

**EDUARDO JOSÉ ZANELLA**

**INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE  
*Macrophomina phaseolina* NA CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO,  
MILHO E SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Trezzi Casa

**LAGES  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Zanella, Eduardo José  
Influência dos métodos de inoculação de isolados  
de *Macrophomina phaseolina* na caracterização de  
genótipos de feijão, milho e soja / Eduardo José  
Zanella. - Lages, 2018.  
118 p.

Orientador: Ricardo Trezzi Casa  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Produção Vegetal, Lages, 2018.

1. Podridão cinzenta da raiz. 2. *Glycine max*. 3.  
*Zea mays*. 4. *Phaseolus vulgaris*. 5. resistência  
genética. I. Casa, Ricardo Trezzi. II. Universidade  
do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação. III. Título.

EDUARDO JOSÉ ZANELLA

INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE  
*Macrophomina phaseolina* NA CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO,  
MILHO E SOJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca examinadora

Orientador:



Professor Dr. Ricardo Trezzi Casa

Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-  
UDESC).

Membro:



Professor Dr. Fábio Nascimento da Silva

Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-  
UDESC).

Membro:



Dr. Piérri Spolti

Monsanto Soybean Brazil Plant Health Lead.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, sobretudo, por proporcionar-me a maior dádiva já concebida a qualquer ser: a vida. Pela capacidade de transmitir paz em gestos simples, por todo amor distribuído em forma de natureza e por fim pela capacidade de sentir-me feliz.

A meus pais, Jucelei e Alfeu. Sem sombra de dúvidas a conclusão deste mestrado se deve àqueles puxões de orelha que recebi quando criança. Obrigado aos dois, por sempre acreditarem no meu potencial.

À Laura e a Geordana, além de mim, só vocês sabem o quanto difícil foi caminhar até aqui. Desde o começo, quando a primeira dificuldade era passar em estatística, depois passando por todo processamento de amostras e, por fim, pela dissertação e banca. Podem ter certeza que sempre irei retribuir o auxílio a mim prestado da melhor maneira possível.

Ao orientador e amigo, Ricardo Casa. Obrigado por cada ensinamento repassado, por cada minuto gasto esclarecendo as interações entre métodos, isolados, culturas e cultivares e também pela paciência e confiança em mim depositadas.

Aos colegas de laboratório, Amanda, André, Bruna's, Bruno's, Bueno, Carol, Diego, Prof. Fábio, Flávio, Fernandinho, Germano, Juliana, Juliano, Lucas, Maiquiel, Mateus, Mayra, Mônica, Silvio, Otávio, Zacca, entre outros. Meus sinceros agradecimentos a vocês que me ajudaram tanto ao longo desses dois anos, esse mestrado é graças a vocês.

Aos meus amigos de república em especial ao Jhow e ao Iago (Pingo), também ao Dudu, Tito e Jhony, obrigado pela amizade e por sempre estarem disponíveis pra uma boa conversa.

À família S. C. Santa Cruz, por proporcionar-me momentos de descontração em meio ao turbilhão de agitações do mestrado. Também pelos inúmeros jogos, pelas inúmeras resenhas e pelos três ligamentos rompidos. Daicão, C10, Robert, Rato, Manotelli, Celinho, Ney mito, Mique Love, entre outros, “tmj”.

À UDESC, pelo ensino gratuito e de qualidade tanto da graduação, quanto da pós.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, auxiliando na pesquisa.

Aos demais, que não foram citados aqui, mas que contribuíram de alguma forma ao trabalho realizado e à minha formação pessoal.

**Muito Obrigado!**



“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein





## RESUMO

ZANELLA, E. J. **Influência dos métodos de inoculação de isolados de *Macrophomina phaseolina* na caracterização de genótipos de feijão, milho e soja.** 2018. 118 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2018.

A podridão cinzenta da raiz causada por *Macrophomina phaseolina* é uma das principais doenças do sistema radicular de plantas de lavoura. Os objetivos deste estudo foram avaliar métodos de inoculação de *M. phaseolina* no desenvolvimento inicial de plantas de feijoeiro comum, soja e milho e quantificar a severidade de podridão cinzenta em raízes de genótipos de feijoeiro comum e seus efeitos sobre os componentes do rendimento. Os experimentos foram conduzidos em laboratório e casa de vegetação da UDESC, em Lages/SC, nos anos de 2017 e 2018. Foram utilizados isolados de *M. phaseolina* oriundos de raízes de feijão (MEMR31), de soja (MEMR57) e de milho (MEMR89). Os métodos de inoculação testados foram: disco de micélio (M1), suspensão de hifas e microescleródios incorporados ao substrato (M2) e método misto (M3), nas cultivares de soja (BMX Turbo, BMX Lança e BMX Ativa), de feijoeiro comum (IPR Tangará IPR Uirapurú e BRS Estilo) e nos híbridos de milho (Fórmula Viptera, P1630H e Status Viptera3). As avaliações foram realizadas aos 21 dias após a emergência (DAE) e na maturação de colheita (estádio R9). As variáveis avaliadas nos métodos de inoculação foram: emergência (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST). Na reação de genótipos (ANFC 9 Agro Norte, BRS Esteio, BRS Estilo, BRS Pérola, FTS Soberano, IPR Campos Gerais, IPR Tangará, IPR Tuiuiú, e IPR Uirapurú e TAA Dama) foram avaliados o número de vagens por planta (NVP), número de grãos por planta (NGP), massa de grãos por planta (MGP) e severidade de podridão cinzenta da raiz (SPR). O método misto (M3) apresentou maior redução das variáveis para feijoeiro comum e soja. Para o milho, os métodos mais eficazes foram o M1 e M2, não diferindo entre si. A cultivar de feijão BRS Estilo, o híbrido de milho P1630H e a cultivar de soja BMX Turbo foram consideradas suscetíveis ao patógeno em comparação às demais cultivares/híbridos. A inoculação em feijoeiro comum resultou em redução de todos os componentes do rendimento, sendo de 7,6% para NVP, de 11% para NGP, de 12,4% para MGP e de 54,4% de MSR em relação à testemunha. A severidade da podridão cinzenta da raiz em todos os genótipos de feijoeiro comum foi superior a 75%. Concluiu-se que: o método de inoculação misto (M3) foi o mais eficaz em propiciar a infecção de *M. phaseolina*, em feijoeiro comum e na soja; nas três culturas, existem graus de suscetibilidade contrastantes entre cultivares/híbridos, em relação à origem dos isolados e aos métodos de inoculação; o patógeno reduz a E, MSPA, MSR e MST, influenciando negativamente no desenvolvimento inicial de plantas de feijoeiro comum; todos os genótipos testados foram considerados suscetíveis à podridão cinzenta da raiz, acarretando em redução significativa de MSR e também dos componentes do rendimento; os isolados apresentaram grau de agressividade contrastantes, sendo o MEMR31 e o MEMR57 considerados mais agressivos que o MEMR89.

