e elimina o problema da não avaliação do sintoma de redução do crescimento das plantas. A

utilização das %MF e %MS são viáveis para a discriminação de linhagens quanto à resistência à murcha-de-fusário.

Palavras chave: *Fusarium oxysporum*, feijoeiro-comum, metodologias de avaliação.

METHODOLOGIES FOR ASSESSING THE SEVERITY OF FUSARIUM WILT IN COMMON BEAN

ABSTRACT – The aim of this study was to propose a new scale for assessing the severity of Fusarium wilt which, in addition to the classic symptoms of the disease, considers reduction in common bean growth; and to compare the scale to four scales which already exist. The aim was also to examine the possibility of the use of the relative percentage of fresh matter and dry matter of inoculated plants in relation to healthy controls in assessment of resistance of the lines in regard to Fusarium wilt. For that purpose, we conducted an experiment with the lines BRS Executivo, BRS Horizonte, BRS Cometa, Diacol Calima, Manteigão Fosco 11, CVIII-85-11, VP11, VC1, VC12, CNFR8149, Carnaval, MAI-2-5, RP2, VP8 and Meia Noite. The experimental design was randomized blocks with four replications, each plot consisting of a pot with three plants. We inoculated the plants ten days after planting using a suspension of *Fusarium oxysporum* macro- and microconidia at the concentration of 1×10^6 conidia mL⁻¹. The severity of Fusarium wilt was assessed at 21 days after inoculations using the four already existing scales and the newly proposed scale (Healthy control plant relative scale - HCPR). For assessment with the new scale, we set up a pot with three plants together with each plot. These plants passed through the inoculation process, but distilled water was used instead of the conidium suspension. After assessments with the scales, the plants were cut at the height of the cotyledonary node and weighed soon afterwards. They were placed in a laboratory drying oven at 65°C for 72 hours and weighed once more. This same procedure was also used for the healthy control plots. The fresh weight and dry weight of the healthy control plants were used to calculate the relative percentage of the fresh weight (%FW) and the dry weight (%DW) of the inoculated plants in relation to the healthy controls respectively. The HCPR scale, proposed in this study, is more precise in comparison to the previously described methodologies and eliminates the problem of lack of assessment of the reduction in plant growth

symptom. Use of the %FW and %DW are viable for discrimination of common bean lines in regard to resistance to *Fusarium* wilt.

Key words: *Fusarium oxysporum*, common bean, assessment methodologies.

1. INTRODUÇÃO

A murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), é uma das principais doenças que tem causado prejuízo em lavouras de feijão no Brasil. Isto vem ocorrendo devido, principalmente, ao intenso cultivo dessa leguminosa associado à falta de medidas preventivas de controle e da disseminação do patógeno (Paula Júnior et al., 2006). Para esta enfermidade, não existe controle após o aparecimento dos sintomas, e a utilização de cultivares resistentes é o método de controle mais eficiente (Vieira, 1983).

Como sintoma inicial da murcha-de-fusário, é observado o amarelecimento das folhas basais do feijoeiro que progride posteriormente para as folhas da parte superior. Algumas vezes é também possível observar a murcha das folhas, o que pode acarretar em casos mais severos em morte das plantas. O crescimento do fungo no interior dos vasos pode dar ao tecido vascular coloração enegrecida podendo facilmente ser observado em cortes transversais de caules doentes (Vieira, 1983; Abawi, 1989). Quando plantas jovens são afetadas observa-se redução do crescimento e nanismo (Abawi, 1989).

Em programas de melhoramento visando resistência às doenças, a avaliação fenotípica dos sintomas é etapa crucial. De forma geral, a avaliação da severidade da murcha-de-fusário é realizada por escalas de notas. Essas escalas são visuais e se baseiam em clorose e murcha das folhas, escurecimento vascular, nanismo e morte de plantas (Ribeiro & Hagedorn, 1979; Ribeiro & Ferraz, 1984; Pastor-Corrales & Abawi, 1987; Nascimento et al., 1995; Rava et al., 1996). Cabe ressaltar que as escalas propostas nem sempre contemplam os diferentes tipos de sintomas e não apresentam padronização, dificultando o processo de avaliação.

A redução do crescimento das plantas provocado pela murcha-de-fusário (Abawi, 1989), de modo geral, não é levada em consideração em nenhuma das escalas de avaliação da severidade da doença (Ribeiro & Hagedorn, 1979; Ribeiro & Ferraz, 1984; Pastor-Corrales & Abawi, 1987; Nascimento et al., 1995; Rava et al.,

1996). A redução do crescimento das plantas não é relatada na maioria dos trabalhos conduzidos com inoculação artificial, pois somente com a utilização de testemunhas sadias de cada genótipo avaliado, seria possível a constatação desse tipo de sintoma. Assim, a utilização de testemunhas sadias de cada linhagem em avaliação permitiria maior precisão no processo de avaliação. Com a utilização das escalas atuais, muitos genótipos classificados como resistentes podem, na verdade, apresentar reação intermediária, pois apesar de não apresentar murcha das folhas, podem apresentar redução do crescimento.

O objetivo com este trabalho foi propor uma nova escala de avaliação da severidade da murcha-de-fusário que considerasse, além dos sintomas clássicos da doença, a redução do crescimento dos feijoeiros e comparar com quatro escalas já existentes. Também se objetivou averiguar a possibilidade da utilização da porcentagem relativa da massa fresca e seca de plantas inoculadas em relação às testemunhas sadias na avaliação da resistência de linhagens quanto à murcha-de-fusário.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para comparar diferentes metodologias de avaliação da severidade da murcha-de-fusário no feijoeiro, foi conduzido um experimento em Viçosa, Minas Gerais, em casa de vegetação. Foram avaliadas 15 linhagens (BRS Executivo, BRS Horizonte, BRS Cometa, Diacol Calima, Manteigão Fosco 11, CVIII-85-11, VP11, VC1, VC12, CNFR8149, Carnaval, MAI-2-5, RP2, VP8 e Meia Noite) no delineamento de blocos casualizados com quatro repetições. Essas linhagens foram selecionadas visando que as classes resistente, intermediária e suscetível fossem representadas. A parcela foi representada por um vaso com três plantas.

Nas inoculações foi utilizado o isolado monospórico FOP-UFV-01, o qual foi obtido de plantas da cultivar Meia Noite com sintomas da murcha-de-fusário. Para a produção de inóculo, pequenos segmentos de 0,4 cm de diâmetro de uma colônia de *Fop* foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) com posterior incubação em BOD a 24°C, durante 10 dias sob luz contínua. Após esse período, foi preparada uma suspensão de conídios utilizando água destilada, na concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹.

Sementes de cada linhagem foram pré-germinadas em papel germiteste em câmara de germinação à 25°C e umidade de 100% por 24 h. Em seguida, as plântulas foram transferidas para bandejas de isopor com 128 células de 30 mL contendo substrato (Tropstrato HT®, Vida Verde, Mogi Mirim, SP, Brasil), em casa de vegetação. As inoculações foram realizadas 10 dias após o plantio de acordo com o seguinte procedimento: plantas de cada linhagem foram cuidadosamente retiradas das bandejas e suas raízes lavadas em água corrente. Em seguida, 1/3 do comprimento das raízes foram cortadas com o auxílio de uma tesoura. Imediatamente, as raízes foram imersas em suspensão de macro e microconídios de *Fop* durante cinco minutos. Após esse período, as plantas foram transplantadas em vasos plásticos contendo 2,5 L de substrato e mantidas em casa de vegetação até o momento da avaliação. Sempre que necessário, os vasos foram regados com 250 mL de água.

A avaliação da reação das linhagens a murcha-de-fusário foram realizadas aos 21 dias após as inoculações (DAI) (Pereira et al., 2008), por meio de sete metodologias (escalas), conforme descrito a seguir:

A escala proposta por Nascimento et al. (1995) (NA), possui 5 notas de severidade, em que: 0 = ausência de sintomas; 1 = ausência de sintomas externos de murcha e presença de escurecimento vascular confinado a raiz principal; 2 = sintomas iniciais de clorose e murcha; e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule; 3 = sintomas bem definidos da doença (clorose, murcha, lesões foliares e seca das folhas) e escurecimento vascular visível no terço médio da planta; 4 = sintomas bem definidos da doença e escurecimento visível no terço superior da planta ou plantas mortas. Nessa escala é considerada reação de resistência linhagens apresentando nota média abaixo de 2 e média acima desta, suscetível.

Índice de severidade de murcha-de-fusário desenvolvido pelo CIAT (Pastor-Corrales & Abawi, 1987) (PCA), cujos valores variam de 1 a 9, no qual: 1 = plantas sem sintomas da doença; 3 = poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, que representam 10% ou menos da folhagem), sintoma acompanhado de descoloração vascular limitada aos tecidos radiculares e ao hipocótilo; 5 = aproximadamente 25% das folhas e hastes com murcha e clorose; 7 = aproximadamente 50% das folhas e hastes com murcha, clorose e necrose limitada; planta com nanismo e 9 = 75% ou mais das folhas e dos ramos com murcha, nanismo severo e necrose com desfolha prematura, o que frequentemente resulta em morte da planta. São considerados resistentes

linhagens com nota média de 1 a 3; de 3,1 a 6, intermediárias e, de 6,1 a 9, suscetíveis.

Uma escala de 9 notas proposta por Rava et al. (1996) (RA), em que: 1 = ausência de sintomas; 2 = até 5% da folhagem com sintomas de murcha; 3 = 6 a 10% da folhagem com sintomas de murcha; 4 = 11 a 15% da folhagem com sintomas de murcha; 5 = 16 a 25% da folhagem com sintomas de murcha; 6 = 26 a 35% da folhagem com sintomas de murcha; 7 = 36 a 50% da folhagem com sintomas de murcha; 8 = 51 a 75% da folhagem com sintomas de murcha e, 9 = mais de 75% da folhagem com sintomas de murcha. Neste trabalho não foi indicada nota média para aferição de resistência e suscetibilidade, no entanto, sugerem utilizar o teste de Dunnett à 5% de significância para comparação das notas de severidade. Desse modo, utilizaram duas linhagens testemunhas, sendo uma sabidamente resistente e outra suscetível. As linhagens que não diferirem da testemunha resistente e da suscetível, respectivamente, serão consideradas resistentes e suscetíveis. As demais linhagens serão intermediárias.

Ribeiro & Hagedorn (1979) (RH), propuseram escala de 5 notas para avaliação dos sintomas causados por *Fop*, em que: 1 = plantas com escurecimento vascular, mas sem sintomas externos; 2 = plantas com sintomas externos leves, mas com possibilidade de recuperação; 3 = plantas com clorose, nanismo, folhas caídas prematuramente, mas plantas ainda vivas; 4 = plantas com desfolha severa e plantas mortas e 5 = plantas mortas. Plantas que com notas de 1 e 2, são consideradas resistentes; 3, reação intermediária e, acima desta suscetíveis.

Escala relativa a testemunhas sadias (RPTS), proposta neste trabalho, em que: 1 = plantas sem sintomas visíveis da doença; 3 = plantas com redução de até 25% do tamanho da parte aérea e com clorose de baixa intensidade; 5 = plantas com redução de até 50% do tamanho da parte aérea ou 25% das folhas e hastes com murcha, plantas com clorose moderada; 7 = plantas com até 75% da redução do tamanho da parte aérea ou 50% das folhas com murcha, necrose limitada, plantas com nanismo e apresentando clorose severa; 9 = plantas com mais de 75% de redução do tamanho da parte aérea, 75% ou mais das folhas com murcha e necrose, nanismo severo ou plantas mortas. Como testemunhas sadias foram conduzidas junto a cada parcela um vaso com três plantas, em que no processo de inoculação destas plantas utilizou-se água destilada em substituição à suspensão de conídios de *Fop*. As linhagens com

média de 1 a 3 foram consideradas resistentes, média de 3,1 a 6 intermediárias e de 6,1 a 9 suscetíveis.

Outros dois critérios utilizados na avaliação da reação das linhagens à murcha-de-fusário foram a porcentagem da massa de plantas inoculadas fresca e seca, relativa às não inoculadas (testemunhas). Para isso, após as avaliações por meio de escalas, as plantas de cada vaso foram cortadas na altura do nó cotiledonar e logo em seguida pesadas. Essas foram levadas à estufa de secagem a 65°C por 72 horas e novamente pesadas. Esse mesmo procedimento foi realizado para as parcelas com as plantas sadias (testemunhas). As massas das plantas testemunhas sadias frescas e secas foram utilizadas para se calcular a porcentagem relativa das massas das plantas inoculadas frescas (%MF) e secas (%MS) em relação às testemunhas sadias, respectivamente. Esse processo foi realizado para subtrair o efeito dos genótipos sobre as características massa fresca e seca das plantas inoculadas e assim detectar os danos causados pela murcha-de-fusário em cada linhagem. As linhagens que apresentaram a %MF ou %MS $\geq 75\%$ e $\leq 40\%$ foram consideradas resistentes e suscetíveis, respectivamente. As demais foram consideradas intermediárias.

Durante a condução do experimento (janeiro – fevereiro/2011) a temperatura média ambiental foi de 24,71 °C (INMET, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independentemente da metodologia utilizada para avaliação da murcha-de-fusário houve efeito significativo ($P < 0,01$) de Linhagens, indicando reação diferenciada das linhagens de feijoeiro quanto à reação à murcha-de-fusário (Tabela 1). Além da maior facilidade para proceder a avaliação, a escala proposta neste trabalho (RPTS) apresentou coeficiente de variação (CV) 10,1%, magnitude inferior aos obtidos com as demais escalas (Tabela 1).

Fazendo-se uma avaliação somente com base nas cinco escalas (NA, PCA, RA, RH e RPTS) observa-se que a avaliação pelas escalas RPTS e NA foram as que apresentaram o maior número de grupos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, sugerindo melhor discriminação das linhagens (Tabela 2).

Todas as linhagens que se mostraram resistentes à murcha-de-fusário pela escala RPTS apresentaram a mesma reação frente às outras escalas (Tabela 2). Entretanto, para as escalas NA, PCA, RA e RH, as linhagens Manteigão Fosco 11 e

CVIII-85-11 receberam notas mínimas de severidade, ou seja, não foi visualizado qualquer sintoma da murcha-de-fusário (Tabela 2 e 3), enquanto na escala RPTS foram constatados sintomas de redução do crescimento e clorose de baixa intensidade (Tabela 2 e 3). Vale ressaltar que isso só foi detectado pela existência de testemunhas sadias de cada linhagem, o que permitiu a comparação com as plantas inoculadas. Dongo & Müller (1969) estudaram a reação de cultivares de feijão quando inoculadas com *Fop*. Relataram que algumas cultivares de feijão apresentavam redução do crescimento. Este sintoma, algumas vezes, foi o único observado.

Tabela 1 – Resumos das análises de variância da severidade da murcha-de-fusário em linhagens de feijoeiro de acordo com escalas descritas por Nascimento et al. (1995) (NA), Pastor-Corrales & Abawi (1987) (PCA), Rava et al. (1996) (RA), Ribeiro & Hagedorn (1979) (RH), pela escala relativa a testemunhas sadias (RPTS) e pela porcentagem relativa da massa fresca (%MF) e seca (%MS) em relação às testemunhas sadias. Viçosa-MG.

FV	GL	QM						
		NA	PCA	RA	RH	RPTS	%MF	%MS
Blocos	3	0,11	0,10	0,01	0,03	0,02	79,56	312,60
Linhagens	14	9,93**	38,60**	36,76**	7,73**	28,01**	2325,77**	5848,82**
Erro	42	0,09	0,30	0,62	0,12	0,24	87,14	244,62
CV (%)		22,27	17,35	26,21	17,63	10,10	14,71	21,79

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade.

As linhagens de feijoeiro VP11, VP1, CNFR8149, Carnaval, VP8, MAI-2-5 e VC12 que apresentaram reação intermediária com a escala RPTS, foram classificadas como resistentes pelas outras escalas (Tabela 2). Isto, provavelmente, ocorreu, principalmente, pela não avaliação do sintoma redução do crescimento das plantas e pela dificuldade da observação de clorose de baixa intensidade sem a presença de plantas testemunhas sadias para comparação. Apesar da detecção de clorose moderada nessas linhagens, a não observação de escurecimento vascular aos 21 DAI contribuiu para a classificação dessas linhagens como resistentes (Tabela 3). O escurecimento vascular, aparentemente, está associado com sintomas mais severos da murcha-de-fusário como murcha e morte das plantas. Pereira et al. (2011) caracterizaram linhagens de feijoeiro quanto a resistência a *Fop* com a escala de avaliação descrita por Pastor-Corrales & Abawi (1987). Esses autores atribuíram

nota 1 de severidade para as linhagens Manteigão Fosco 11, VP1 e VP8, ou seja, essas linhagens não apresentaram nenhum sintoma e também classificaram como resistentes as linhagens VC1 e VC12.