**Palavras chave:** Podridão cinzenta da raiz; *Glycine max*; *Phaseolus vulgaris*; *Zea mays*; resistência genética.



## ABSTRACT

ZANELLA, E. J. **Influence of inoculation methods of *Macrophomina phaseolina* isolates on the characterization of bean, corn and soybean genotypes.** 2018. 118 p. Dissertation (Master's degree in Plant Production, Research area: Plant Protection and Agroecology) – Santa Catarina State University, Postgraduate program in Plant Production, Lages, 2018.

Charcoal rot caused by the fungus *Macrophomina phaseolina* is one of the main diseases of the root system of crop plants. The main goal of this study was to evaluate the methods of inoculation of *M. phaseolina* and its effects on the initial development of common beans, soybean and corn plants, also to quantify the severity of charcoal rot roots and its effects on the compounds of yield. The experiments were performed in laboratory and under greenhouse conditions in UDESC, in Lages/SC, in 2017 and 2018 years. Isolates of *M. phaseolina* from roots of common beans (MEMR31), soybeans (MEMR57) and corn (MEMR89) were used. The inoculation methods used were: mycelium disk (M1), suspension of hyphae and microsclerodes incorporated into the soil (M2) and mixed method (M3). In soybean varieties BMX Turbo, BMX Lança and BMX Ativa, common bean varieties IPR Tangará IPR Uirapurú and BRS Estilo, and in hybrids of corn Fórmula Viptera, P1630H and Status Viptera3. The evaluations were realized 21 days after emergence (DAE) and in the harvest maturation (R9 stage). In the methods experiment the parameters evaluated were: emergence (E), dry mass of aerial part (DMAP), root dry mass (RDM) and total dry mass (TDM). In the reaction of genotypes (ANFC 9 Agro Norte, BRS Esteio, BRS Estilo, BRS Pérola, FTS Soberano, IPR Campos Gerais, IPR Tangará, IPR Tuiuiú, e IPR Uirapurú and TAA Dama) were evaluated foliar area (FA), number of pods per plant (NPP), number of grains per plant (NGP), mass of grains per plant (MGP) and severity of charcoal root rot (CRR). The mixed method (M3) showed higher reduction of variables to common beans and soybean. For corn, the methods M1 and M2, not different from each other, were the most effective against the M3. The variety of common beans BRS Estilo, the hybrid of corn P1630H and the variety of soybean BMX Turbo were the most susceptible to the pathogen against the others varieties/hybrids. The inoculation in common beans resulted in reduction of all yield compounds being 7,6% of NPP, 11% of NGP, 12,4% of MGP, 54,4% of RDM, in comparison of witness. The severity of charcoal root rot in all genotypes of common beans was higher than 75%. It was concluded that: the mixed method of inoculation was the most effective to provide the infection of *M. phaseolina*, into common beans and soybeans; In the three cultures there are a degree of susceptibility between varieties/hybrids, in relation of origin of isolates and methods of inoculation; the pathogen was responsible to reduce the E, DMAP, RDM e TDM, negatively influencing the initial development of common bean plants; All the genotypes tested were susceptible to charcoal rot resulting in less production of RDM and also the compounds of yield; The isolates showed degree of contrasting aggressiveness, being the MEMR31 and the MEMR57 considered the most aggressive against the MEMR89.

**Key words:** Charcoal rot; *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, genetic resistance.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da produção agrícola brasileira de feijão (1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> safras).....	24
Figura 2 - Mapa da produção agrícola brasileira de milho 2017/18 (1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> safras).....	26
Figura 3 - Mapa da produção agrícola brasileira de soja (Safr 2017/18). ....	27
Figura 4 – Eletroforese em gel agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de <i>Macrophomina phaseolina</i> , utilizando oligonucleotídeos específicos.....	53
Figura 5 – Plantas de feijoeiro comum, cultivar BRS Estilo, apresentando emergência desuniforme devido à inoculação de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> (A, B e C) e emergência de plantas não inoculadas (D).....	61
Figura 6 – Microescleródios de <i>Macrophomina phaseolina</i> produzidos em raízes infectadas de soja cultivar BRS Turbo, Barracão, RS. ....	78
Figura 7 – Sementes das cultivares de feijoeiro comum do tipo carioca (A, B, C, D, E e F) e do tipo preto (G, H, I e J) utilizadas no ensaio de reação de genótipos.....	85
Figura 8 – Escala diagramática de severidade de podridão radicular em plantas de feijoeiro, sugerida por Abawi & Pastor-Corrales (1990). ....	87
Figura 9 – Detalhes de raízes de feijoeiro comum, cultivar BRS Esteio, com inoculação de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> . ....	98
Figura 10 - Plantas de feijoeiro comum, cultivar TAA Dama, próximas ao estágio de maturação fisiológica R9, apresentando sintoma secundário caracterizado por queda precoce de folhas (A, B e C), depois de inoculadas com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> . ....	99
Figura 11 – Ciclo médio das cultivares de feijoeiro comum em função da inoculação, ou não, de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018.....	104



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Identificação dos isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> utilizados nos ensaios Lages, SC, 2018. ....	50
Tabela 2 -	Resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados em função de métodos de inoculação, origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e cultivares de feijoeiro comum. UDESC, Lages/SC, 2018. ....	53
Tabela 3 –	Emergência de plantas (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), e área foliar (AF) de plantas de feijoeiro comum submetidas a isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> utilizando distintos métodos de inoculação, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	55
Tabela 4 –	Emergência de plantas (E), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST), e área foliar (AF) de plantas de feijoeiro comum em função da origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018.....	56
Tabela 5 -	Emergência de plantas (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST), e área foliar (AF) de cultivares de feijoeiro comum, submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> . UDESC, Lages/SC, 2018.....	57
Tabela 6 -	Desdobramento da análise de variância para área foliar de plantas de feijoeiro comum em função da origem dos isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e cultivares. UDESC, Lages/SC, 2018.....	58
Tabela 7 -	Desdobramento da análise de variância para massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST) médias, em função de métodos de inoculação e cultivares de feijoeiro comum, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	59
Tabela 8 -	Desdobramento da interação tripla do fator massa seca radicular média de plantas de feijoeiro comum, em função de métodos de inoculação e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	60
Tabela 9 -	Desdobramento da interação tripla do fator emergência média de plantas de feijão, em função de métodos de inoculação e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.....	62
Tabela 10 –	Resumo da análise de variância para os parâmetros analisados na cultura do milho em função de métodos de inoculação, origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e híbridos. UDESC, Lages/SC, 2018. ....	63
Tabela 11 -	Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de plantas de milho submetidas a isolados do fungo <i>Macrophomina phaseolina</i> em distintos métodos de inoculação, UDESC, Lages/SC, 2018.....	64
Tabela 12 –	Massa seca radicular (MSR) de plantas de milho em função da origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	65
Tabela 13 -	Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de híbridos de milho submetidos, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> . UDESC, Lages/SC, 2018. ....	66
Tabela 14 -	Desdobramento da análise de variância para massa seca da parte aérea (MSPA: g.planta <sup>-1</sup> ) de plantas de milho em função da origem dos isolados de	

	<i>Macrophomina phaseolina</i> e métodos de inoculação, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	67
Tabela 15 -	Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca radicular (MSR: g.raiz <sup>-1</sup> ) média de plantas de milho em função de métodos de inoculação, isolados e híbridos, UDESC, Lages/SC, 2018.....	68
Tabela 16 -	Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca total (MST: g.planta <sup>-1</sup> ) média de plantas de milho em função de métodos de inoculação, isolados e híbridos, UDESC, Lages/SC, 2018.....	69
Tabela 17 -	Resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados na cultura da soja em função de métodos de inoculação, origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e cultivares. UDESC, Lages/SC, 2018.....	70
Tabela 18 -	Emergência (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de plantas de soja submetidas a isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> utilizando distintos métodos de inoculação, UDESC, Lages/SC, 2018.....	71
Tabela 19 -	Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST) e emergência (E) de plantas de soja em função da origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018.....	72
Tabela 20 -	Emergência de plantas (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de cultivares de soja, submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018.....	73
Tabela 21 -	Desdobramento da análise de variância para emergência (E: %) média de plantas de soja em função de métodos de inoculação e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	74
Tabela 22 -	Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca da parte aérea (MSPA) média em g.planta <sup>-1</sup> , de plantas de soja em função de métodos de inoculação, isolados e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.....	75
Tabela 23 -	Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca radicular (MSR) média em g.raiz <sup>-1</sup> , de soja em função de métodos de inoculação, isolados e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	76
Tabela 24 -	Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca total (MST) média em g.planta <sup>-1</sup> , de soja em função de métodos de inoculação, isolados e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	77
Tabela 25 -	Resumo da análise de variância para os fatores de variação (FV): emergência de plantas (E); massa seca de parte aérea (MSPA); massa seca radicular (MSR); massa seca total (MST) e área foliar (AF), avaliados na cultura do feijoeiro comum em função da origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e cultivares. UDESC, Lages/SC, 2018. ....	88
Tabela 26 -	Emergência de plantas (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST) e área foliar (AF), de plantas de feijoeiro comum em função da origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	89
Tabela 27 -	Emergência (E) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018.....	90



Tabela 28 – Massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	91
Tabela 29 – Massa seca radicular (MSR) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	92
Tabela 30 – Massa seca total (MST) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	93
Tabela 31 – Área foliar (AF) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	93
Tabela 32 - Resumo da análise de variância para os fatores de variação (FV): número de vagens por planta (NVP); número de grãos por planta (NGP); massa de grãos por planta (MGP) e massa seca radicular (MSR), avaliados na cultura do feijoeiro comum em função de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e cultivares. UDESC, Lages/SC, 2018. ....	94
Tabela 33 – Número de vagens por planta (NVP), número de grãos por planta (NGP), massa de grãos por planta (MGP) e massa seca radicular (MSR) de plantas de feijoeiro comum em função da origem de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> . UDESC, Lages/SC, 2018. ....	95
Tabela 34 – Número de vagens por planta (NVP) de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	96
Tabela 35 – Número de grãos por planta (NGP) de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	97
Tabela 36 – Massa de grãos por planta (MGP) de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	97
Tabela 37 – Massa seca radicular (MSR) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> , UDESC, Lages/SC, 2018. ....	100
Tabela 38 - Desdobramento da análise de variância para número de grãos por planta (NGP: grãos.planta <sup>-1</sup> ) de feijoeiro comum em função de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	100
Tabela 39 - Desdobramento da análise de variância para massa de grãos por planta (MGP: g.planta <sup>-1</sup> ) de feijoeiro em função de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	101
Tabela 40 - Desdobramento da análise de variância para massa seca radicular (MSR: g.raiz <sup>-1</sup> ) de plantas de feijoeiro em função de isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	102
Tabela 41 – Severidade de podridão cinzenta da raiz (SPD), causada por <i>Macrophomina phaseolina</i> em raízes de cultivares de feijoeiro comum, UDESC, Lages/SC, 2018. ....	102



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1	CENÁRIO NACIONAL DE GRÃOS .....	23
2.1.1	CENÁRIO DO FEIJOEIRO COMUM.....	23
2.1.2	CENÁRIO DO MILHO .....	25
2.1.3	CENÁRIO DA SOJA.....	26
2.2	CARACTERÍSTICAS DO FUNGO <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	27
2.2.1	Nome comum .....	27
2.2.2	Etiologia, taxonomia e características de desenvolvimento do fungo.....	28
2.2.3	Histórico e ocorrência .....	29
2.2.4	Importância econômica .....	30
2.2.5	Fatores de predisposição .....	31
2.2.6	Hospedeiros.....	32
2.2.7	Sintomatologia .....	33
2.2.8	Variabilidade genética .....	34
2.3	CICLO BIOLÓGICO DE <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	37
2.3.1	Fontes de inóculo .....	37
2.3.2	Disseminação .....	38
2.3.3	Infecção e colonização.....	38
2.3.4	Sobrevivência .....	39
2.4	ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	41
2.4.1	Rotação de culturas.....	41
2.4.2	Resistência genética.....	43
2.4.3	Controle químico.....	43
2.4.4	Medidas alternativas de controle.....	44
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Macrophomina phaseolina</i> NO ESTABELECIMENTO DE PLANTAS JOVENS DE FEIJÃO, MILHO E SOJA.....</b>	<b>45</b>
3.1	RESUMO .....	45
3.2	INTRODUÇÃO .....	46
3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	49