Tabela 2 – Notas de severidade da murcha-de-fusário em linhagens de feijão obtidas de cinco escalas visuais de avaliação. Viçosa-MG.

Linhagens	NA¹	PCA	RA	RH	RPTS
BRS Executivo	0,00f*-R ²	1,00d-R	1,00c-R	1,00d-R	1,00f-R
Diacol Calima	0,00f-R	1,00d-R	1,00c-R	1,00d-R	1,00f-R
Manteigão Fosco 11	0,00f-R	1,00d-R	1,00c-R	1,00d-R	1,25f-R
CVIII-85-11	0,00f-R	1,00d-R	1,00c-R	1,00d-R	2,08e-R
VP11	0,00f-R	1,00d-R	1,00c-R	1,00d-R	3,33d-I
VC1	0,50e-R	1,33d-R	1,17c-R	1,33c-R	5,08c-I
CNFR8149	1,33c-R	2,92c-R	2,58c-R	1,33c-R	5,25c-I
Carnaval	0,67d-R	1,83d-R	1,42c-R	1,58c-R	5,42c-I
VP8	1,42c-R	1,42d-R	1,00c-R	1,00d-R	5,42c-I
MAI-2-5	1,00d-R	1,75d-R	1,75c-R	1,50c-R	5,58c-I
VC12	0,00f-R	1,00d-R	1,08c-R	1,00d-R	5,67c-I
RP2	3,33b-S	7,75b-S	6,33b-S	3,42b-I	7,08b-S
BRS Horizonte	3,58b-S	7,58b-S	7,67a-S	3,83b-I	8,00a-S
Meia Noite	4,00a-S	8,17a-S	8,42a-S	4,42a-S	8,58a-S
BRS Cometa	3,92a-S	8,75a-S	8,58a-S	4,75a-S	8,67a-S

¹ Escalas de avaliação da severidade da murcha-de-fusário proposta por Nascimento et al. (1995), Pastor-Corrales & Abawi (1987), Rava et al. (1996), Ribeiro & Hagedorn (1979) e escala relativa a plantas testemunhas sadias (RPTS) proposta neste trabalho.

² R: resistente; I: intermediário; S: suscetível.

* Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Somente as linhagens BRS Executivo e Diacol Calima não apresentaram nenhum tipo de sintoma da murcha-de-fusário (Tabela 3). Nove linhagens apresentaram redução do crescimento acompanhado de clorose, mostrando a importância da avaliação desse sintoma (Tabela 3). Caso esse sintoma não fosse avaliado, algumas linhagens poderiam ser classificadas erroneamente como resistentes.

As altas correlações entre RPTS, %MF e %MS (Tabela 4) indicam que %MF e %MS apresentam potencial para fins de avaliação da severidade da murcha-de-fusário. Vale salientar, que à exceção de %MF e %MS, as demais metodologias de avaliação são subjetivas.

Tabela 3 – Sintomas da murcha-de-fusário em linhagens de feijoeiro. Viçosa-MG.

Linhagens	Redução do crescimento	Clorose	Escurecimento vascular	Nanismo	Murcha	Morte
BRS Executivo	-	-	-	-	-	-
Diacol Calima	-	-	-	-	-	-
Manteigão Fosco 11	X	X	-	-	-	-
CVIII-85-11	X	X	-	-	-	-
VP11	X	X	-	-	-	-
VC1	X	X	-	-	-	-
CNFR8149	X	X	-	-	-	-
Carnaval	X	X	-	-	-	-
VP8	X	X	-	-	-	-
MAI-2-5	X	X	-	-	-	-
VC12	X	X	-	-	-	-
RP2	-	-	X	X	X	-
BRS Horizonte	-	-	X	X	X	X
Meia Noite	-	-	X	X	X	X
BRS Cometa	-	-	X	X	X	X

X = Presença; - = ausência.

Tabela 4 – Correlação entre severidade da murcha-de-fusário feijoeiros quanto à escala relativa a plantas testemunhas sadias (RPTS), porcentagem relativa da massa fresca (%MF) e seca (%MS) em relação às testemunhas sadias. Viçosa-MG.

Variáveis	Variáveis		
	RPTS	%MF	%MS
RPTS	1	-0,9544**	-0,9100**
%MF		1	0,9131**
%MS			1

** Significativo pelo teste T a 1% de probabilidade.

As linhagens de feijoeiro resistentes e suscetíveis foram as que apresentaram menores e maiores reduções de massa de planta, respectivamente (Tabela 5).

Com as escalas RPTS, %MF e %MF, houve mudanças de posições na classificação, principalmente nas linhagens de reação intermediária (Tabela 5). No entanto, essas modificações de posições não comprometeram a classificação das linhagens nas classes de resistência (Tabela 5).

As linhagens BRS Executivo, Diacol Calima, Manteigão Fosco 11 e CVIII-85-11, classificadas como resistentes pela escala RPTS, também foram resistentes com base na %MF e %MS (Tabela 5). A linhagem VP11 foi classificada como resistente pela %MF e %MS e não foi pela escala RPTS (Tabela 5). Entretanto, a VP11 recebeu uma nota de severidade pela RPTS muito próxima da transição (3,33) entre resistente e intermediário (Tabela 5). Fato interessante foi encontrado para as linhagens BRS Executivo e Diacol Calima, em que estas apresentaram a %MS superior aos valores dessa característica encontrados para as plantas testemunhas sadias (Tabela 5). É válido ressaltar que essas duas linhagens foram as únicas que não apresentaram nenhum sintoma da murcha-de-fusário. Também, na sua maioria, os valores de %MS foram mais altos quando comparados aos de %MF (Tabela 5).

Tabela 5 – Classificação de linhagens de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusário utilizando-se diferentes metodologias de avaliação. Viçosa-MG.

Linhagens	RPTS¹	MF%	MS%
Diacol Calima	(1) ² 1,00f [*] -R ³	(1)102,8a-R	(1)155,7a-R
BRS Executivo	(2)1,00f-R	(2)100,1a-R	(2)144,9a-R
Manteigão Fosco 11	(3)1,25f-R	(4)86,5b-R	(3)95,6b-R
CVIII-85-11	(4)2,08de-R	(3)97,6a-R	(5)89,7b-R
VP11	(5)3,33d-I	(5)75,3b-R	(4)94,7b-R
VC1	(6)5,08c-I	(8)55,8c-I	(6)68,1c-I
CNFR8149	(7)5,25c-I	(7)60,1c-I	(9)54,9c-I
Carnaval	(8)5,42c-I	(13)48,0c-I	(12)42,2d-I
VP8	(9)5,42c-I	(9)53,0c-I	(7)64,4c-I
MAI-2-5	(10)5,58c-I	(6)61,5c-I	(10)54,1c-I
VC12	(11)5,67c-I	(10)53,0c-I	(8)62,6c-I
RP2	(12)7,08b-S	(11)52,8c-I	(11)53,2c-I
BRS Horizonte	(13)8,00a-S	(12)39,8c-S	(14)34,3d-S
Meia Noite	(14)8,58a-S	(14)31,5d-S	(13)34,5d-S
BRS Cometa	(15)8,67a-S	(15)24,0d-S	(15)28,1d-S

* Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹ RPTS: Escala de severidade relativa a testemunha sadia; MF%: porcentagem relativa da massa fresca em relação a testemunha e MS%: porcentagem relativa da massa seca em relação a testemunha.

² Valores entre parênteses referem-se à classificação das linhagens em ordem decrescente de nível de resistência, para as diferentes metodologias.

³ R: resistente; I: intermediário; S: suscetível.

A linhagem RP2 foi classificada como suscetível pela escala RPTS e como intermediária utilizando-se a %MF e %MS (Tabela 5). Essa linhagem apresentou os

sintomas escurecimento vascular, nanismo e murcha das folhas e por isso recebeu uma nota média alta (7,08) com base na escala RPTS (Tabela 3 e 5). Entretanto, essa linhagem não apresentou plantas mortas, o que não comprometeu severamente a massa das plantas inoculadas, o qual foi detectado pelas %MF e %MS.

A %MF quanto a %MS apresentaram boa discriminação quanto aos grupos resistentes, intermediários e suscetíveis (Tabela 5). A utilização da %MF possivelmente é a que representa classificação mais próxima da real, uma vez que a murcha-de-fusário altera a concentração de água nas plantas. Deste modo, plantas com maiores severidades da murcha-de-fusário possuem uma menor quantidade de água a ser perdida durante o processo de secagem. Assim, tendo em vista que a %MF apresentou maior correlação com as notas de severidade (-0,9544) (Tabela 4) e é a característica de mais fácil obtenção de dados em comparação com a %MS, uma vez que elimina o processo de secagem das plantas, a avaliação por meio da %MF é mais recomendável. Entretanto, caso as plantas não possam ser imediatamente pesadas após serem cortadas, a %MS pode ser utilizada sem comprometer os resultados.

A avaliação pela escala RPTS apresenta as vantagens de permitir a constatação dos sintomas que estão ocorrendo nas plantas de feijoeiro em decorrência da murcha-de-fusário e de não ser necessário cortar as plantas para se realizar as avaliações. Entretanto, é dependente do treinamento e da habilidade do avaliador. Esse problema é contornado pela utilização tanto da %MF quanto da %MS. Por outro lado, essas metodologias apresentam os inconvenientes de causar a morte das plantas e de não se levantar os sintomas ocorridos nas plantas. Desse modo, acreditamos que para uma avaliação mais precisa e acurada, sempre que possível, deve-se fazer uso da escala de avaliação RPTS e da utilização da %MS ou da %MF em conjunto.

Conforme demonstrado, a utilização da escala RPTS ou da %MF/%MS são mais precisas em comparação com as demais escalas já descritas. Contudo, devemos ressaltar que essas apresentam o inconveniente do uso de plantas testemunhas sadias. Esse fato implica em maior custo e utilização de espaço, além de impedir seu uso em casos onde não é possível a condução de testemunhas sadias que possuam o mesmo genótipo em avaliação, como é o caso de populações segregantes e de experimentos realizados em campo.

4. CONCLUSÕES

A escala RPTS, que leva em consideração a redução do crescimento das plantas de feijoeiro, proposta neste trabalho, é mais precisa em comparação com as metodologias tradicionais de avaliação da murcha-de-fusário apresentadas na literatura.

A utilização da porcentagem relativa das massas das plantas inoculadas frescas (%MF) e secas (%MS) em relação às testemunhas sadias é viável para a discriminação de linhagens quanto à reação à murcha-de-fusário em casa de vegetação.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S. Root Rots. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.) **Bean production problems in the tropics**. 2nd. Ed. Cali. CIAT. pp. 105-157. 1989.

DONGO S.L.; MÜLLER, L.E. Estudios sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en el frijol. II. Pruebas varietales. **Turrialba**, 19:82-90, 1969.

Instituto Nacional de Metereologia (INMET). Disponível em <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em: 18 out. 2012.

NASCIMENTO, S.R.C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A.C. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 20:214-217, 1995.

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

PAULA JÚNIOR, T.J.; LOBO JÚNIOR, M.; SARTORATO, A.; VIEIRA, R.F.; CARNEIRO, J.E.S.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro em áreas irrigadas - **Guia Técnico**. Viçosa. EPAMIG-CTZM. 2006.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Estratégias para eficiência da seleção de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusario. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43:721-728, 2008.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, 35:940-947, 2011.

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**, 21:296-300, 1996.

RIBEIRO, C.A.G.; FERRAZ, S. Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 9:37-44, 1984.

RIBEIRO, R.L.D.; HAGEDORN, D.J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* the causal agent of bean yellows. **Phytopathology**, 69:272-276, 1979.

ROCHA JÚNIOR, W.C.; SANTOS, J.B.; MENDES-COSTA, M.C. Reação de cultivares e linhagens de feijão à *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 23:407-409, 1998.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 231 p.

CAPÍTULO 2

METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* NO FEIJOEIRO-COMUM

RESUMO - O objetivo com este trabalho foi propor e comparar metodologias de inoculação de *Fusarium oxysporum* na avaliação da severidade da murcha-de-fusário no feijoeiro-comum em duas condições ambientais. Para isso, foram utilizadas as linhagens Manteigão Fosco 11, VP8 e Meia Noite, previamente caracterizadas como resistente, intermediária e suscetível, respectivamente. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com três repetições e parcelas constituídas por dois vasos com três plantas. Como testemunha, foi utilizado junto a cada parcela um vaso com três plantas, onde estas passaram pelo mesmo procedimento de inoculação realizado na respectiva parcela, contudo utilizando água destilada em substituição à suspensão de conídios. As inoculações foram realizadas 10 dias após a germinação com uma suspensão de macro e microconídios na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} . As metodologias testadas foram: 1 – Germinação das sementes em substrato, corte de 1/3 do comprimento das raízes e imersão na suspensão de conídios por cinco minutos; 2 - Germinação das sementes em substrato, corte de 1/3 do comprimento das raízes e imersão na suspensão de conídios por cinco segundos; 3 – Germinação das sementes em substrato, corte de 1/3 do comprimento do agregado substrato-raízes e aspersão de 2 mL da suspensão de conídios; 4 – Sementes foram pré-germinadas em câmara de germinação por 72 horas. Momentos antes da inoculação as raízes primárias foram cortadas imediatamente abaixo do ponto de inserção das primeiras raízes basais e logo em seguida as plântulas foram submersas na suspensão de conídios por cinco minutos. As avaliações foram realizadas a cada três dias após as inoculações (DAI), até a estabilização dos sintomas seguindo escala de notas relativa a testemunhas sadias (RPTS). Este experimento foi conduzido em duas épocas, sendo o primeiro em fevereiro/março (época quente - EQ) e o segundo em junho/julho (época fria - EF). A época mais adequada para avaliação da severidade da murcha-de-fusário é aos 22 e 37 dias após a inoculação, no período quente e frio do ano, respectivamente. A metodologia de inoculação que emprega corte de 1/3 do

comprimento das raízes com posterior imersão na suspensão de conídios de *Fusarium oxysporum* por cinco minutos é a que melhor discrimina genótipos de feijão quanto à reação a *Fusarium oxysporum*.

Palavras chave: *Fusarium oxysporum*, feijoeiro-comum, metodologias de inoculação.

INOCULATION METHODOLOGIES OF *Fusarium oxysporum* IN COMMON BEAN

ABSTRACT – The aim of this study was to propose and compare inoculation methodologies of *Fusarium oxysporum* in assessment of the severity of Fusarium wilt in common bean in two environmental conditions. For that purpose, we used the common bean lines Manteigão Fosco 11, VP8 and Meia Noite, previously characterized as resistant, intermediate and susceptible, respectively. The experimental design was randomized blocks with three replications and plots consisted of two pots with three plants. One pot with three plants served as a control together with each plot, and these plants passed through the same inoculation procedure performed in the plot itself, but with the use of distilled water instead of the conidium suspension. Inoculations were performed 10 days after germination with a suspension of micro- and microconidia at a concentration of 1×10^6 conidia mL^{-1} . The methodologies tested were: 1 – Seed germination in substrate, cutting of 1/3 the root length and immersion in conidium suspension for five min; 2 - Seed germination in substrate, cutting of 1/3 the root length and immersion in conidium suspension for five seconds; 3 – Seed germination in substrate, cutting of 1/3 the length of the substrate-root aggregate and spraying of 2 mL of conidium suspension; 4 – Seeds were pre-germinated in a germination chamber for 72 hours. Shortly before inoculation, the primary roots were cut just below the point of insertion of the first basal roots and the plants were then submersed in the conidium suspension for five minutes. Plants were assessed every three days after the inoculations (DAI) up to stabilization of the symptoms, following the scoring scale related to the healthy controls (HCPR). This experiment was conducted in two seasons, the first in February/March (hot season - HS) and the second in June/ July (cold season - CS). The most suitable season for assessment of the severity of Fusarium wilt is at 22 and

37 days after inoculation in the hot season and cold season of the year, respectively. The inoculation method that uses cutting of 1/3 of the root length with subsequent immersion in the *Fusarium oxysporum* conidium suspension for 5 minutes is that which best discriminates common bean genotypes in regard to reaction to *Fusarium oxysporum*.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, common bean, inoculation methodologies.

1. INTRODUÇÃO

A murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), é uma das principais moléstias do feijoeiro (Paula Júnior et al., 2004). Esta doença é mais severa em condições de temperatura e umidade elevada (Paula Júnior et al., 2004; Pereira et al., 2011).

A utilização de pivô-central, por parte dos grandes produtores, e os altos preços que o feijão vem obtendo no mercado tem incentivado seu plantio em cultivos sucessivos. Essa prática, aliada à falta de adoção de medidas de controle e prevenção, tem agravado a ocorrência da murcha-de-fusário (Paula Júnior et al., 2006; Pereira et al., 2009). Para esta enfermidade, ao contrário de muitas outras, o controle químico por meio de pulverizações é ineficiente (Abawi, 1989). Deste modo, a utilização de cultivares resistentes é a principal forma de controle da murcha-de-fusário (Abawi, 1989; Vieira, 1983).