3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.4.1	Caracterização molecular do isolado.....	52
3.4.2	Feijoeiro comum.....	53
3.4.3	Milho.....	62
3.4.4	Soja.....	69
3.5	CONCLUSÕES.....	78
4	<b>CAPÍTULO 2 SEVERIDADE DE PODRIDÃO CINZENTA DA RAIZ E COMPONENTES DE RENDIMENTO DE CULTIVARES DE FEIJÃO SUBMETIDAS À INOCULAÇÃO COM ISOLADOS DE <i>Macrophomina phaseolina</i>.....</b>	<b>81</b>
4.1	RESUMO.....	81
4.2	INTRODUÇÃO.....	82
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
4.3.1	Subprojeto I: Avaliação de genótipos de feijoeiro comum em relação ao estabelecimento inicial da cultura.....	84
4.3.2	Subprojeto II: Reação de genótipos de feijoeiro comum à podridão cinzenta da raiz e seus efeitos nos componentes de rendimento.....	86
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4.4.1	Subprojeto I.....	88
4.4.2	Subprojeto II.....	94
4.5	CONCLUSÕES.....	104
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>106</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O aumento na capacidade de produção de alimentos torna-se indispensável em função do incremento da população mundial. Caso a estimativa de crescimento demográfico se mantenha constante, até 2050 serão 9,3 bilhões de pessoas habitando o planeta. Desta forma, haverá acréscimo na demanda de alimentos em 70% (FAO, 2017). Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas (ONU, 2018), em 2018 em torno de 815 milhões de pessoas sofrem de subnutrição crônica devido à falta de acesso ao alimento.

O Brasil é o terceiro maior exportador de alimentos no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA) e da União Europeia (UE). Todavia, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2016), acredita que o país possa tornar-se o maior exportador mundial nos próximos anos, devido à extensa área ocupada com pastagens que podem tornar-se lavouras comerciais. Segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), a estimativa para a safra 2017/18, ainda não totalmente colhida, é de 229,7 milhões de toneladas (t) de grãos.

Culturas como o feijão, o milho e a soja são consideradas fontes essenciais de proteína e energia, e constituem a base da alimentação de muitos países. Estas culturas representam três das quatro mais produzidas no Brasil (CONAB, 2018).

Geralmente os países que mais produzem feijão são também seus maiores consumidores, havendo, portanto, baixa comercialização internacional. A produção nacional de feijão na safra 2017/18 (a ser finalizada) foi estimada em torno de 3,3 milhões de toneladas, figurando o país como terceiro maior produtor mundial, atrás apenas de Índia e Myanmar. A produtividade nacional, no entanto, foi estimada em apenas 1,0 t. ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2018; NETO; SANTOS, 2018).

O Brasil ocupa também a terceira posição em produção e segunda em exportação mundial de milho. Os EUA, primeiro no *ranking* em produção de milho, à frente da China, é também o maior exportador do grão (USDA, 2018a). A produção brasileira total do cereal é aproximadamente 89 milhões de toneladas e a produtividade média situa-se em 5,3 t. ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2018).

A produção brasileira de soja da safra 2017/18 situa-se em torno de 119 milhões de toneladas, valor que, segundo levantamento do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA, 2018b) elegerá o Brasil como maior produtor mundial da oleaginosa, além de já ser o maior exportador. A produtividade nacional desta cultura situa-se em torno de 3,3 t. ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2018).

A extensa área agricultável, que chegou a inéditos 61,6 milhões de hectares (CONAB, 2018), é extremamente vulnerável à redução de produção em decorrência de estresses de caráter biótico como, por exemplo, as doenças que acometem as plantas.

Dentre as principais doenças que afetam os cultivos de feijão, milho e soja encontra-se a podridão cinzenta da raiz ou “*charcoal rot*” causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. O patógeno infecta principalmente as raízes e hastes das plantas causando podridão radicular, murcha, tombamento e morte prematura (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

Embora relatos quantificando perdas e danos decorrentes da infecção deste patógeno sejam escassos, Ferreira et al. (1979), estimaram 50% de ‘perdas’ (neste caso o termo correto seria dano por tratar-se de redução na produção) nas cultivares tardias de soja Viçosa e Santa Rosa, no estado do Paraná na safra 1975/76. Wrather & Kending (1998), relatam danos de 1,23 milhão de toneladas métricas na cultura da soja, na safra de 1994, em países como Argentina, Brasil, Canadá, Paraguai e EUA. Individualmente, nos EUA, os danos atribuídos à podridão cinzenta foram de 0,28 milhões de toneladas métricas.

O uso de cultivar resistente é a estratégia de controle mais viável para esse patossistema (MAYÉK-PÉREZ et al., 2003; CRUCIOL; COSTA, 2018; ISHIKAWA et al., 2018), no entanto, para as culturas do feijoeiro, do milho e da soja existem poucos trabalhos sobre resistência de genótipos à *M. phaseolina*.

Os objetivos gerais deste trabalho foram: i) avaliar a eficiência de métodos de inoculação de *M. phaseolina* nas culturas do feijão, milho e soja; ii) avaliar o comportamento de genótipos de feijoeiro comum inoculados com isolados de *M. phaseolina*; iii) avaliar os componentes do rendimento e a severidade de podridão cinzenta da raiz de genótipos de feijoeiro comum submetidos à inoculação com isolados de *M. phaseolina*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CENÁRIO NACIONAL DE GRÃOS

O Brasil figura em terceiro lugar como maior exportador de alimentos a nível mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA) e Europa (FAO, 2017). Segundo levantamento da CONAB (2018), a estimativa para a safra 2017/18, ainda não totalmente colhida, é de 229,7 milhões de toneladas de grãos.

A área total cultivada no país foi de 61,6 milhões de hectares, ocorreu um acréscimo de 1,2% ou 709,6 mil hectares em relação à safra 2016/17 (CONAB, 2018). A abertura de novas áreas para o cultivo de grãos está ligada diretamente a substituição de áreas de pastagens degradadas pelo cultivo mecanizado, principalmente nas regiões centro-oeste e norte do país.

Culturas como o feijão, o milho e a soja são consideradas fontes essenciais de proteína e energia, e constituem a base da alimentação de muitos países. Estas culturas juntas representam três das quatro mais produzidas no Brasil, sendo a soja a primeira, o milho a segunda, o arroz a terceira e o feijão a quarta (CONAB, 2018).

#### 2.1.1 CENÁRIO DO FEIJOEIRO COMUM

O feijão é um alimento rico em nutrientes e está presente nas refeições diárias do brasileiro. Além disso, é base da fonte de renda de muitas famílias que sobrevivem da agricultura familiar. Os vários tipos de feijão conhecidos (comum, cores, caupí, etc.) são cultivados em todas as regiões do Brasil (NETO; SANTO, 2018).

Geralmente os países que mais produzem feijão são também os maiores consumidores, havendo, portanto, baixa comercialização internacional. A produção nacional de feijão na safra 2017/18 (a ser finalizada) está em torno de 3,3 milhões de t, figurando o país como terceiro maior produtor mundial, atrás da Índia e Myanmar (CONAB, 2018).

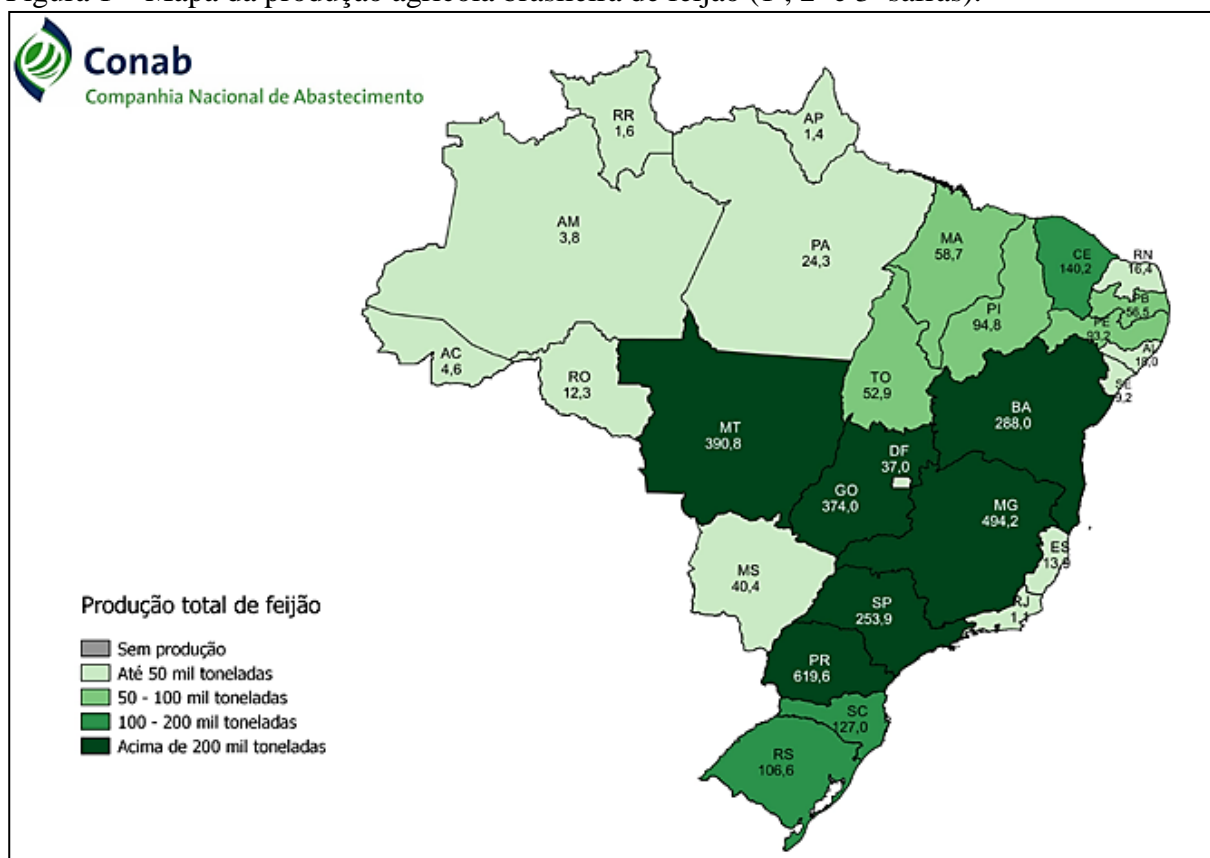
A área total cultivada com a leguminosa na safra 2017/18 foi de 3,17 milhões de hectares. O feijoeiro é cultivado em três épocas no Brasil. A 1ª se estende de outubro a dezembro, a 2ª de fevereiro a março e a 3ª de abril a junho. O cultivo de feijão na 1ª safra foi de 1,05 milhão de hectares, na 2ª o cultivo sofreu acréscimo de 121,3 mil hectares, em relação à safra passada, chegando a 1,5 milhão de hectares. Todavia, a área cultivada com a terceira safra é altamente dependente dos resultados da 1ª e 2ª, se estas forem boas em termos de

produção e comercialização, a tendência da 3ª é diminuir em área cultivada, o inverso também é válido. Desta forma, a área cultivada com feijão 3ª safra neste ano será 4,8% menor, ou 31 mil hectares a menos, totalizando 611,4 mil hectares.

A produtividade nacional está em torno de 1,0 t por hectare. A 1ª e a 3ª safras não apresentaram grande variação em relação à safra passada, porém para a 2ª safra observou-se acréscimo de 2,2% na produtividade, chegando a 860 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2018).

Os estados do PR com 619,6, MG com 494,2 e MT com 390,8 mil t, são em ordem, os maiores produtores brasileiros de feijão (Figura 1). Juntos são responsáveis por 45,1% de todo feijão produzido no país. No estado de SC, todavia a produção é menor, 127,0 mil t, representando apenas 3,2% da produção nacional. As maiores produtividades foram observadas com mesmo valor nos estados de SP e GO (2.393 kg ha<sup>-1</sup>) e no DF (2.312 kg ha<sup>-1</sup>). Novamente, SC figura com menores índices, apresentando a 5ª maior produtividade nacional (1.791 kg ha<sup>-1</sup>) devido a menor área cultivada com o grão em relação aos demais estados (CONAB, 2018).