Em programas de melhoramento visando resistência a doenças a seleção de genótipos resistentes é o principal objetivo dos melhoristas. Esta avaliação pode ser realizada em campo. Entretanto as avaliações em condições controladas, com inoculação artificial, são mais eficazes (Pereira et al., 2008).

A metodologia de inoculação que emprega o arranquio das plantas do substrato com posterior lavagem e corte das raízes é utilizada na maioria dos trabalhos que realizaram inoculação de *Fop* (Cândida et al., 2009; Costa et al., 2007; Pereira et al., 2011). Esse procedimento, além de trabalhoso, é muito agressivo as plantas. A uso da concentração da suspensão de conídios (1×10^6 conídios mL⁻¹) parece ser consenso entre os pesquisadores e vêm sendo utilizada nos trabalhos mais recentes. Contudo, alguns fatores são variáveis em pesquisas que empregaram a inoculação de *Fop*, tais como: a idade das plantas no momento da inoculação, o tempo de imersão das raízes

na suspensão de conídios e a época de avaliação. Cândida et al. (2009) e Costa et al. (2007) inocularam plantas com oito dias pós emergência (DAE) imergindo as raízes cortadas durante um minuto na suspensão de conídios e as avaliações foram realizadas 12 dias após a inoculação (DAI). Nascimento et al. (1995a, 1995b), Maringoni & Lauretti (1999) e Pereira et al. (2002), inocularam plantas com 7 DAE imergindo as raízes na suspensão de conídios por 10 minutos e as avaliações foram realizadas aos 30 DAI. Pereira et al. (2009) e Pereira et al. (2011), visaram estudar o controle genético da resistência de genótipos de feijoeiro quanto a *Fop* e a reação de linhagens de feijoeiro quanto à *Fop*, respectivamente, inocularam plantas com 9 a 10 dias após a semeadura e avaliaram os experimentos aos 21 DAI.

As inoculações artificiais de *Fop* são afetadas por diversos fatores, dentre os quais se destaca a temperatura. De acordo com Ribeiro & Hagedorn (1979), a temperatura de 20°C é a que melhor proporciona sintomas da murcha-de-fusário em plantas de feijoeiro, enquanto que a temperatura ideal para o crescimento de *Fop* in vitro é de 28°C. Paula Júnior et al. (2006) também relatam que temperaturas entre 24 e 28°C favorecem a infecção de *Fop* em plantas de feijoeiro. Entretanto, esse fator não tem recebido a devida atenção.

Assim, estudos visando entender o comportamento do progresso dos sintomas dessa doença em diferentes condições ambientais e a padronização das metodologias de avaliação é de grande importância.

O objetivo com este trabalho foi propor e comparar metodologias de inoculação de *Fop* na avaliação da severidade da murcha-de-fusário em duas condições ambientais no feijão-comum.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os tratamentos foram arrançados em fatorial triplo, com três linhagens (Manteigão Fosco 11, VP8 e Meia Noite), quatro metodologias de avaliação e os experimentos conduzidos em duas épocas do ano. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com três repetições. As parcelas foram constituídas por dois vasos com três plantas.

As linhagens utilizadas foram previamente caracterizadas como resistente (Manteigão Fosco 11), intermediária (VP8) e suscetível (Meia Noite).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em duas épocas: fevereiro/março (época quente - EQ) e o segundo em junho/julho (época fria - EF), ambos em 2011 (Figura 1).

Sementes das linhagens Manteigão Fosco 11, VP8 e Meia Noite foram pré-germinadas em papel germiteste em câmara de germinação a 25°C e umidade de 100% por 24 horas. Em seguida, as plântulas foram transplantadas para bandejas de isopor de 128 células de 30 mL preenchidas substrato (Tropstrato HT[®], Vida Verde, Mogi Mirim, SP, Brasil), as quais foram mantidas em casa de vegetação até o momento das inoculações.

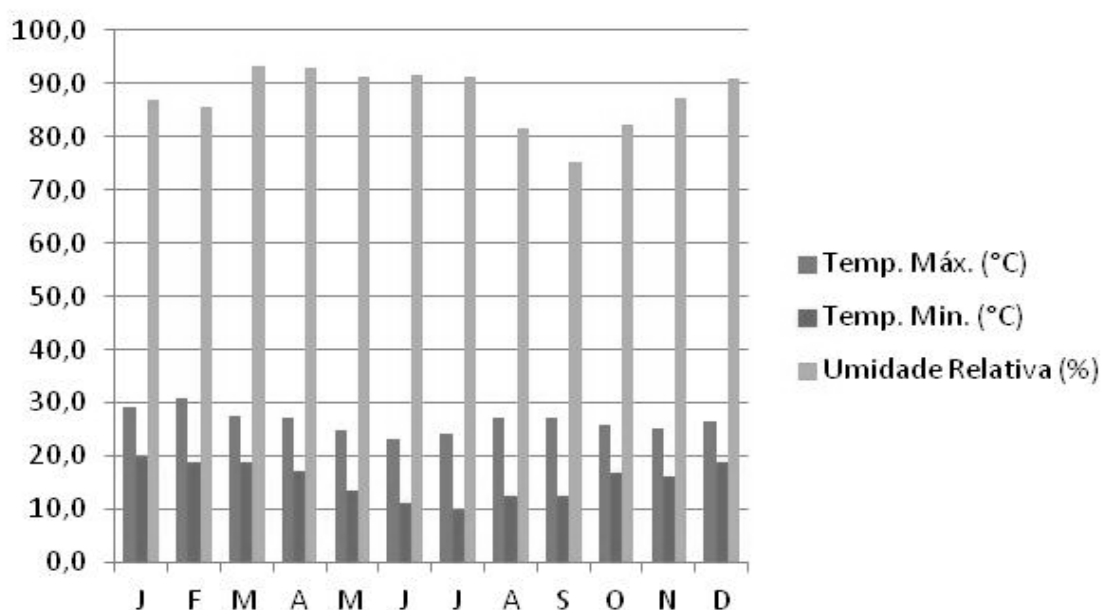


Figura 1 – Temperatura média máxima e mínima (°C) e umidade relativa (%) média para Viçosa-MG no ano de 2011 (INMET-2012).

As inoculações foram realizadas de acordo com as seguintes metodologias: 1 - Plantas de feijão foram retiradas das bandejas de isopor dez dias após a germinação, as raízes lavadas em água corrente, 1/3 do seu comprimento cortado com o auxílio de uma tesoura e mergulhados na suspensão de conídios durante cinco minutos; 2 - Realizado o mesmo procedimento do item 1, entretanto imergindo as raízes por cinco segundos na suspensão de conídios; 3 - Dez dias após a germinação, as plantas foram retiradas cuidadosamente das bandejas de modo que o agregado de raízes e substrato manteve-se intacto. Posteriormente, 1/3 do comprimento do agregado foi cortado e com o auxílio de um borrifador manual, 2 mL da suspensão de conídios foi

aspergido na região de corte do agregado; 4 – Sementes de cada linhagem foram pré-germinadas em câmara de germinação a 25°C por 72 horas. Momentos antes da inoculação as raízes primárias foram cortadas imediatamente abaixo do ponto de inserção das primeiras raízes basais e logo em seguida as plântulas foram submersas na suspensão de conídios por cinco minutos.

Como testemunha, junto a cada parcela, foi conduzido um vaso com três plantas, que passaram pelo mesmo procedimento de inoculação realizado na parcela, mas utilizando-se água destilada em substituição à suspensão de conídios de *Fop*.

Para a produção do inóculo, pequenos segmentos de aproximadamente 0,4 cm de diâmetro de uma colônia do isolado monospórico de *Fop* (FOP-UFV-01) foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), as quais foram incubadas a 24°C durante 10 dias sob luz contínua. A suspensão de macro e microconídios na concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹ foi preparada momentos antes das inoculações.

Após a realização das inoculações, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos com 2,5 L de substrato e mantidas em casa de vegetação. As avaliações foram realizadas a cada três dias após as inoculações (DAI), seguindo escala de notas de severidade relativa a testemunha sadia (RPTS), em que: 1 = plantas sem sintomas visíveis da doença; 3 = plantas com redução de até 25% do tamanho da parte aérea e com clorose de baixa intensidade; 5 = plantas com redução de até 50% do tamanho da parte aérea ou 25% das folhas e hastes com murcha, plantas com clorose moderada; 7 = plantas com até 75% da redução do tamanho da parte aérea ou 50% das folhas com murcha, necrose limitada, plantas com nanismo e apresentando clorose severa; 9 = plantas com mais de 75% de redução do tamanho da parte aérea, 75% ou mais das folhas com murcha e necrose, nanismo severo ou plantas mortas. Como testemunhas sadias foram conduzidas junto a cada parcela um vaso com três plantas, em que no processo de inoculação destas plantas utilizou-se água destilada em substituição à suspensão de conídios de *Fop*. As linhagens com média de 1 a 3 foram consideradas resistentes, média de 3,1 a 6 intermediárias e de 6,1 a 9 suscetíveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das temperaturas máxima e mínima foram, respectivamente, 30,9 e 18,9 °C durante a condução do primeiro experimento (época quente - EQ). No segundo experimento (época Fria - EF) estas médias foram de 24,2 e 9,9 °C (Figura 1). Assim, pode-se observar que as temperaturas ocorridas durante a condução do primeiro experimento (EQ) foram mais favoráveis ao desenvolvimento da murcha-de-fusário.

Comparando-se as médias de severidade da murcha-de-fusário proporcionadas pelas diferentes metodologias de inoculação, na EQ e EF, (Tabela 1), verificou-se que a metodologia de inoculação 1 foi a mais eficaz para a discriminação dos genótipos quanto a reação a *Fop*, pois foi a única que classificou as linhagens Manteigão Fosco 11, VP8 e Meia Noite como resistente, intermediária e suscetível, respectivamente.

Tabela 1 - Notas de severidade média da murcha-de-fusário nas linhagens Manteigão Fosco 11 (MF11), VP8 e Meia Noite (MN), submetidas a diferentes métodos de inoculação. Viçosa-MG.

Métodos de inoculação	Época quente (EQ)			Época Fria (EF)		
	MF11	VP8	MN	MF11	VP8	MN
Imersão de raízes, 5 min	1,89a ¹ -R ²	5,36b-I	8,63c-S	1,00a-R	3,55b-I	8,44c-S
Imersão de raízes, 5 seg	1,67a-R	4,26b-I	4,73b-I	1,00a-R	3,00b-R	4,22b-I
Inoculação no agregado	1,00a-R	2,00a-R	2,28a-R	-	-	-
Imersão sementes germ.	1,00a-R	1,40a-R	2,00a-R	-	-	-

¹ Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

² R: resistente; I: intermediário; S: suscetível.

Cavalcanti et al. (2002) e Pereira et al. (2008) testaram metodologias de inoculação de *Fop* e também concluíram que a metodologia de corte das raízes e posterior imersão em suspensão de conídios por cinco minutos proporcionou sintomas mais severos que os outros métodos de inoculação. Segundo estes autores, isto ocorre devido à infecção natural de *Fop* ocorrer via raízes. Entretanto, as metodologias de inoculação 2, 3 e 4 de *Fop*, utilizadas neste estudo, também proporcionam a exposição de raízes com ferimento (corte) à infecção pelo patógeno, porém não apresentaram a mesma eficiência da metodologia de inoculação 1 (Tabela

1). Estes resultados indicam que o tempo de imersão das raízes na suspensão de conídios é fator importante, visto que a metodologia de inoculação 2, que difere da metodologia 1 apenas quanto ao tempo de imersão, não apresentou a mesma severidade dos sintomas (Tabela 1).

Em geral, observou-se progresso mais rápido e maior severidade da murcha-de-fusário na EQ comparada a EF (Tabela 1 e Figura 2).

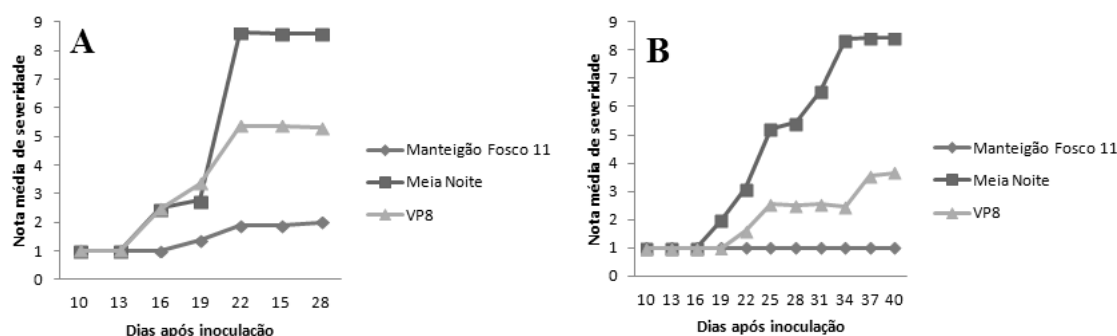


Figura 2 - Desempenho de três linhagens de feijoeiro quanto a severidade da murcha-de-fusário nas épocas quente (A) e fria (B) inoculadas com *Fop* pela metodologia 1. Viçosa-MG.

A metodologia 3 de inoculação, apesar de expor as raízes danificadas por um longo período de tempo, não proporcionou o mesmo grau de infecção da metodologia 1 (Tabela 1) devido, provavelmente, à diluição da suspensão de conídios no agregado e à conseqüente redução da absorção de conídios pelas plantas. Caso a quantidade de inóculo aspergido no agregado fosse maior, provavelmente, ocorreria aumento da severidade dos sintomas. Isto é corroborado por Pereira et al. (2008) em que testaram uma metodologia de perfuração do substrato dos vasos com plantas de feijoeiro com posterior deposição de 30 mL da suspensão de conídios. Os autores relataram que esta metodologia apresentou a mesma eficiência da metodologia de corte das raízes e posterior imersão por cinco minutos, porém não a recomendam em razão do grande volume de inóculo gasto nas inoculações.

Um dos meios que possibilitam as plantas transportarem água das raízes para a parte aérea é a geração de pressão negativa no xilema que é causada pela transpiração (Taiz & Zeiger, 2004). Provavelmente, este é o mecanismo que permite as plantas de feijoeiro absorver conídios de *Fop* presentes na suspensão utilizada como inóculo. Assim, as raízes dos feijoeiros imersos na suspensão de conídios de *Fop* os absorvem e um tempo mínimo é necessário para que isso ocorra eficientemente e

possibilite a ocorrência de sintomas. Cabe ressaltar que as plantas com as raízes cortadas devem ser imediatamente imergidas na suspensão de conídios a fim de minimizar a entrada de ar nos vasos do xilema. Na metodologia 4, em que as plântulas ainda não possuem folhas, a reduzida ocorrência de sintomas (Tabela 1) pode ser devido à baixa absorção da suspensão de conídios em razão da pequena taxa de transpiração das sementes pré-germinadas.

De modo geral, observaram-se sintomas da murcha-de-fusário nas linhagens Meia Noite (suscetível) e VP8 (intermediária) a partir do 16º e 19º DAI, na a EQ e EF, respectivamente (Tabela 2). Na EF, não foram observados sintomas na linhagem Manteigão Fosco 11 (resistente). Entretanto, na EQ esta linhagem apresentou sintomas quando se empregou as metodologias de inoculação 1 e 2 a partir do 19º DAI. Na EF nenhuma das linhagens apresentou sintomas da murcha-de-fusário quando se empregou as metodologias de inoculação 3 e 4. Assim, nas análises subsequentes foram consideradas apenas as metodologias de inoculação 1 e 2.

Resultados similares foram obtidos por Pereira et al. (2008), que mantiveram plantas de feijão após inoculação com *Fop* em sala climatizada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Relataram que a observação de sintomas da murcha-de-fusário só ocorreu após o 14º DAI. De forma semelhante Cavalcanti et al. (2002) observaram os sintomas da murcha-de-fusário em linhagens de feijoeiro inoculadas 15 DAI. Neste trabalho, os autores não relataram a temperatura na qual as plantas foram mantidas após a realização das inoculações. Entretanto, Pastor-Corrales e Abawi (1987) observaram que os sintomas nas plantas suscetíveis apareceram entre 5 e 9 DAI, quando inocularam *Fop* em feijão em casa de vegetação, em que a temperatura variou de 20 a 33°C.

Os sintomas da murcha-de-fusário na EQ, de acordo com o teste de agrupamento de Scott- Knott a 5% de propabilidade, para a metodologia de inoculação 1, nas três linhagens (Manteigão Fosco 11, Meia Noite e VP8), estabilizaram-se após 22 DAI na EQ (Tabela2). Na EF, conforme já relatado anteriormente, não foi observado sintoma na linhagem Manteigão Fosco 11, para a metodologia de inoculação 1. Para essa mesma metodologia, segundo o teste de Scott-Knott a 5%, os sintomas da murcha-de-fusário estabilizaram-se aos 34 e 37 DAI nas linhagens Meia Noite e VP8, respectivamente (Tabela 2). Assim, verifica-se que a melhor DAI para a realização de avaliações da severidade da murcha-de-fusário nas condições de EQ e EF é aos 22 e 37 DAÍ, respectivamente.