Figura 1 – Mapa da produção agrícola brasileira de feijão (1ª, 2ª e 3ª safras).



Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018).



### 2.1.2 CENÁRIO DO MILHO

O milho pertencente à família Poaceae é um dos cereais mais cultivados no mundo. A cultura é de origem mexicana, porém apresentou adaptação às condições de solo e clima brasileiro, sendo até a presente data, a segunda cultura em importância econômica do país (CONAB, 2018). Fonte de energia, o cereal possui extrema importância também na alimentação animal, principalmente para suínos e aves. O cultivo é estendido a todas as regiões brasileiras em primeira e segunda safra.

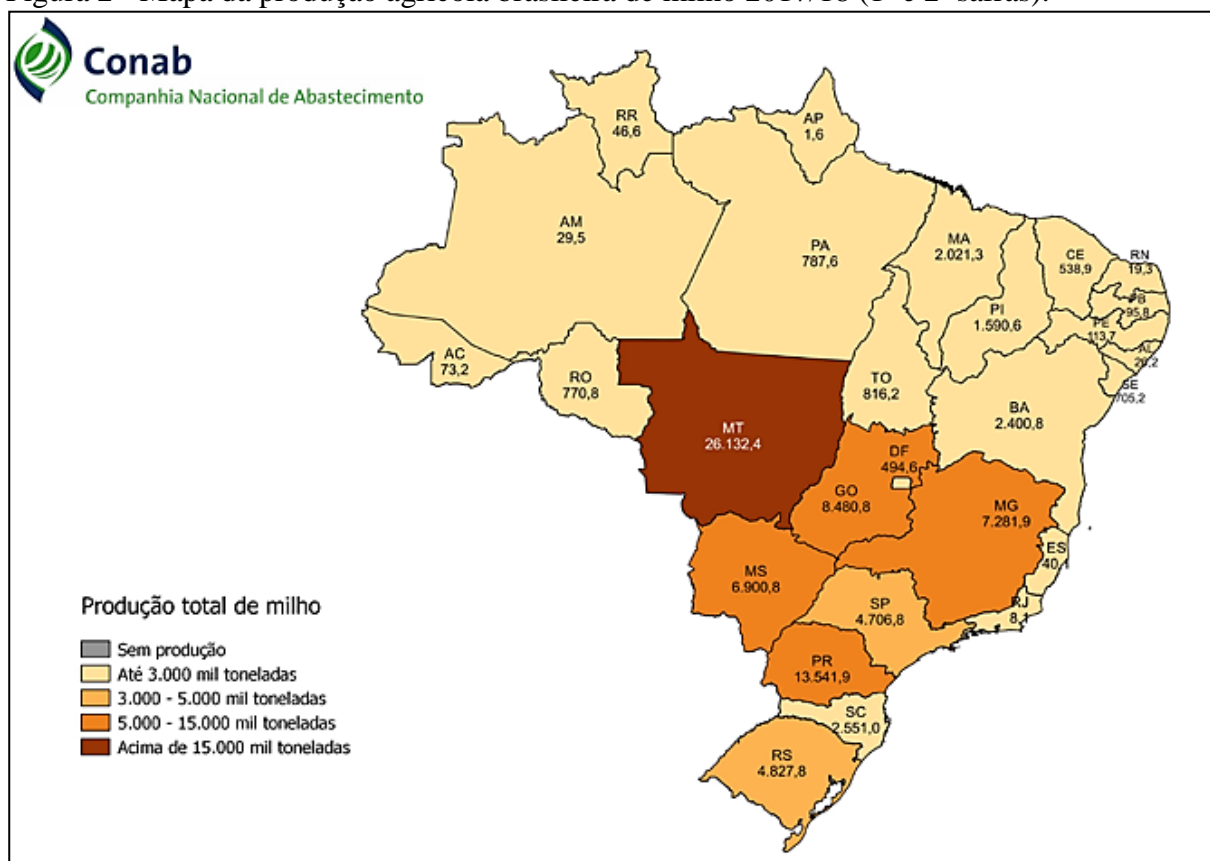
O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, ficando atrás apenas dos EUA e da China, e o segundo maior exportador, sendo os EUA o primeiro (USDA, 2018a). A produção brasileira do cereal é baseada em 1ª e 2ª safras. Em conjunto, as duas safras produziram, aproximadamente, 89 milhões de toneladas. A 1ª safra, cultivada principalmente na região sul do país, representa 26,2 milhões de t, enquanto a 2ª safra, cultivada principalmente nas regiões centro-oeste e nordeste do país, representa 62,9 milhões de t (CONAB, 2018).

A área cultivada com o cereal sofreu redução de 5,2% em relação à safra passada, mesmo assim foram cultivados ainda 16,6 milhões de hectares. A diferença na primeira safra foi de 5,5 para 5,1 milhões de hectares, na 2ª safra a queda foi maior, apresentando decréscimo de 12,1 para 11,6 milhões de hectares. Isto é resultado direto da expectativa de compra e venda do mercado futuro e das condições climáticas para o ano subsequente, fatores estes que são analisados pelos produtores na tomada de decisão em relação ao tamanho da área a ser cultivada, (CONAB, 2018).

A produtividade nacional de milho é de 5,1 t ha<sup>-1</sup>, apresentando redução de 8,3% em relação à safra anterior. Ambas, 1ª e 2ª safras sofreram queda de produtividade, a 1ª com 5,3% e a 2ª com 9,6% a menos que a safra 2016/17. A principal razão para esta queda é o baixo investimento tecnológico dos produtores, principalmente na segunda safra, reaciosos com a baixa nos preços comercializados do produto (CONAB, 2018).

Dentre os maiores produtores de milho total (1ª e 2ª safras), figuram os estados do MT com 26,1, PR com 13,5 e GO com 8,4 milhões de t (Figura 2). Estes três estados representam 56,4% da produção nacional do cereal. Santa Catarina, apesar de ser um dos estados que mais demandam milho em virtude da alta produção de suínos e aves, produz apenas 2,5 milhões de t, representando apenas 2,9% da produção nacional. Todavia, SC é o estado com a maior produtividade do Brasil, apresentando média de 7.997 kg ha<sup>-1</sup>, seguido do DF com 7.472 kg ha<sup>-1</sup> e do RS com 6.628 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2018).

Figura 2 - Mapa da produção agrícola brasileira de milho 2017/18 (1ª e 2ª safras).



Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018).