Tabela 2 – Médias de severidade da murcha-de-fusário nas linhagens Manteigão Fosco 11 (A), Meia Noite (B) e VP8 (C) em época quente (EQ) e fria (EF), utilizando-se quatro metodologias de inoculação de *Fusarium oxysporum*. Viçosa-MG.

Tratamentos	DAI ¹ – EQ				
	16	19	22	25	28
A – 1 ²	1,00a*	1,39a	1,89b	1,89b	2,00b
B – 1	2,48 ^a	2,76a	8,63b	8,59b	8,59b
C – 1	2,47 ^a	3,36b	5,36c	5,36c	5,31c
A – 2	1,00a	1,17a	1,67b	1,72b	1,61b
B – 2	2,22 ^a	3,09b	4,73c	5,57d	5,58d
C – 2	2,42a	4,17b	4,26b	4,62b	4,68b
A – 3	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
B – 3	1,00a	1,72a	2,28a	2,44a	2,39a
C – 3	1,56 ^a	1,89a	2,00a	2,22a	2,11a
A – 4	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
B – 4	1,00a	1,39a	2,00b	2,61b	2,61b
C – 4	1,00a	1,33a	1,40a	1,33a	1,42a

Tratamentos	DAI – EF							
	19	22	25	28	31	34	37	40
A – 1 ²	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
B – 1	2,00a	3,11b	5,22c	5,44c	6,56d	8,39e	8,44e	8,44e
C – 1	1,00a	1,61b	2,55c	2,50c	2,55c	2,44c	3,55d	3,66d
A – 2	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
B – 2	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a	1,72a	2,28a	4,22b	5,72c
C – 2	1,17 ^a	1,28a	1,50a	2,05a	2,50b	2,55b	3,00b	3,61c
A – 3	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-
B – 3	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-
C – 3	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-
A – 4	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-
B – 4	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-
C – 4	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-	1,00-

* Médias seguidas pela mesma letra na linha pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹ DAI – Dias após inoculação;

² Metodologias de inoculação 1, 2, 3 e 4.

- Dados não analisados.

Resultados similares aos encontrados nesse trabalho foram obtidos por Pereira et al. (2008) para a EQ, com avaliação da severidade aos 21 DAI. Entretanto, Cavalcanti et al. (2002) e Nascimento et al. (1995), avaliaram linhagens de feijão inoculadas com *Fop*, concluíram que a data mais adequada para realização das

avaliações foi aos 30 DAI. Alguns estudos relataram avaliações de severidade da murcha-de-fusário apenas aos 11 e 12 DAI (Cândida et al., 2009; Costa et al., 2007; Rava et al., 1996).

Estes resultados sinalizam a grande influência das condições ambientais no progresso dos sintomas da murcha-de-fusário e que o estabelecimento de uma data para avaliação da severidade parece não ser a estratégia mais adequada. Assim, testemunhas com reações conhecidas devem ser utilizadas visando embasamento para a decisão do DAI mais adequado para avaliação dos sintomas da murcha-de-fusário.

Na análise de variância para as notas de severidade da murcha-de-fusário avaliadas aos 22 e 37 DAI, para a EQ e EF, respectivamente (Tabela 3), observou-se conforme esperado, efeito significativo ($P < 0,01$) de Linhagens (L). A fonte de variação Metodologias de Inoculação (MI) e L x MI também foram significativas a 1% de probabilidade, evidenciando diferença na reação das linhagens frente aos métodos de inoculação de *Fop* e indicando a possível existência de um método de inoculação que seja mais eficiente visando à seleção de plantas resistentes à murcha-de-fusário (Tabela 3). Conforme discutido anteriormente, isso já era esperado uma vez que algumas metodologias não propiciaram sintomas em determinadas situações.

Tabela 3 - Resumo das análises de variância da severidade da murcha-de-fusário em linhagens de feijoeiro aos 22 e 37 dias após inoculação (DAI) em época quente (EQ) e época fria (EF), respectivamente. Viçosa-MG.

FV	GL	QM	
		EQ (22 DAI)	EF (37 DAI)
Linhagens (L)	2 (2) ¹	27,9070**	36,7555**
Metodologias de inoculação (MI)	3 (1)	28,3704**	13,6590**
L x MI	6 (2)	5,4984**	5,5284**
Erro	24 (12)	0,5001	0,5960
CV (%)		23,43	17,4533

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade.

¹ Valores entre parêntese referem-se aos graus de liberdade para experimento conduzido durante a época fria (EF).

Na Tabela 4 é apresentado o resumo da análise conjunta de variância da severidade da murcha-de-fusário aos 22 e 37 DAI para a EQ e EF, respectivamente. Constatou-se significância a 1% de probabilidade para a fonte de variação Épocas

(E) e L x E, indicando, respectivamente, que a EQ proporciona notas de severidade diferentes das obtidas na EF e que os genótipos apresentam reações diferentes frente às duas épocas de avaliação.

Embora a interação linhagens (L) x épocas (E) de avaliação tenha sido significativa (Tabela 4), não se observou alteração na reação das linhagens de uma época para a outra (Figura 2). Estes resultados indicam a possibilidade de se utilizar a EF para a seleção de plantas de feijoeiro resistentes à murcha-de-fusário. Entretanto, cabe ressaltar que a caracterização de genótipos quanto à reação de *Fop* na EF deve ser evitada uma vez que a severidade dos sintomas é menor.

Tabela 4 - Resumo da análise conjunta de variância da severidade da murcha-de-fusário avaliada aos 22 e 37 dias após inoculação (DAI), nas épocas quente (EQ) e fria (EF), respectivamente. Viçosa-MG.

FV	GL	Quadrado médio
Linhagens (L)	2	76,0455**
Épocas (E)	1	4,1664**
L x E	2	0,9860**
Erro	12	0,1730
CV (%)		8,64

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade.

4. CONCLUSÕES

A época mais adequada para a avaliação da severidade da murcha-de-fusário, sob inoculação artificial, é aos 22 e 37 dias após a inoculação, em período quente e frio do ano, respectivamente.

A metodologia de inoculação que emprega corte de 1/3 do comprimento das raízes com posterior imersão na suspensão de conídios de *Fusarium oxysporum* por 5 minutos é a que melhor discrimina genótipos de feijão quanto à reação a *Fusarium oxysporum*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S. Root Rots. In: SCHWARTZ HF, PASTOR-CORRALES MA (Eds.) **Bean production problems in the tropics**. 2nd. Ed. Cali. CIAT, 1989. p.105-157.

ALVES-SANTOS, F.M.; CORDEIRO-LOPEZ, L.; SAYAGUÉS, J.M.; MARTÍN-DOMINGUES, R.; GARCIA-BENAVIDES, P.; CRESPO, M.C.; DÍAS-DOMINGUES, 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.

BRICK, M. A.; BYRNE, P. F.; SCHWARTZ, H. F.; OGG, J. B.; OTTO, K.; FALL, A. L.; GILBERT, J. Reaction of three races of *Fusarium* wilt in the *Phaseolus vulgaris* core collection. **Crop Science**, 46:1245-1252, 2006.

CÂNDIDA, D.V.; COSTA, J.G.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, M.S. Controle genético da murcha de fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum. **Tropical Plant Pathology**, 34:379-384, 2009.

CAVALCANTI, L.S.; COELHO, R.S.B.; PEREZ, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, 32:1-5, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção de feijão 1^a, 2^a e 3^a safras**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 18 out. 2012

COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; PURÍSSIMO, J.D. Obtenção de linhagens de feijoeiro comum resistentes a murcha-de-fusário. **Revista Ceres**, 54:447-542, 2007.

Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Disponível em <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em: 18 out. 2012.

MARINGONI, A.C.; LAURETTI, R.L.B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34:535-542, 1999.

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

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

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, 25:99-112, 2004.

PAULA JÚNIOR, T.J.; LOBO JÚNIOR, M.; SARTORATO, A.; VIEIRA, R.F.; CARNEIRO, J.E.S.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro em áreas irrigadas - **Guia Técnico**. Viçosa, EPAMIG-CTZM, 2006. 48p.

PEREIRA, J.M.; VIEIRA, R.F.; MARARRA, L.O. Reação de cultivares e linhagens de feijão a murcha-de-fusarium. **Revista Ceres**, 49:71-74, 2002.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Estratégias para a eficiência da seleção de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusário. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43:721-728, 2008.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Brazilian race 2 in common bean. **Scientia Agrícola**, 66:788-792, 2009.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, 35:940-947, 2011.

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**, 21:296-300, 1996.

RIBEIRO, C.A.G.; FERRAZ, S. Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 9:37-44, 1984.

RIBEIRO, R.L.D.; HAGEDORN, D.J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* the causal agent of bean yellows. **Phytopathology**, 69:272-276, 1979.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.**, 3ª edição. Editora Artmed, 2004.719p.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro.** Viçosa: UFV, 1983. 231p.

CAPÍTULO 3

REAÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJÃO-COMUM (*Phaseolus vulgaris*) À MURCHA-DE-FUSÁRIO

RESUMO - O objetivo com este estudo foi caracterizar fenotipicamente linhagens de feijoeiro quanto à reação à murcha-de-fusário. Foram caracterizadas 197 linhagens elites avaliadas nos ensaios de Valor Cultivo e Uso (VCU) em Minas Gerais, no período de 2002 a 2012 (quatro ciclos de VCU's). Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com duas repetições. Cada parcela foi representada por um vaso com três plantas. Como testemunha para cada linhagem, foi conduzido junto a cada parcela um vaso com três plantas, onde estas passaram pelo mesmo procedimento da inoculação, contudo fazendo-se uso de água destilada em substituição à suspensão de conídios. Dez dias após a germinação, as plantas foram inoculadas empregando-se corte de 1/3 do comprimento das raízes com posterior imersão por cinco minutos na suspensão de conídios (macro e microconídios), a qual foi calibrada para a concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹. As avaliações foram realizadas 22 dias após as inoculações utilizando-se a metodologia relativa às testemunhas sadias (RPTS). Após as avaliações utilizando-se a escala RPTS, as plantas de cada linhagem avaliada foram cortadas na altura do nó cotiledonar e pesadas logo em seguida. As parcelas testemunhas não inoculadas passaram pelo mesmo processo. Assim, foi calculada a massa relativa das plantas inoculadas frescas em relação às plantas testemunhas sadias (%MF). As linhagens que se comportaram como resistentes foram reavaliadas, conforme metodologia descrita anteriormente e, pequenos segmentos de aproximadamente 0,5 cm foram retirados do interior do caule na região do hipocótilo das plantas das linhagens que confirmaram reação de resistência. Como testemunha foi realizado o mesmo procedimento para as plantas testemunhas sadias. Esta etapa foi realizada visando verificar a possibilidade do reisolamento do *Fusarium oxysporum* mesmo de plantas resistentes. Das 197 linhagens avaliadas, 29 foram resistentes, ou seja, 14,7% das linhagens. Entretanto foi possível o reisolamento do fungo de todas as linhagens resistentes.

Palavras chave: Murcha-de-fusário, *Phaseolus vulgaris*, fontes de resistência.

REACTION OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris*) LINES TO FUSARIUM WILT

ABSTRACT – The aim of this study was to phenotypically characterize common bean lines in regard to reaction to Fusarium wilt. We characterized 197 elite lines assessed in the Value for Cultivation and Use (Valor Cultivo e Uso - VCU) trials in Minas Gerais in the period from 2002 to 2012 (four VCU cycles). The experimental design was randomized blocks with two replications. Each plot consisted of a pot with three plants. One pot with three plants served as a control for each line together with each plot, and these plants passed through the same inoculation procedure, but with the use of distilled water instead of the conidium suspension. The plants were inoculated ten days after germination using the section of 1/3 the length of the roots, with subsequent immersion for 5 minutes in the conidium suspension (macro- and microconidia), which was calibrated for the concentration of 1×10^6 conidia mL⁻¹. Assessments were made 22 days after the inoculations using the methodology related to the healthy controls (HCPR). After the assessments using the HCPR scale, the plants from each line under assessment were cut at the height of the cotyledonary node and weighed soon afterwards. The uninoculated control plots passed through the same process. Thus, the relative weight of the fresh inoculated plants in relation to the healthy control plants was calculated (%FW). The lines that showed resistant behavior were reassessed, according to the previously described methodology. In addition, small segments of approximately 0.5 cm were removed from the inside of the stem in the region of the hypocotyl of the plants from the lines that confirmed a resistance reaction. For purposes of control, the same procedure was carried out for the healthy control plants. This step was taken so as to verify the possibility of reisolation of *Fusarium oxysporum* even from resistant plants. Of the 197 lines under assessment, 29 were resistant, i.e., 14.7% of the lines. Nevertheless, reisolation of the fungus was possible from all the resistant lines.

Keywords: Fusarium wilt, *Phaseolus vulgaris*, sources of resistance.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de feijão (FAO, 2012). Parte desse resultado se deve a ampla adaptação edafoclimática desta leguminosa, o que permite seu cultivo durante todo o ano e em quase todas as regiões brasileiras. No entanto, a produtividade média de feijão no Brasil é baixa e gira em torno de 921 kg ha⁻¹ (Conab, 2012). Segundo White (1993), as doenças são as principais causas da redução da produtividade de feijão no mundo. No Brasil, da mesma forma, as enfermidades que acometem a cultura são frequentemente citadas como uma das causas de perda de produtividade da cultura (Borém & Miranda, 2005; Paula Júnior et al., 2004; Vieira, 1983).

A murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), atualmente é uma das principais doenças do feijoeiro. *Fop* apesar de estar disseminado em praticamente todo o território nacional, vem ganhando importância, sobretudo, no Brasil central em áreas que fazem uso de irrigação por pivô-central (Costa, et al., 2006; Rava et al., 1996). Esse patógeno é um fungo de solo, que é introduzido em novas áreas principalmente, por meio de sementes infectadas, restos de cultura infestados e por implementos agrícolas que transportam partículas de solo contaminadas (Sartorato et al., 1987). Para doenças como a murcha-de-fusário, a utilização de cultivares resistentes é o principal método de controle, visto que os métodos químicos não são eficientes (Paula Júnior et al, 2004; Vieira, 1983).

Em um programa de melhoramento visando resistência às doenças, uma das principais etapas consiste na obtenção de fontes de resistência. A avaliação da reação de linhagens elites que estão em fase de recomendação para cultivo, frente a doenças, são determinantes para sua recomendação. Outro fator importante, na cultura do feijoeiro, é identificar fontes de resistência dentro de cada grupo de cor dos grãos (carioca, preto, vermelho, jalo) e que estas se possível, apresentem padrão comercial. Tendo em vista as diversas características a serem trabalhadas em um programa de melhoramento, a utilização de linhagens que apresentem a mesma cor dos grãos em hibridações facilita a obtenção de novas cultivares (Ramalho et al., 2004). Alguns trabalhos com o objetivo de identificar fontes de resistência à murcha-de-fusário já foram realizados. Entretanto, poucas cultivares comerciais foram avaliadas, o que limita o uso das fontes de resistência obtidas. (Balardin et al., 1990; Nascimento et

al., 1995; Pastor-Corrales & Abawi, 1987; Piza, 1993; Rava et al., 1996; Rocha Júnior et al., 1998).

Apesar de existir poucos programas de melhoramento visando resistência à murcha-de-fusário no Brasil, alguns cultivares com moderada resistência a esta moléstia, como ‘Carioca MG’, ‘BRSMG Talismã’, ‘Jalo MG 65’, ‘Pérola’ e ‘Carnaval’, são citadas na literatura (Paula Júnior et al., 2004; Ramalho et al., 2004).

O objetivo com este estudo foi caracterizar fenotipicamente linhagens de feijão quanto à reação à murcha-de-fusário.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram caracterizadas fenotipicamente quanto reação à murcha-de-fusário, 197 linhagens elites avaliadas nos ensaios de Valor Cultivo e Uso (VCU) em Minas Gerais, no período de 2002 a 2012 (quatro ciclos de VCU's).

Foi utilizado nas inoculações o isolado monospórico (FOP-UFV-01), obtido de plantas de feijão da cultivar Meia Noite com sintomas típicos de murcha-de-fusário, coletadas na Estação Experimental de Coimbra, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, situada a 690 m de altitude, 20°45' S de latitude e 42°51' W de longitude.

Com o objetivo de caracterizar em raça o isolado FOP-UFV-01, também foram inoculadas 12 linhagens que compõem as séries diferenciadoras propostas por Alves-Santos et al. (2002), Nascimento et al. (1995) e Woo et al. (1996).

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com duas repetições. Cada parcela foi representada por um vaso com três plantas. Como testemunha para cada linhagem, foi conduzido junto a cada parcela um vaso com três plantas, onde estas passaram pelo mesmo procedimento da inoculação, contudo fazendo-se uso de água destilada em substituição a suspensão de conídios do *Fop*.

Para a produção do inóculo, pequenos segmentos (0,4 cm de diâmetro) de uma colônia de *Fop* foram repicados em placas de Petri contendo meia batata-dextrose-água (BDA). Posteriormente estas foram mantidas em câmaras do tipo BOD, sob iluminação contínua, com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 dias. A suspensão de conídios foi preparada minutos antes de cada inoculação.

Sementes de cada linhagem foram pré-germinadas em papel germitest em câmara de germinação a 25°C por 24 horas. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas em bandejas de isopor de 128 células de 30 mL contendo substrato

(Tropstrato HT[®], Vida Verde, Mogi Mirim, SP, Brasil). Dez dias após o transplante, estas foram retiradas cuidadosamente das bandejas e as raízes lavadas em água corrente com posterior corte de 1/3 do comprimento.

Logo em seguida foram imersas em uma suspensão na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} (macro e microconídios) por cinco minutos. Decorrido esse tempo, foram transplantadas em vasos contendo 2,5 L de substrato. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação até o momento das avaliações. Foram adicionados, diariamente, 250 mL de água em cada vaso.

As avaliações foram realizadas 22 dias após as inoculações utilizando-se metodologia relativa a testemunhas sadias (RPTS), conforme descrita a seguir: 1 = plantas sem sintomas visíveis da doença; 3 = plantas com redução de até 25% do tamanho da parte aérea e com clorose de baixa intensidade; 5 = plantas com redução de até 50% do tamanho da parte aérea ou 25% das folhas e hastes com murcha, plantas com clorose moderada; 7 = plantas com até 75% da redução do tamanho da parte aérea ou 50% das folhas com murcha, necrose limitada, plantas com nanismo e apresentando clorose severa; 9 = plantas com mais de 75% de redução do tamanho da parte aérea, 75% ou mais das folhas com murcha e necrose, nanismo severo ou plantas mortas. Como testemunhas sadias foram conduzidas junto a cada parcela um vaso com três plantas, em que no processo de inoculação destas plantas utilizou-se água destilada em substituição à suspensão de conídios de *Fop*. As linhagens com média de 1 a 3 foram consideradas resistentes, média de 3,1 a 6 intermediárias e de 6,1 a 9 suscetíveis.

Após as avaliações visuais utilizando-se a escala RPTS, as plantas de cada linhagem foram cortadas na altura do nó cotiledonar e pesadas. As parcelas testemunhas não inoculadas passaram pelo mesmo processo. Assim, foi calculada a massa relativa das plantas inoculadas frescas em relação às plantas testemunhas sadias (%MF). Neste caso, as linhagens que apresentaram a $\%MF \geq 75\%$ e $\leq 40\%$ foram consideradas resistentes e suscetíveis, respectivamente. As demais foram consideradas intermediárias.

A avaliação das 197 linhagens foi realizada em duas épocas (dois grupos de linhagens), utilizando três testemunhas comuns aos dois experimentos (Manteigão Fosco 11, VP8 e Meia Noite). Foi realizada análise de variância de grupos de experimentos com testemunhas comuns.

As linhagens que se comportaram como resistentes foram reavaliadas, conforme metodologia descrita anteriormente. Pequenos segmentos de aproximadamente 0,5 cm do interior do caule na região do hipocótilo foram retirados dos feijoeiros das linhagens que confirmaram reação de resistência. Estes foram inicialmente desinfestados em álcool etílico a 70% e em seguida com hipoclorito de sódio a 1%, ambos por um minuto. Após esse processo, os fragmentos foram distribuídos em placas de Petri contendo o meio BDA. Estas foram em seguida incubadas em BOD a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ por sete dias. Como testemunha foi realizado o mesmo procedimento para as plantas testemunhas, ou seja, não inoculadas. Das colônias que apresentaram aparência típica de *Fop* foram retirados pequenos fragmentos e transferidos para novas placas de Petri contendo BDA. Estas foram mantidas conforme condições citadas para a produção de inóculo. Posteriormente, em cada placa foi adicionada água destilada com posterior raspagem. Desta, foram feitas lâminas onde foi observada em microscópio de luz a presença de macro e microconídios característicos de *Fop*. Esta etapa foi realizada visando verificar a possibilidade do reisolamento e *Fop* mesmo de plantas resistentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi possível caracterizar o isolado FOP-UFV-01 em raça (Tabela 1). Foi constatada grande virulência do isolado, uma vez que somente as linhagens TIB 3042 e Diacol Calima foram resistentes (Tabela 1).

As linhagens de feijoeiro Preto Uberabinha, Tenderrete, IPA6 e BBL274 que compõem a série diferenciadora proposta por Nascimento et al. (1995) foram suscetíveis ao isolado FOP-UFV-01 (Tabela 1). De acordo com essa série diferenciadora, para se classificar um isolado em raça 1 é necessário que a “Preto Uberabinha”, seja resistente; e para raça 2, a “Tenderrete”, deve ser resistente (Tabela 1).

A proposta de Woo et al. (1996), para a classificação de isolados de *Fop* em raças, utiliza as seguintes linhagens de feijoeiro: Mortiño, Riz30, TiB3042, BAT477, A211, HF465-63-1, Diacol Calima e IPA1 (Tabela 1). Entretanto, nenhuma das combinações necessárias para a classificação do isolado em alguma das cinco raças foi encontrada (Tabela 1). É válido ressaltar que em todas as tentativas, pelo menos

três das linhagens apresentaram combinação diferente da necessária para a classificação (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização do isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em raças de acordo com as séries diferenciadoras propostas por Nascimento et al. (1995), Woo et al. (1996) e Alves-Santos et al. (2002). Viçosa-MG.

Nome	Raças							FOP-UFV-01	Reação
	1 ^{a, bec}	2 ^{a, bec}	3 ^{b, ec}	4 ^{b, ec}	5 ^{b, ec}	6 ^c	7 ^c		
Preto Uberabinha ¹	R	S	-	-	-	-	-	9,00	S
Tenderrete ¹	S	R	-	-	-	-	-	9,00	S
IPA6 ¹	?	S	-	-	-	-	-	8,00	S
BBL274 ¹	S	S	-	-	-	-	-	6,42	S
Mortiño ²	R	R	S	S	R	-	-	8,67	S
Riz30 ²	S	S	R	S	S	-	-	9,00	S
TiB3042 ²	R	R	S	S	S	-	-	2,92	R
BAT477 ^{2,3}	S	R	R	S	S	S	S	5,34	S
A211 ^{2,3}	S	S	R	S	S	S	R	8,67	S
HF465-63-1 ^{2,3}	R	R	R	R	R	S	R	8,09	S
Diacol Calima ^{2,3}	R	R	S	S	R	S	S	1,83	R
IPA1 ^{2,3}	R	S	R	S	S	S	R	6,34	S

^{1, 2} e ³ linhagens diferenciadoras propostas por Nascimento et al. (1995), Woo et al. (1996) e Alves-Santos et al. (2002), respectivamente.

^{a, b} e ^c Raças caracterizadas por Nascimento et al. (1995), Woo et al. (1996) e Alves-Santos et al. (2002), respectivamente.

? - Reação desconhecida.

As linhagens BAT477, A211, HF465-63-1, Diacol Calima e IPA1 são utilizadas na série diferenciado de Alves-Santos et al. (2002). Com base nessa série diferenciadora, a linhagem Diacol Calima, que se comportou como resistente frente ao FOP-UFV-01, impediu a classificação desse isolado na raça 6 (Tabela 1).

Observa-se a necessidade da realização de estudos envolvendo a variabilidade do *Fop* e do desenvolvimento de uma nova série diferenciadora, uma vez que as já existentes não se mostraram efetivas.

No resumo da análise de variância combinada (Tabela 2), as fontes de variação Experimento (E) e Testemunha (T) foram significativas ($P < 0,01$) para ambas as metodologias de avaliação utilizadas. Isso já era esperado uma vez que cada experimento continha um determinado grupo de linhagens e as testemunhas em

comum (Manteigão Fosco 11, VP8 e Meia Noite) têm reações diferenciadas quanto à reação ao *Fop*. A interação T x E não foi significativa para as metodologias RPTS e %MF demonstrando comportamento consistente das linhagens Manteigão Fosco 11, VP8 e Meia Noite nos dois ambientes (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância combinada das notas de severidade da murcha-de-fusário quanto à metodologia de avaliação relativa às plantas testemunhas sadias (RPTS) e quanto a massa das plantas inoculadas frescas em relação às testemunhas (%MF). Viçosa-MG.

FV	GL	QM	
		RPTS	%MF
Blocos	2	0,3787	578,1043
Experimento (E)	1	14,5580**	4384,6507**
Testemunha (T)	2	39,0963**	2394,5496**
T x E	2	0,1180 ^{ns}	453,5326 ^{ns}
Linhagem (L)/E	192	8,9789**	1569,3303**
(T vs L)/E	2	0,9825 ^{ns}	228,1806 ^{ns}
Resíduo	198	0,4774	242,6078
Média geral		5,6	51,5
Media das linhagens		5,6	51,5
Média das testemunhas		5,2	50,6
CV (%)		12,3	30,3

^{ns} e ^{**} não significativo e significativo pelo teste F a 1% de probabilidade, respectivamente.

Quanto à observação dos sintomas nas 197 linhagens de feijoeiro, em 142 (72,1%) foi possível observar clorose e redução do crescimento das plantas em relação às não inoculadas (Tabela 3). A redução do crescimento sempre foi acompanhada por diferentes níveis de clorose. Entretanto nem sempre ocorreu correspondência entre menor crescimento das plantas e maior intensidade da clorose. Os sintomas de nanismo, murcha e morte das plantas foram observados em 73 (37,1%), 92 (46,7%) e 54 (27,4%) linhagens, respectivamente (Tabela 3). Assim, observa-se a grande importância da avaliação do sintoma redução do desenvolvimento, pois foi o sintoma de maior ocorrência.

Comparando a classificação das linhagens de feijoeiro em resistente, intermediário e suscetível por meio da avaliação utilizando-se a metodologia RPTS e a %MF, obteve-se índice de coincidência de 78,7% (Tabela 3). Cabe resaltar que,

não foi observado nenhum caso de mudança na classificação das linhagens de resistente para suscetível, e vice-versa, quando utilizada uma ou outra metodologia.

As linhagens RCI-8, CVIII-119-4, RAD/E550-284, Ouro Graúdo e VR15 foram classificadas como resistentes pela metodologia RPTS e apresentaram reação intermediária frente a %MF (Tabela 3). Entretanto, todas apresentaram valores da %MF próximos ao ponto de corte utilizado para a classificação entre resistentes e intermediários, que é de 75%. Tendo em vista que nessas linhagens somente os sintomas redução do crescimento e clorose foram observados, estas foram reinoculadas e dessa vez foram classificadas como resistentes em ambas as metodologias.

Das 197 linhagens avaliadas, 29 foram resistentes, ou seja, 14,7% das linhagens testadas (Figura 1 e Tabela 3). Duas linhagens (BRS Executivo e Cal 96) apresentaram nota média de severidade igual a um (Tabela 3).

Dentro do grupo carioca foram avaliadas 79 linhagens e sete (8,9%) foram resistentes (Figura 2 e Tabela 3). O grupo Jalo apresentou 18 (52,9%) linhagens resistentes, de um total de 34 avaliadas nesse grupo (Figura 2 e Tabela 3). Nos grupos Preto e Roxo não foram identificadas fontes de resistência, mesmo testadas 63 e 14 linhagens, respectivamente (Figura 2 e Tabela 3). No grupo Vermelho, apesar de só contar com sete linhagens na avaliação, quatro (57,1%) se mostraram resistentes e nenhuma foi suscetível (Figura 2 e Tabela 3).

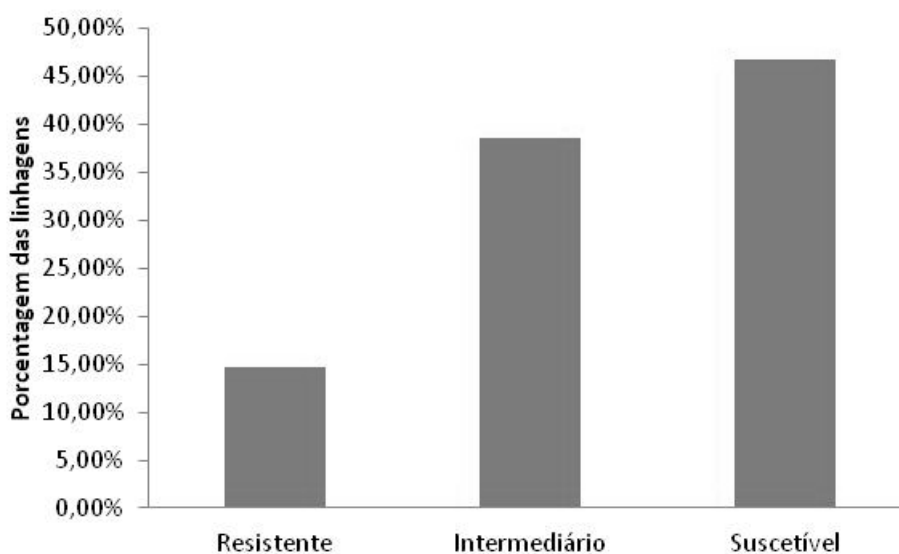


Figura 1 – Porcentagem das linhagens classificadas de acordo com os grupos suscetível, intermediário e resistente quanto a reação à *F. oxysporum*. Viçosa-MG.

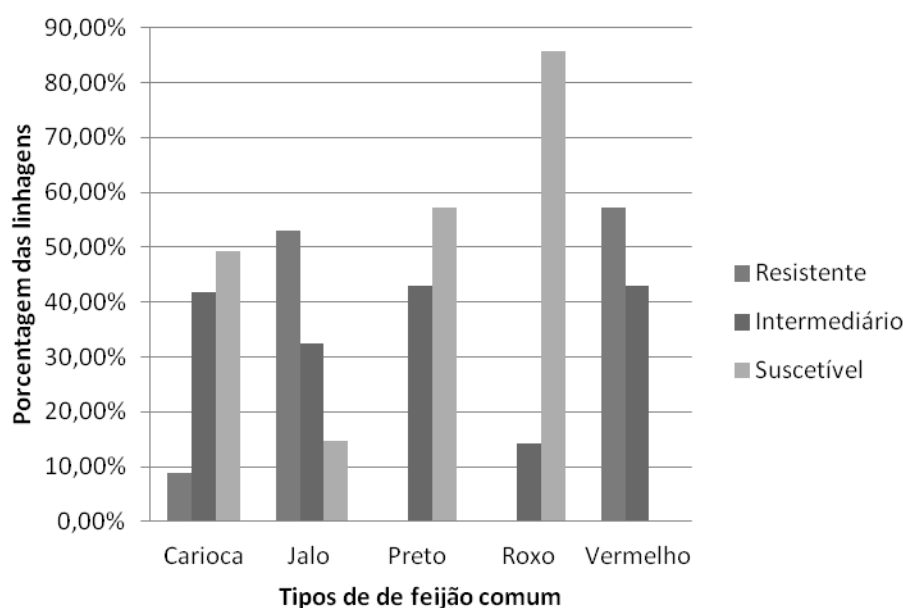


Figura 2 – Porcentagem de linhagens suscetíveis, intermediárias e resistentes à *F. oxysporum*, dentro de cada grupo de feijão-comum. Viçosa-MG.

Alguns trabalhos já foram realizados com o objetivo de identificar fontes de resistência a *Fop* e na maioria destes foram encontrados uma maior proporção de linhagens resistentes do que o encontrado neste trabalho (Balardin et al., 1990; Nascimento et al., 1995; Pastor-Corrales & Abawi, 1987; Ribeiro & Ferraz, 1984; Sala et al., 2006). Isto possivelmente se deve à metodologia de avaliação utilizada por esses autores que desconsideraram o sintoma de redução do crescimento das plantas quando infectadas com *Fop*. Corroborando com esta suposição, Pereira et al. (2011) utilizaram a metodologia de avaliação desenvolvida por Pastor-Corrales & Abawi (1987) para avaliar 367 linhagens de feijão quanto à resistência à murcha-de-fusário. Esses autores verificaram que 134 (36,5%) comportaram-se como resistentes e relataram que mais de 50% delas não apresentaram sintomas da doença.

Visando o estudo de reisolamento de *Fop*, as 29 linhagens resistentes foram reinoculadas. Como esperado, nenhuma apresentou sintoma. Entretanto, foi possível o reisolamento do patógeno em todas as linhagens. Esses resultados corroboram os de Ribeiro & Ferraz (1984) e Dongo & Müller (1969), que também relatam o reisolamento do *Fop* de genótipos resistentes. À exceção da cultivar Ouro Vermelho, não foi observado escurecimento vascular nessas linhagens.