### 2.1.3 CENÁRIO DA SOJA

A soja é a principal cultura produzida no Brasil. Os usos da leguminosa são diversos, desde alimentação humana e animal à fabricação de óleos vegetais, biodiesel, entre outros.

A produção brasileira de soja da safra 2017/18 situa-se em torno de 119 milhões de t. Valor que, segundo o USDA (2018b), elegerá o Brasil como maior produtor mundial da oleaginosa, além de já ser o maior exportador.

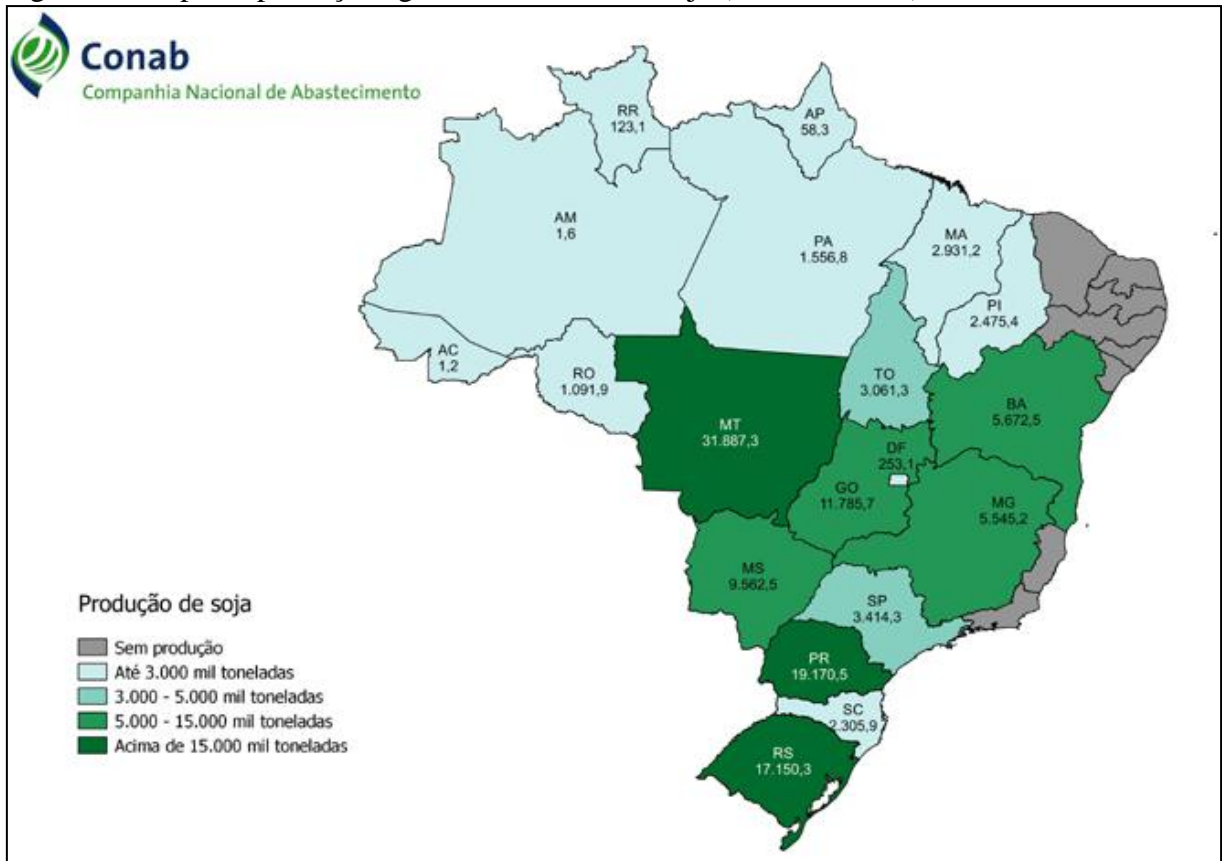
A oleaginosa no Brasil foi cultivada em 35,1 milhões de hectares, acréscimo de 3,6% ou, 1,2 milhões de hectares a mais em relação à safra passada. É o 12º aumento consecutivo da área cultivada no país, um total de 14,5 milhões de hectares novos foram cultivados, este resultado indica aumento de 69,9% em relação à safra de 2006/07 (CONAB, 2018).

A produtividade nacional desta cultura situa-se em torno de 3,3 t por hectare, não sofrendo variação em relação à safra passada (CONAB, 2018).

Majoritariamente o maior produtor brasileiro de soja é o estado do MT com 31,8 milhões de t, seguido do PR com 19,1 e do RS com 17,1 milhões de t da oleaginosa (Figura 3). A produção destes três estados em conjunto representa 57,6% da produção nacional. Santa

Catarina é responsável pela produção de 2,3 milhões de t, representando apenas 1,9% do total produzido no país. Minas Gerais apresentou na safra 2017/18 a maior produtividade nacional, com 3.676 kg ha<sup>-1</sup>, seguido do MS com 3.580 kg ha<sup>-1</sup> e SP com 3.554 kg ha<sup>-1</sup>. Santa Catarina detém apenas o 9º lugar como maior produtor nacional com média de 3.400 kg ha<sup>-1</sup>.

Figura 3 - Mapa da produção agrícola brasileira de soja (Safra 2017/18).



Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS DO FUNGO *Macrophomina phaseolina*

### 2.2.1 Nome comum

Apesar da ampla difusão de trabalhos científicos no mundo, existem divergências na denominação comum para a doença causada pelo fungo *M. phaseolina*. O nome comum de uma doença geralmente é baseado nos sintomas/sinais do patógeno e também ao sítio de infecção na planta. Assim, *M. phaseolina* por causar infecção de coloração negra/acinzentada principalmente nas raízes e hastes, é conhecida popularmente como podridão cinzenta da raiz. Todavia, muitos autores denominam esta doença como podridão negra de macrophomina,

podridão de carvão ou apenas podridão de macrofomina. Internacionalmente a doença é conhecida como: “*Charcoal rot*”, “*Charcoal root rot*”, “*Black root rot*”, “*Ashy stem blight*” ou “*Podredumbre carbonosa*”. No presente documento serão consideradas apenas as nomenclaturas de podridão cinzenta da raiz (PCR) e “*Charcoal rot*” (CR).