A maioria das cultivares de feijoeiro recomendadas dos grupos comercial preto e carioca, os mais cultivados no Brasil, apresentaram reação intermediária ou de suscetibilidade a murcha-de-fusário. É válido ressaltar que mesmo para as cultivares resistentes como a BRSMG Talismã, foi constatada redução do crescimento. Em campo esse sintoma provavelmente ocorre, mas não é observado, devido à impossibilidade da comparação com plantas não inoculadas. Possíveis reduções de produtividade podem estar ocorrendo devido à murcha-de-fusário sem ser observada. Assim, é necessário a realização de estudos visando a observação do comportamento dos sintomas das murcha-de-fusário em campo e, se possível, fazer associações com a produtividade.

Tabela 3 – Caracterização de linhagens de feijão quanto à murcha-de-fusário. Viçosa-MG.

Linhagens	Sintomas					Notas de severidade	%MF ⁴	Grupo Comercial
	CI ¹	RC	N	MU	M			
VC1	X ²	X	-	-	-	5,25 – I ³	55,74 – I ³	Carioca
VI0669C	X	X	-	-	-	5,34 – I	52,08 – I	Carioca
VI4599C	X	X	-	-	-	5,84 – I	57,06 – I	Carioca
VI4899C	X	X	-	-	-	3,50 – I	69,22 – I	Carioca
CNFC8059	X	X	-	-	-	5,17 – I	51,77 – I	Carioca
CV46	X	X	-	X	-	4,67 – I	50,77 – I	Carioca
MAI-18-13	X	X	-	X	-	4,00 – I	70,13 – I	Carioca
MAI-2-5	X	X	-	-	-	6,00 – I	52,30 – I	Carioca
VC10	X	X	-	-	-	6,00 – I	42,89 – I	Carioca
VC11	X	X	-	-	-	5,67 – I	39,67 – S	Carioca
VC12	X	X	-	-	-	5,84 – I	40,22 – I	Carioca
VC8	X	X	-	-	-	4,84 – I	36,80 – S	Carioca
Z22	X	X	-	X	-	5,00 – I	55,76 – I	Carioca
BRSMG Majestoso	X	X	-	-	-	5,34 – I	40,92 – I	Carioca
CNFC10764	X	X	-	-	-	4,67 – I	47,18 – I	Carioca
CNFC9500	-	-	X	X	-	5,00 – I	58,90 – I	Carioca
MAII-22	X	X	-	-	-	5,34 – I	47,99 – I	Carioca
Pérola	X	X	-	-	-	5,17 – I	51,59 – I	Carioca
VC13	X	X	-	-	-	6,00 – I	37,53 – S	Carioca
VC14	X	X	X	X	-	5,67 – I	47,02 – I	Carioca
CNFC10408	X	X	-	-	-	5,50 – I	41,15 – I	Carioca
MAIV-15.204	X	X	-	-	-	3,84 – I	62,21 – I	Carioca

Continua...

Tabela 3, Continuação

Linhagens	Sintomas					Notas de severidade	%MF ⁴	Grupo Comercial
	CI ¹	RC	N	MU	M			
MAIV-18.259	X	X	-	-	-	5,17 – I	54,49 – I	Carioca
MAIV-18.524	X	X	-	X	-	5,67 – I	56,79 – I	Carioca
RCII-2-19	X	X	-	-	-	4,34 – I	72,35 – I	Carioca
VC20	X	X	-	-	-	6,00 – I	48,55 – I	Carioca
VC21	X	X	-	-	-	4,67 – I	56,44 – I	Carioca
VC23	X	X	-	-	-	4,67 – I	63,64 – I	Carioca
mar/02	X	X	-	-	-	4,83 – I	51,55 – I	Carioca
Rudá-R	X	X	X	X	-	5,84 – I	32,39 – S	Carioca
RP1	X	X	-	X	-	3,50 – I	69,11 – I	Carioca
CNFC10453	X	X	-	-	-	3,80 – I	64,89 – I	Carioca
CVIII-5	X	X	-	-	-	3,50 – I	59,17 – I	Carioca
CV55	X	X	-	-	-	2,42 – R	104,58 – R	Carioca
RCI-8	X	X	-	-	-	2,84 – R	72,27 – I	Carioca
BRSMG Talismã	X	X	-	-	-	2,84 – R	78,27 – R	Carioca
CVIII-119-4	X	X	-	-	-	2,34 – R	74,49 – I	Carioca
CVIII-32-24	X	X	-	X	-	2,84 – R	85,00 – R	Carioca
CVIII-85-11	X	X	-	-	-	1,17 – R	134,71 – R	Carioca
CVIII-2	X	X	-	-	-	2,84 – R	104,75 – R	Carioca
CNFC10720	X	X	-	-	-	7,00 – S	29,81 – S	Carioca
VC2	-	-	X	X	X	6,33 – S	42,31 – I	Carioca
VC4	X	X	-	-	-	6,25 – S	23,61 – S	Carioca
VC5	X	X	X	X	X	7,17 – S	37,63 – S	Carioca
BRS Horizonte	-	-	X	X	X	8,00 – S	33,64 – S	Carioca
CNFC10443	-	-	-	X	X	6,83 – S	45,64 – I	Carioca
CNFC10476	-	-	-	X	-	6,84 – S	40,61 – I	Carioca
CNFC8065	X	X	-	-	-	6,17 – S	32,60 – S	Carioca
CNFC8075	X	X	-	-	-	6,59 – S	29,34 – S	Carioca
MAI-8-9	-	-	X	X	X	7,67 – S	22,02 – S	Carioca
VC6	-	-	X	X	X	8,01 – S	54,01 – I	Carioca
VC7	X	X	X	X	-	6,17 – S	52,60 – I	Carioca
VC9	X	X	X	X	-	7,34 – S	26,12 – S	Carioca
BP31	X	X	-	X	-	6,84 – S	40,06 – I	Carioca
BRS9461	-	-	-	X	-	6,34 – S	54,61 – I	Carioca
BRS Cometa	-	-	X	X	X	8,50 – S	17,47 – S	Carioca
BRSMG Madrepérola	X	X	X	X	-	6,42 – S	51,43 – I	Carioca
BRSMG Pioneiro	X	X	-	-	-	6,17 – S	31,39 – S	Carioca
CNFC10722	-	-	X	X	-	6,67 – S	54,59 – I	Carioca

Continua...

Tabela 3, Continuação

Linhagens	Sintomas					Notas de severidade	%MF ⁴	Grupo Comercial
	CI ¹	RC	N	MU	M			
CNFC9504	X	X	X	X	-	6,67 – S	51,71 – I	Carioca
CNFC9506	X	X	X	X	-	7,50 – S	27,40 – S	Carioca
RP2	-	-	X	X	-	7,75 – S	42,28 – I	Carioca
VC15	X	X	X	X	X	8,25 – S	21,16 – S	Carioca
VC16	X	X	-	-	-	6,50 – S	36,40 – S	Carioca
CNFC10432	X	X	-	X	-	6,17 – S	49,33 – I	Carioca
CNFC10763	X	X	-	X	-	6,42 – S	36,41 – S	Carioca
EMB14	X	X	X	X	X	6,67 – S	34,92 – S	Carioca
EMB4	-	-	X	X	X	8,75 – S	25,94 – S	Carioca
EMB9	-	-	X	X	X	9,00 – S	7,55 – S	Carioca
P-18.163	-	-	X	X	-	7,17 – S	24,33 – S	Carioca
VC17	-	-	X	X	-	6,75 – S	29,16 – S	Carioca
VC18	X	X	X	X	X	7,67 – S	37,84 – S	Carioca
VC19	X	X	-	-	-	6,75 – S	23,24 – S	Carioca
VC22	-	-	X	X	X	8,00 – S	22,74 – S	Carioca
Carioca 1030	X	X	X	X	-	6,10 – S	32,93 – S	Carioca
FT Bonito	X	X	-	-	X	7,17 – S	27,06 – S	Carioca
Rudá	X	X	-	-	X	7,67 – S	14,57 – S	Carioca
IAC Arua	-	-	X	X	X	8,17 – S	17,61 – S	Carioca
A805	-	-	X	X	X	8,67 – S	9,19 – S	Carioca
BJ4	X	X	-	-	-	4,25 – I	74,00 – I	Manteigão
Carnaval	X	X	-	-	-	4,84 – I	65,33 – I	Manteigão
CNFRJ10556	X	X	-	-	-	5,25 – I	44,03 – I	Manteigão
CNFRJ10564	X	X	-	-	-	3,67 – I	61,81 – I	Manteigão
AND277	X	X	-	-	-	3,17 – I	64,25 – I	Manteigão
Hooter	X	X	-	-	-	4,00 – I	63,11 – I	Manteigão
Light Red Kidney	X	X	-	-	-	3,67 – I	73,60 – I	Manteigão
Red Kanner	X	X	-	X	-	5,84 – I	42,20 – I	Manteigão
Vermelhão	X	X	-	-	-	4,50 – I	54,51 – I	Manteigão
Waf170	X	X	-	X	-	4,01 – I	62,72 – I	Manteigão
Frijolica	X	X	-	-	-	5,50 – I	45,61 – I	Manteigão
BJ1	X	X	-	-	-	1,92 – R	114,13 – R	Manteigão
BJ2	X	X	-	-	-	2,17 – R	78,17 – R	Manteigão
BJ3	X	X	-	-	-	2,00 – R	140,15 – R	Manteigão
BJ5	X	X	-	-	-	1,33 – R	89,00 – R	Manteigão
BJ6	X	X	-	-	-	1,33 – R	108,44 – R	Manteigão
BJ7	X	X	-	-	-	1,25 – R	121,18 – R	Manteigão

Continua...

Tabela 3, Continuação

Linhagens	Sintomas					Notas de severidade	%MF ⁴	Grupo Comercial
	CI ¹	RC	N	MU	M			
BJ8	X	X	-	-	-	2,17 – R	77,79 – R	Manteigão
BRS Radiante	X	X	-	-	-	2,67 – R	87,96 – R	Manteigão
CNFRJ10571	X	X	-	-	-	2,50 – R	91,07 – R	Manteigão
Jalo EEP558	X	X	-	-	-	1,42 – R	81,69 – R	Manteigão
Jalo MG65	X	X	-	-	-	1,67 – R	97,79 – R	Manteigão
RAD/E550-284	X	X	-	-	-	2,00 – R	73,60 – I	Manteigão
BRS Embaixador	X	X	-	-	-	2,17 – R	86,87 – R	Manteigão
BRS Executivo	-	-	-	-	-	1,00 – R	111,65 – R	Manteigão
Cal96	-	-	-	-	-	1,00 – R	143,58 – R	Manteigão
Ouro Branco	X	X	-	-	-	2,17 – R	76,90 – R	Manteigão
Ouro Graudo	X	X	-	-	-	2,83 – R	73,37 – I	Manteigão
Manteigão Fosco 11	X	X	-	-	-	2,33 – R	77,94 – R	Manteigão
CNFJ15288	-	-	X	X	X	8,50 – S	17,18 – S	Manteigão
Chinook	X	X	-	X	-	6,67 – S	36,84 – S	Manteigão
Montcalm	-	-	X	X	X	6,67 – S	37,16 – S	Manteigão
Waf141	X	X	X	X	X	7,67 – S	43,28 – I	Manteigão
Waf75	-	-	X	X	X	8,33 – S	20,42 – S	Manteigão
VP1	X	X	-	-	-	4,67 – I	61,87 – I	Preto
VP11	X	X	-	-	-	4,67 – I	48,20 – I	Preto
VP12	X	X	-	-	-	4,33 – I	48,45 – I	Preto
VP13	X	X	-	-	-	4,67 – I	49,96 – I	Preto
VP2	X	X	-	-	-	5,67 – I	30,80 – S	Preto
VP5	X	X	-	-	-	5,34 – I	62,10 – I	Preto
VP6	X	X	-	-	-	5,67 – I	33,68 – S	Preto
VP7	X	X	-	-	-	5,67 – I	32,21 – S	Preto
VP8	X	X	-	-	-	5,17 – I	43,07 – I	Preto
CNFP10047	X	X	-	-	-	5,84 – I	30,11 – S	Preto
CNFP10180	X	X	-	-	-	3,34 – I	61,72 – I	Preto
CNFP10227	X	X	-	X	-	4,42 – I	70,38 – I	Preto
CNFP8108	X	X	-	-	-	5,50 – I	42,77 – I	Preto
VP15	X	X	-	-	-	4,50 – I	66,37 – I	Preto
VP16	X	X	-	-	-	3,67 – I	66,74 – I	Preto
VP18	X	X	X	X	X	5,59 – I	45,05 – I	Preto
BRS Campeiro	X	X	X	X	-	5,50 – I	67,03 – I	Preto
CNFP10798	X	X	-	-	-	5,50 – I	64,97 – I	Preto
CNFP7994	X	X	-	X	-	5,67 – I	50,58 – I	Preto
CNFP9328	X	X	-	-	-	5,84 – I	60,65 – I	Preto

Continua...

Tabela 3, Continuação

Linhagens	Sintomas					Notas de severidade	%MF ⁴	Grupo Comercial
	CI ¹	RC	N	MU	M			
VP21	X	X	-	-	-	5,34 – I	61,48 – I	Preto
CNFP10793	X	X	-	-	-	5,84 – I	60,71 – I	Preto
CNFP11977	X	X	-	-	-	3,33 – I	64,39 – I	Preto
CNFP11980	X	X	-	-	-	4,50 – I	39,39 – S	Preto
Diamante Negro	X	X	-	-	-	5,67 – I	70,14 – I	Preto
Xamego	X	X	-	-	-	5,17 – I	68,61 – I	Preto
VP4	X	X	-	-	-	4,00 – I	71,78 – I	Preto
VI5500P	X	X	X	X	X	8,00 – S	27,83 – S	Preto
VI5700P	X	X	-	-	-	6,33 – S	35,95 – S	Preto
VI7800P	X	X	-	-	-	6,17 – S	31,29 – S	Preto
VP3	X	X	-	-	-	6,17 – S	22,50 – S	Preto
CNFP7726	-	-	X	X	X	8,50 – S	25,68 – S	Preto
CNFP7777	X	X	-	-	-	7,00 – S	25,81 – S	Preto
MN34-20	-	-	X	X	X	7,67 – S	30,52 – S	Preto
MN34-46	-	-	X	X	X	7,75 – S	28,99 – S	Preto
MN34-53	-	-	X	X	X	7,92 – S	30,65 – S	Preto
MN34-66	-	-	X	X	X	8,50 – S	20,39 – S	Preto
MN37-2	-	-	X	X	-	6,50 – S	43,77 – I	Preto
MN38-44	-	-	X	X	-	7,49 – S	45,14 – I	Preto
VP14	X	X	X	X	X	6,42 – S	42,03 – I	Preto
VP17	-	-	X	X	X	8,00 – S	22,29 – S	Preto
VP19	X	X	X	X	X	7,34 – S	43,35 – I	Preto
BRS8000	X	X	X	X	-	7,75 – S	30,99 – S	Preto
BRS Supremo	-	-	X	X	X	9,00 – S	9,53 – S	Preto
BRS Valente	-	-	X	X	X	8,84 – S	12,23 – S	Preto
CNFP10802	X	X	-	-	-	6,17 – S	46,81 – I	Preto
CNFP7966	-	-	X	X	-	7,75 – S	19,50 – S	Preto
CNFP8096	X	X	X	X	-	6,33 – S	43,42 – I	Preto
Ouro Negro	X	X	-	-	-	7,17 – S	27,43 – S	Preto
VP20	X	X	-	-	-	6,84 – S	41,16 – I	Preto
VP22	-	-	X	X	X	8,67 – S	16,41 – S	Preto
VP23	-	-	X	X	X	8,75 – S	13,34 – S	Preto
BRS Esplendor	X	X	-	-	-	6,50 – S	24,36 – S	Preto
CNFP10103	X	X	X	X	-	6,50 – S	60,24 – I	Preto
CNFP11990	-	-	X	X	X	8,84 – S	16,77 – S	Preto
CNFP11992	-	-	X	X	-	6,17 – S	53,21 – I	Preto
VP24	-	-	X	X	X	9,00 – S	7,77 – S	Preto

Continua...

Tabela 3, Continuação

Linhagens	Sintomas					Notas de severidade	%MF ⁴	Grupo Comercial
	Cl ¹	RC	N	MU	M			
VP25	-	-	X	X	X	6,42 – S	61,33 – I	Preto
VP26	-	-	X	X	X	9,00 – S	5,73 – S	Preto
VP27	-	-	X	X	X	9,00 – S	9,47 – S	Preto
VP28	-	-	X	X	X	9,00 – S	6,79 – S	Preto
VP29	-	-	X	X	X	9,00 – S	10,34 – S	Preto
Meia Noite	-	-	X	X	X	8,50 – S	24,38 – S	Preto
CNFR8149	X	X	X	X	-	4,50 – I	51,79 – I	Roxo
PT65	X	X	-	-	-	6,00 – I	52,09 – I	Roxo
BRS Pitanga	-	-	X	X	X	7,67 – S	28,18 – S	Roxo
BRS Timbó	X	X	X	X	X	7,25 – S	24,57 – S	Roxo
CNFR7847	-	-	-	X	X	7,09 – S	47,21 – I	Roxo
CNFRx10531	-	-	X	X	X	7,50 – S	39,24 – S	Roxo
CNFRx10535	-	-	X	X	X	8,00 – S	59,90 – I	Roxo
CNFRx8144	-	-	X	X	-	6,17 – S	47,75 – I	Roxo
Roxo 90	-	-	X	X	X	8,50 – S	20,78 – S	Roxo
VR3	-	-	X	X	X	8,00 – S	38,45 – S	Roxo
VR12	X	X	X	X	X	8,17 – S	13,59 – S	Roxo
CNFRx15275	-	-	X	X	X	8,00 – S	58,52 – I	Roxo
BRS Vereda	-	-	X	X	X	7,67 – S	34,33 – S	Roxo
PT68	X	X	-	-	-	6,33 – S	17,06 – S	Roxo
VR14	-	-	-	X	-	5,50 – I	26,25 – S	Vermelho
VR16	X	X	X	X	X	5,50 – I	68,96 – I	Vermelho
Vermelho 2157	X	X	-	-	-	4,67 – I	49,44 – I	Vermelho
VR15	X	X	-	-	-	3,00 – R	68,09 – I	Vermelho
VR17	X	X	-	-	-	2,00 – R	93,75 – R	Vermelho
VR18	X	X	-	-	-	2,00 – R	128,28 – R	Vermelho
Ouro Vermelho	X	X	-	-	-	2,00 – R	102,31 – R	Vermelho

¹ Cl= Clorose, Rd= redução do crescimento, N= nanismo, Mu= murcha e Mo = morte.

² X = Presença e - = Ausência.

³ R, I e S = Resistente, intermediário e suscetível, respectivamente.

⁴ Porcentagem da massa seca de plantas inoculadas em relação às testemunhas sadias.

4. CONCLUSÃO

Das 197 linhagens avaliadas, 29 foram resistentes, ou seja, 14,72% das linhagens. Entretanto foi possível o reisolamento do fungo de todas as linhagens resistentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-SANTOS, F.M.; CORDEIRO-LOPEZ, L.; SAYAGUÉS, J.M.; MARTÍN-DOMINGUES, R.; GARCIA-BENAVIDES, P.; CRESPO, M.C.; DÍAS-DOMINGUES, 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.

BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES. M.A.; OTOYA, M.M. Resistência de germoplasmas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 15: 102-103,1990.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 4.ed. Viçosa: UFV, 2005. v. 1. 525 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção de feijão 1^a, 2^a e 3^a safras**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 18 out. 2012.

COSTA, J.G.C.; RAVA, C,A.; PURÍSSIMO, J.D. Linhagens de feijoeiro comum resistentes a murcha-de-fusarium. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 21**. Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

DONGO, S. L.; MÜLLER, L. E. Estudios sobre la patogenicidad de *Fusarium osysporum* f.sp. *phaseoli* en el frijol. II. Pruebas varietales. **Turrialba**, 19:82-90, 1969.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Faostat**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acessado em: 19 novembro. 2012.

NASCIMENTO, S.R.C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A.C. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 20:214-217, 1995.

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

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. In: LACERDA, V. (Editor). Feijão de alta produtividade. **Informe Agropecuário - EPAMIG**, 25:99-112, 2004.

PEREIRA, M. J. Z.; RAMALHO, M. A. P. ABREU, A. F. B. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, 35:940-947, 2011.

PIZA, S. M. de T. Patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e reação de germoplasma de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Summa Phytopathologica**, 19:165-167, 1993.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; CARNEIRO, J.E.S. Cultivares. In: LACERDA, V. (Editor). **Feijão de alta produtividade**. Informe Agropecuário - EPAMIG, 25:99-112, 2004.

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**, 21:296-300, 1996.

RIBEIRO, C. A. G.; FERRAZ, S. Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 9:37-44, 1984.

ROCHA JÚNIOR, W.C.; SANTOS, J.B.; MENDES-COSTA, M.C. Reação de cultivares e linhagens de feijão à *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 23:407-409, 1998.

SALA, G.M.; ITO, M.F.; CARBONELL, S.A.M. Reação de genótipos de feijoeiro comum a quatro raças de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, 32:286-287, 2006.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; YOKOYAMA, M. **Principais doenças e pragas do feijoeiro comum no Brasil**. Goiânia: Embrapa-CNPAF, 1987. 53p. (Embrapa-CNPAF, Documentos, 5).

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 231 p.

WHITE, J. W. Implications of carbon isotope discrimination studies for breeding common bean under water deficits. In: EHLRINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D.; SAUGIE, B. (Ed.). **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 387-398.

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**, 86:966-973, 1996.

CAPÍTULO 4

INFECTION PROCESS OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* ON RESISTANT, INTERMEDIATE AND SUSCEPTIBLE BEAN CULTIVARS

RESUMO - O objetivo deste estudo foi entender o processo infeccioso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) em cultivares de feijão classificadas como resistente (Manteigão Fosco 11), intermediária (VP8) e susceptível (Meia Noite). Plantas dessas três cultivares foram inoculadas com *Fop* 10 dias após a emergência com uma suspensão de 1×10^6 conídios por mL. Aos 43 dias após a inoculação, segmentos de caule foram observados em microscópio eletrônico de varredura. As cultivares Manteigão Fosco 11 e VP8 apresentaram material ocluindo os vasos do xilema, os quais possivelmente restringem a colonização por *Fop*. A resistência de cultivares de feijão a *Fop*, aparentemente, também pode ser explicada pela maior compactação das células do xilema.

Palavras chave: *Phaseolus vulgaris*, murcha-de-fusário, mecanismos de resistência.

ABSTRACT - The objective of this study was to understand the infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) in bean cultivars classified as resistant (Manteigão Fosco 11), intermediate (VP8) and susceptible (Meia Noite). Plants of the three cultivars were inoculated at 10 days after the emergence with a suspension of 1×10^6 conidia of *Fop* per mL. At 43 days after the inoculation, stem segments were observed with a scanner electronic microscope. The cultivars Manteigão Fosco 11 and VP8 presented an occluding material in the xylem vessels, which may have restricted tissue colonization by *Fop*. The resistance of bean cultivars to *Fop* seemed also to be explained by the more compact xylem cells.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, Fusarium wilt, host defense.

1. INTRODUCTION

The fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder (*Fop*) is the causal agent of the Fusarium wilt on common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and is present in all the regions that produce beans in the world (Alves-Santos et al., 2002; Abawi & Pastor-Corrales, 1990; Schwartz & McMillan, 1989; Buruchara & Camacho, 2000). The inadequate rotation of cultures, especially in areas irrigated with central pivot, the lack of preventive measures of control of the pathogen dissemination and the increase of soil compaction made the Fusarium wilt one of the most important bean diseases in Brazil (Paula Júnior et al., 2006).

The dark, thick-walled chlamydospores are the long-term survival structures in soil (Abawi & Pastor-Corrales, 1990). Management practices alone may not be enough to keep the disease in low levels of intensity. Thus, the most efficient and viable alternative for the control of this disease is the use of resistant cultivars (Abawi, 1989; Abawi & Pastor-Corrales, 1990; Paula Júnior et al., 2006).

The pathogen is capable of penetrating intact root tissue, although penetration of older parts of root and hypocotyl tissue also occurs, usually through wounds or natural openings (Dongo & Müller, 1969; López-Duque & Müller, 1969; Abawi, 1989;). After penetration, hyphae of *Fop* move inter- and intracellularly and invade the xylem vessels (Mace et al., 1981). The fungus is confined to xylem vessels until the later stages of disease development, although limited invasion of the adjacent tissues may occur; growth of hyphae and transportation of microconidia in the xylem vessels are observed in susceptible cultivars (Abawi, 1989). On the other hand, in resistant plants the colonization between adjacent xylem vessels is restricted, probably as a result of chemical and structural alterations (Mace et al., 1981), including vascular occlusion by the formation of gel plugs, tyloses, deposition of additional wall layers and infusion of these structures with phenols and other metabolites (Mace et al., 1981).

Although there are some reports about the differences in the histopathology of stem tissues from resistant and susceptible bean cultivars infected by *Fop*, detailed studies that approach the infectious process in plant tissues are scarce, especially comparing the reactions of resistant, intermediate and susceptible cultivars. Therefore, the purpose of the present study was to understand the infection process of *Fop* in resistant, intermediate and susceptible bean plants.

2. MATERIAL AND METHODS

The *Fop* isolate was collected in Coimbra (Minas Gerais, Brazil) from bean plants (cv. Meia Noite), which exhibited typical symptoms of the Fusarium wilt, according to the procedures described by Dhingra & Sinclair (1995). After obtaining pure cultures, a monosporic isolate (FOP-UFV-01) was produced according to Fernandes (1993) and used to inoculate the plants.

An experiment was carried out in greenhouse to confirm the reaction of the bean cultivars Manteigão Fosco 11 (resistant), VP8 (intermediate) and Meia Noite (susceptible) to the infection by *Fop*. The experiment was installed in a completely randomized design with three repetitions. The plot was represented by one pot with three plants. A pot with three plants was used as control; in this case, distilled water was used instead of a suspension of conidia for the inoculation.

For the inoculum production, mycelium discs (0.4 cm diameter) from a growing colony of *Fop* were placed in Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA), which were incubated at 24°C during 10 days under continuous light. The following inoculation methodology was used: seeds of each cultivar were disinfected in a solution of hypochlorite 2% during 1 min, pre-germinated in germtest paper at 25°C and humidity of 100% for 24 h. After that, the seedlings were transplanted to trays containing substrate (Tropstrato HT[®], Vida Verde, Mogi Mirim, SP, Brazil), which were kept in greenhouse. Ten days after the sowing, the plants were carefully taken from the trays and their roots were washed in tap water. Approximately 1/3 of the roots were cut with scissors and discarded; the remaining roots were immersed in a suspension of macro and microconidia of *Fop* (1×10^6 conidia mL⁻¹) during 5 min. After this period, the plants were transplanted to plastic pots containing 2.5 L of the substrate and kept in greenhouse.

The severity of Fusarium wilt was evaluated at 21 DAI (Pereira et al., 2008), according to the scale of nine levels proposed by Pastor-Corrales & Abawi (1987), in which: 1 – no visible symptoms; 3 – one to three leaves, representing no more than 10% of the total foliage, are wilted and chlorotic; 5 – approximately 25% of leaves and branches exhibit wilting and chlorosis; 7 – approximately 50% of leaves and branches exhibit wilting and chlorosis; 9 – approximately 75% or more of the leaves and branches exhibit wilting, chlorosis and defoliation, eventually with plant death.

A second experiment was carried out to study the infection process of *Fop* in plants of the bean cultivars Manteigão Fosco 11, VP8 and Meia Noite. Plants of these cultivars were inoculated and kept in greenhouse as previously described. At 10 DAI, two plants from each cultivar were collected in interval of three days. The roots were discarded and the stems were washed in tap water. Then, the stems were segmented in pieces of 1.0 cm, with the purpose of monitoring the colonization of the stem tissues by *Fop* and selecting the segments that presented the transition between healthy and diseased tissue. From one plant, small fragments of approximately 0.5 cm length from the stem segments were removed, disinfected and placed in Petri dishes containing PDA. The segments of a second plant were identified and preserved in microtubes containing 2.0 mL of alcohol 70% and stored at 4°C. The fragments from each stem segment were transferred to flasks containing glutaraldehyde at 2.5% in sodium cacodylate buffer 0.1 M (pH 7.2) and stored at 4°C. After one week, the fragments were washed four times with buffer of sodium cacodylate during 10 min and post-fixated with osmium tetroxide at 1% also in sodium cacodylate buffer 0.1 M (pH 7.2) for two hours at room temperature (Curvelo et al., 2010). After that, the samples were dehydrated in alcoholic series of 30, 50, 70, 80, 95 and 100% with intervals of 10 min between the exchanges, performing three passages in the last concentration in the same interval of time. After dehydration, the fragments were submitted to drying at critical point using the “critical point dryer” model CPD 020 (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) and set over aluminum metallic supports covered with double-faced scotch tape (Curvelo et al., 2010). Then, all the fragments were covered with colloidal gold by metallization in the device “sputter coater” linked to a “freezing drying unit” model FDU010 (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). The fragments were examined in the electronic scanning microscope, model Leo 1430 VP (Carl Zeiss, Cambridge, England), operating at 10 kV, in order to obtain the electromicrographies. Fragments of stem tissues from non inoculated plants of the three cultivars were also examined for comparisons purposes.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the first experiment, the mean severity levels of Fusarium wilt were 1.1 for Manteigão Fosco 11, 6.0 for VP8 and 8.9 for Meia Noite. These results confirm that

the cultivars Manteigão Fosco 11, VP8 and Meia Noite are respectively resistant, intermediate and susceptible to *Fop*. The yellowing and wilt of plants of Meia Noite were first observed at 15 DAI. Other observed symptoms were stunting, vascular discoloration and necrosis of the stem tissues. At 21 DAI, most of the Meia Noite plants were dead. Vascular discoloration of stem tissues indicating the colonization by *Fop* was observed in plants of VP8 at 21 DAI, but not in plants of Manteigão Fosco 11. Plants of both cultivars became somewhat chlorotic and suffered less reduction in growth compared to the non-inoculated plants. The symptoms were more intense in plants of VP8 than in those of Manteigão Fosco 11.

In the second experiment, the reaction of Manteigão Fosco 11, VP8 and Meia Noite to the inoculation with *Fop* was similar to the observed in the first experiment, although disease development was slower. The yellowing and wilt symptoms of plants of Meia Noite were first observed at 25 DAI. Only at 46 DAI, most of the plants of this susceptible cultivar were dead. These variations in the disease development between experiments might be caused by differences in temperature. In the first experiment, the maximum temperature was 30.4°C and the minimum was 18.9°C while in the second experiment they were 24.3°C and 10.2°C, respectively. The temperatures during the first experiment were more favorable to the infection by *Fop* and, consequently, to symptoms development than in the second experiment. The optimum temperature for the development of *Fop* is 28°C, but the most severe symptoms of Fusarium wilt may occur at 20°C (Ribeiro & Hagedorn, 1979).

Scanning electron micrographs of stem tissues of non-inoculated and inoculated plants of Manteigão Fosco 11 (Figures 1A-E), VP8 (Figures 2A-D) and Meia Noite (Figures 3A-D) were obtained. *Fop* was re-isolated from the inoculated plants, even from the resistant cultivar Manteigão Fosco 11, in which *Fop* structures were observed in the stem tissues (Figure 1E), although the plants did not present any wilt symptom. In studies involving selection of bean cultivars resistant to Fusarium wilt, Dongo & Müller (1969) and Ribeiro & Ferraz (1984) also re-isolated *Fop* from stem tissues of plants of genotypes without external disease symptoms.

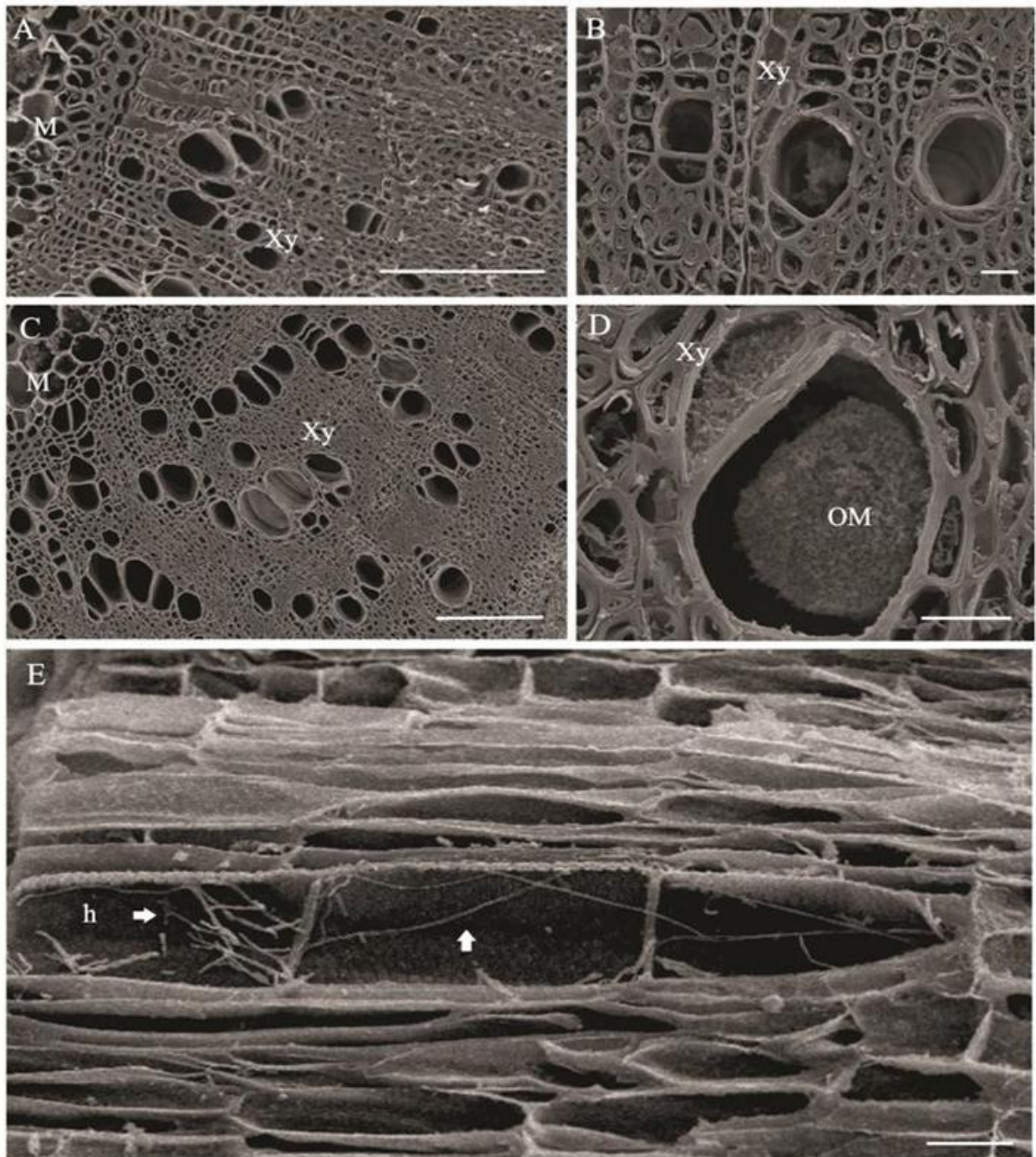


FIGURE 1 - Scanning electron micrographs of stem tissues of plants of the bean cultivar Manteigão Fosco 11 non-inoculated and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). A – Transversal cut of stem from non-inoculated plant. B – Transversal section of stem at 43 days after inoculation with *Fop*; C – Xylem vessel with occluding material; D - Detail of the xylem vessel with occluding material; E - Longitudinal section of stem containing hyphae of *Fop* in xylem vessels. M = medulla, Xy = xylem, h = hyphae of *Fop* and OM = occluding material. Bars: A = 200 μ m, B and C = 20 μ m, and D = 30 μ m.

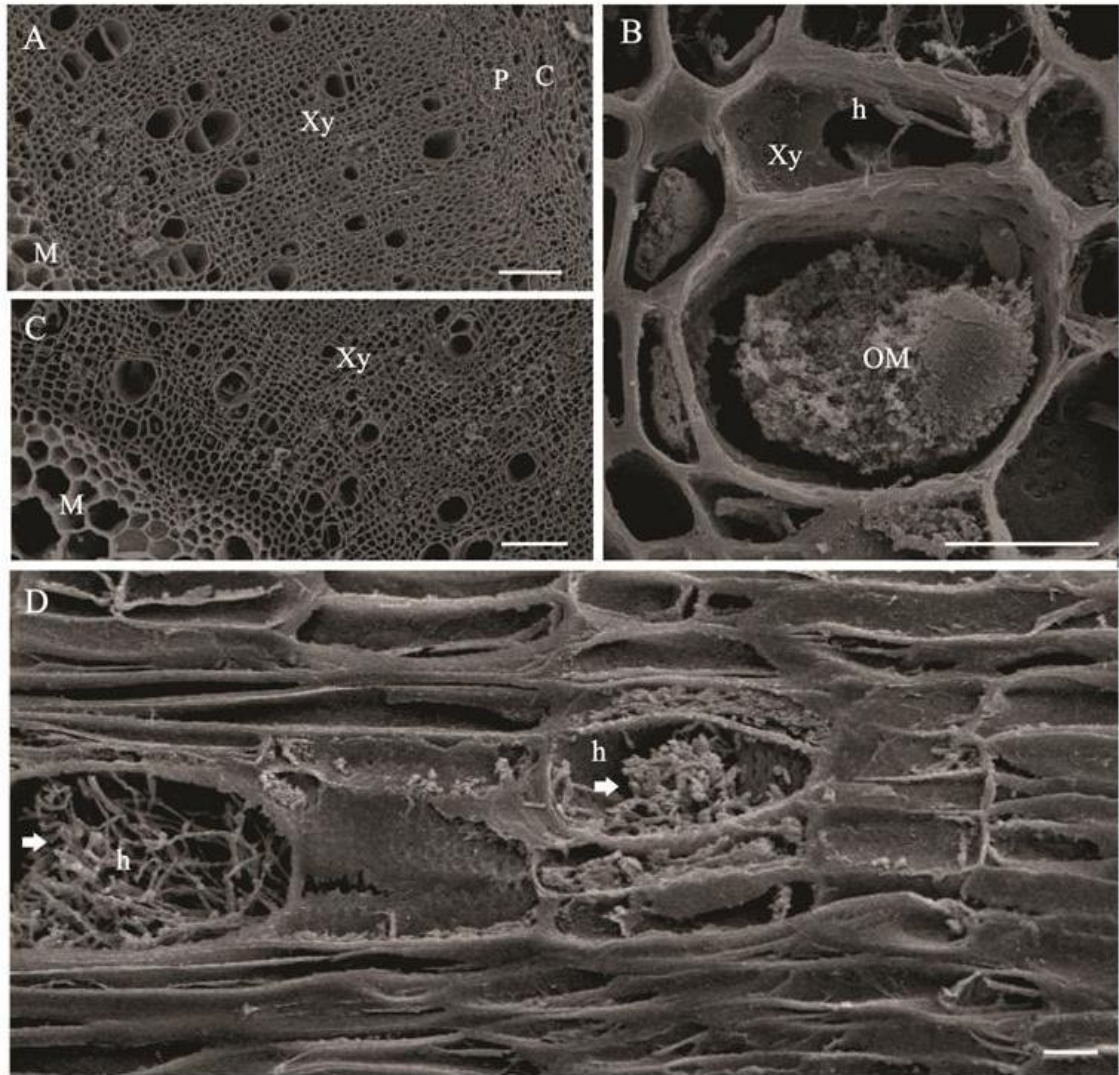


FIGURE 2 - Scanning electron micrographs of stem tissues of plants of the bean cultivar VP8 non-inoculated and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). A – Transversal cut of stem from non-inoculated plant. B – Transversal section of the stem at 43 days after inoculation with *Fop*; C – Xylem vessel containing both occluding material and hyphae of *Fop*; D – Longitudinal section of the stem with massive quantity of hyphae. M = medulla; Xy = xylem; h and arrows = hyphae of *Fop* and OM = occluding material. Bars: A = 100 μ m, B = 10 μ m and C = 20 μ m.

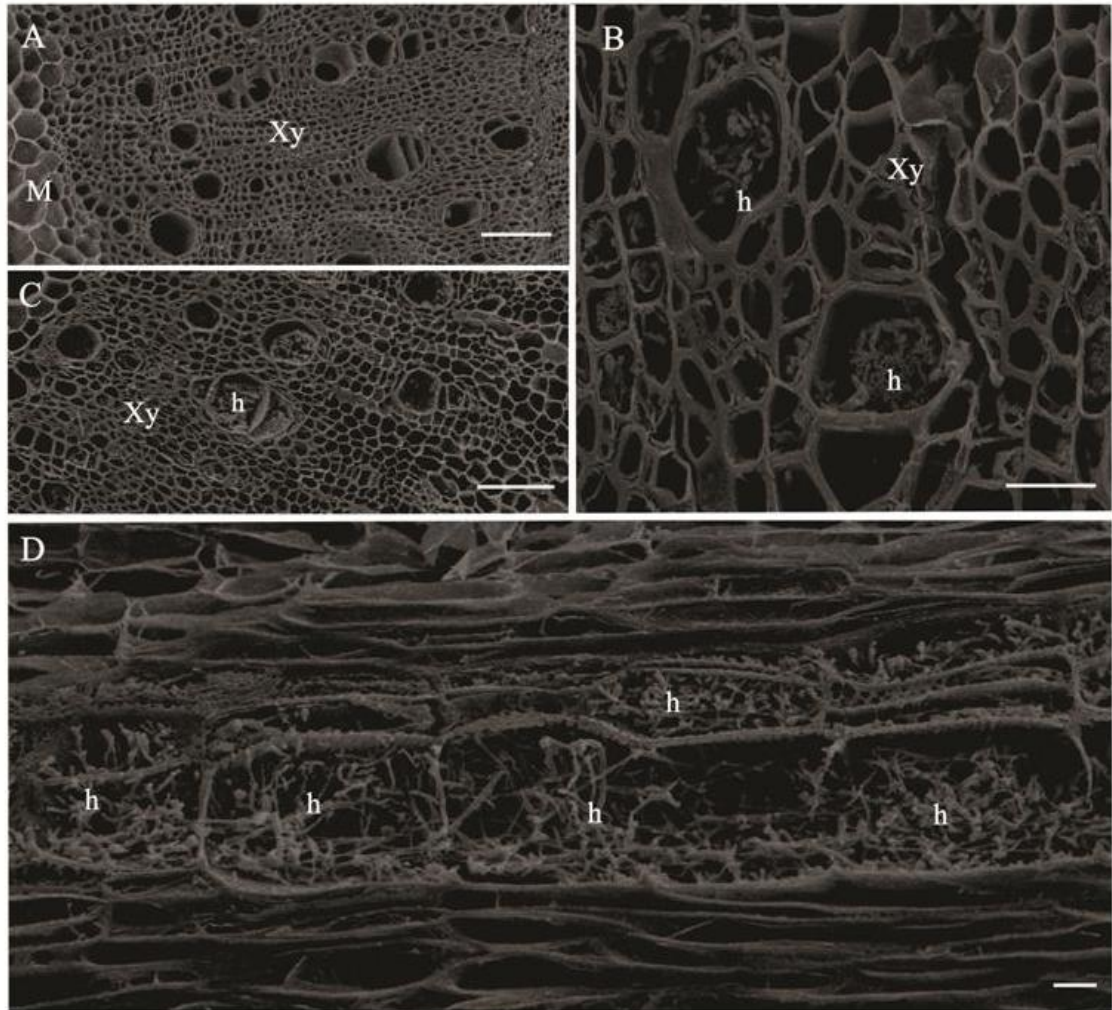


FIGURE 3 - Scanning electron micrographs of stem tissues of plants of the bean cultivar Meia Noite non-inoculated and inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). A – Transversal cut of stem from non-inoculated plant. B – Transversal section of the stem at 43 days after inoculation with *Fop*; C – Xylem vessel fulfilled with *Fop* hyphae; D - Longitudinal section of the stem with massive quantity of hyphae and destruction of the cell wall. M = medulla; Xy = xylem, and h and arrows = hyphae of *Fop*. Bars: A = 100 μm , B = 30 μm and C = 20 μm .

An occluding material was observed in the xylem vessels of inoculated plants of Manteigão Fosco 11 (Figure 1C and D) and VP8 (Figure 2C), but not in the xylem vessels of the susceptible cultivar Meia Noite. The occluding material was not observed in the xylem vessels of the non-inoculated plants. The absence of occluding material in non-inoculated plants of Manteigão Fosco 11 and VP8 suggests that this material is produced in response to the infection by *Fop* in cultivars with some level of resistance. Taking into consideration the basal resistance of Manteigão Fosco 11

and VP8 to the infection by *Fop*, it is suggested that the occluding material may be involved in the resistance of these cultivars against infection by *Fop*. Mace et al. (1981) suggested that the colonization of the pathogen is restricted in the xylem vessels of resistant cultivars. In other crops than beans, chemical and structural alterations in host tissue have been reported for resistant plants, including formation of gel plugs (Bishop & Copper, 1984), tyloses (Bishop & Copper, 1984; Van der Molen et al., 1987) and the presence of substances in the xylem vessels (Shi et al., 1992; Hall et al., 2011). However, the occluding material that was observed is not related to any of the substances reported by those authors.

The presence of *Fop* hyphae in the xylem vessels was more pronounced in the stem tissues of VP8 than in Manteigão Fosco 11 plants (Figures 1E and 2D). In the stem tissues of Meia Noite, several xylem vessels were completely fulfilled with *Fop* hyphae and the xylem cell walls were degraded (Figure 3B-D). A great amount of hyphae of *Fop* was also observed either penetrating the cells walls or passing through punctuations of the xylem vessel and invading adjacent cells (Figure 3D). Bishop & Copper (1983) also reported that the degradation of the xylem cell walls after frequent penetration of hyphae favored the infection of susceptible tomato cultivars by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and of susceptible pea cultivars by *F. oxysporum* f. sp. *pisi*.

In the stem tissues samples of the resistant cultivar Manteigão Fosco 11 (Figure 1), the xylem was more compact and the amount of *Fop* hyphae colonizing the xylem vessels was clearly lower in comparison to the other cultivars (Figures 2 and 3). Other studies have also suggested that the host resistance to the infection by pathogens that colonize the xylem may be linked to the thickening of the cell walls. Hall et al. (2011) compared cotton cultivars moderately resistant and susceptible to *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and found a more pronounced thickening of the xylem cell walls of the moderately resistant plants. Based on the results obtained on the present study, a plausible hypothesis for the resistance of cultivar Manteigão Fosco 11 to infection by *Fop* is that the xylem cell walls seemed to be thicker in comparison to the other cultivars.

4. REFERENCES

ABAWI, G.S. Root Rots. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.) **Bean production problems in the tropics**. 2nd. Ed. Cali. CIAT. pp. 105-157. 1989.

ABAWI, C.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rots of bean in Latin American and África: diagnosis, research methodologies, and amnagement strategies**. Cali. CIAT. 114 p. 1990.

ALVES-SANTOS, F.M.; CORDEIRO-LOPEZ, L.; SAYAGUÉS, J.M.; MARTÍN-DOMINGUES, R.; GARCIA-BENAVIDES, P.; CRESPO, M.C.; DÍAS-DOMINGUES, J.M.; ESLAVA, A.P. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Phatology**, 51:605-611, 2002.

BISHOP, C.D.; COOPER, R.M. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases. **Physiological Plant pathology**, 23:323-343, 1983.

BISHOP, C.D.; COOPER, R.M. Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens. **Physiological Plant Pathology**, 24:277-289, 1984.

BURUCHARA, R.A.; CAMACHO, L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. **Journal of Phytopathology**, 148:39-45, 2000.

CURVELO, C.R.S.; RODRIGUES, F.A.; BERGER, P.G.; REZENDE, D.C. Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, 35:108-113, 2010.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. New York. CRS Press. 1995.

DONGO, S.L.; MÜLLER, L.E. Estudios sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en el frijol. II. Pruebas varietales. **Turrialba**, 19:82-90, 1969.

FERNANDES, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo. Embrapa-CNPT. 1993.

HALL, C.; HEATH, R.; GUEST, D.I. Rapid and intense accumulation of terpenoid phytoalexins in infected xylem tissues of cotton (*Gossypium hirsutum*) resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 76:182-188, 2011.

LÓPEZ-DUQUE, S.L.; MÜLER, L.E. Estudio sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en frijol. I. Patogenesis histología sintomatologica. **Turrialba**, 19:71-81, 1969.

MACE, M.E.; BELL, A.A.; BECKMAN, C.H. **Fungal wilt diseases of plants**. New York NY. Academic Press. 640 p. 1981.

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

PAULA JÚNIOR T.J.; LOBO JÚNIO, R.M.; SARTORATO, A.; VIEIRA, R.F.; CARNEIRO, J.E.S.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro em áreas irrigadas - **Guia Técnico**. Viçosa. EPAMIG-CTZM. 2006.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Estratégias para eficiência da seleção de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusario. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43:721-728, 2008.

RIBEIRO, C.A.G.; FERRAZ, S. Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, 9:37-44, 1984.

RIBEIRO, R.L.D.; HAGEDORN, D.J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* the causal agent of bean yellows. **Phytopathology**, 69: 272-276, 1979.

SCHWARTZ, H.F.; MCMILLAN, M.S. Occurrence of Fusarium wilt of beans in Colorado. **Plant disease**, 73:518, 1989.

SHI, J.; MUELLER, W.C.; BECKAMAN, C.H. Vessel occlusion and secretory activities of vessel contact cells in resistant or susceptible cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 40:133-147, 1992.

VAN DER MOLEN, G.E.; BECKMAN, C.H.; RODEHORST, E. The ultrastructure of tylose formation in resistant banana following inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 31:185-200, 1987.