### 2.2.2 Etiologia, taxonomia e características de desenvolvimento do fungo

O gênero *Macrophomina* tem como definição de espécie unicamente *phaseolina*. Apesar disso, muitas denominações foram atribuídas ao fungo incluindo: *M. phaseoli* (Maubl.) Ashby, *Macrophoma conchoci* Swada, *M. cajani* Syd. and Butl., *Sclerotium bataticola* Taub., e *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler (JANA et al., 2003). Todavia, em 2018, apenas a denominação *Macrophomina phaseolina* foi observada. O fungo pertence à classe dos Coelomicetos, e a presença de um teleomorfo ainda não foi confirmada (MIHAIL; ALCORN, 1982).

Em relação ao desenvolvimento fúngico, isolados de *M. phaseolina* sofrem indução positiva à formação de picnídios quando submetidos à flutuação da temperatura durante período de exposição à luz. Este resultado foi observado por Watanabe (1972) quando quantificou a produção de picnídios de 50 isolados do fungo em diferentes métodos de crescimento micelial. Em média, o tamanho dos picnídios observados foi de 180 µm.

O desenvolvimento de colônias do fungo é observado em meio de cultura PDA (*potato*, dextrose e ágar) e também em meios seletivos, compostos de arroz e ágar (meio basal) e 1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene (agente seletivo) (WATANABE, 1972; PAPAIVIZAS; KLAG, 1975). O crescimento do micélio em geral é rasteiro e considerado rápido (sete cm em sete dias), as colônias apresentam, em geral, coloração branca nas primeiras 24 horas de crescimento, tornando-se negra com 60 horas, devido à alta concentração de microescleródios formados no meio. Martínez-Hilders & Laurentin (2012) ao caracterizar fenotipicamente isolados de *M. phaseolina*, observaram em meio de cultura PDA, crescimento micelial médio de 2,22 a 3,90 cm<sup>2</sup> em 24 horas. Pratt (2006) observou variação na produção de microescleródios em meio de cultura PDA a partir de isolados provenientes de algodão, soja e alfafa. Os microescleródios foram produzidos geralmente entre denso emaranhado de hifas, sob a superfície do ágar, tendo formato complexo (estruturas alongadas com inchaço globoso, sem delimitante). Em meio CMA (*Difco cornmeal agar*), microescleródios germinados apresentaram de uma a quatro hifas germinadas, que se estendem por mais de 100 µm a partir do microescleródio. As hifas possuem formato largo e

grosso, continua (sem cortes) e arredondado nas pontas, sendo pouco ramificada, ou não ramificada. Papavizas & Klag (1975) relatam a redução no crescimento das colônias do fungo quando as colônias contaminantes crescem nas proximidades, revelando a reduzida capacidade competitiva das colônias sobre o substrato, demonstrando importância da utilização de meios seletivos. Cloud & Rupe (1991a), observaram que um isolado de *M. phaseolina* recuperado a partir de uma planta de soja naturalmente infectada, cultivado em meio de cultura PDA apresentou crescimento caracterizado como lento (dois cm em período de sete dias), em contraste a um isolado recuperado de plantas de sorgo infectadas, do mesmo local, que apresentou crescimento colonial de 26 cm de diâmetro no mesmo período, ambas as colônias foram submetidas às mesmas condições de incubação. Shokes et al. (1977) ao mensurar o tamanho de colônias do fungo crescidas em meio ágar em diferentes potenciais hídricos, observaram decréscimo do crescimento micelial a medida que se aumentaram os valores do potencial hídrico do meio, como crescimento ótimo entre 15 e 20 bars.

O micélio do fungo foi considerado sensível à concentração de 0,5% de hipoclorito de sódio, sendo inviabilizado logo após 15 segundos em contato com a solução, todavia o mesmo não foi observado para microescleródios, capazes de manter viabilidade mesmo após 10 minutos na solução (SHORT et al., 1978).

Ao estudar a colonização de tecidos de soja por *M. phaseolina*, Short et al. (1978) relatam que o patógeno aparenta possuir duas fases ecologicamente distintas, uma fase micelial (parasítica), e uma fase microesclerodial (não parasítica).

### 2.2.3 Histórico e ocorrência

Podridão cinzenta da raiz é uma doença economicamente importante em muitos países das Américas do Norte e Sul, Ásia e África e algumas partes da Europa (JANE et al., 2003). Em geral, *M. phaseolina* provoca doença nos cultivos das regiões tropicais e subtropicais do globo especialmente quando ocorrem temperaturas de solo variando entre 25 a 40°C (DHINGRA et al., 1976; SHORT et al., 1978; BARNARD; GILLY, 1986; SINGH et al., 1990).

No estado do Missouri (EUA) os primeiros relatos de *M. phaseolina* foram no ano de 1963 (FRANCL et al., 1988).

No Japão, Watanabe (1972) recuperou 28 isolados de *M. phaseolina* provenientes do solo das regiões de Nagano, Nishigara, Hachijo e Okinawa.

Na Índia, Meyer et al. (1973) ao recuperar isolados de *M. phaseolina* a partir de tecidos vegetais infectados e do solo, observaram que a ocorrência do patógeno foi ampla, independentemente da cultura hospedeira, do tipo de solo proveniente e do regime hídrico da região, indicando que o fungo tem capacidade de sobreviver a diferentes condições ambientais.

O patógeno ocorre em distintas regiões do México, onde climas variam de árido à tropical. Nestas áreas foram observadas plantas de feijoeiro comum (entre outras) apresentando sintomas de infecção de *M. phaseolina*. Amostras de tecido infectado destas plantas foram coletadas e isolados viáveis puderam ser recuperados em meio de cultura PDA (MAYÉK-PÉREZ et al., 2001b).

Na Venezuela, Martínez-Hilders & Laurentin (2012) relatam que a zona de produção da cultura do gergelim no país está altamente infestada por microescleródios de *M. phaseolina*. No Brasil, Ferreira et al. (1979), observaram genótipos de soja apresentando graus de suscetibilidade diferente, no estado do Paraná na safra 1975/76. Almeida et al. (2003) conseguiram isolar *M. phaseolina* proveniente de área de floresta natural, onde nunca ocorreu cultivo algum. Em outro trabalho, conseguiram isolar o patógeno de um campo de produção de café (*Cooffea arabica*). O patógeno é responsável por danos à produção de soja brasileira, sendo considerado um dos mais prevalentes nos cultivos da oleaginosa no país (ALMEIDA et al., 2008).

#### **2.2.4 Importância econômica**

Embora relatos quantificando perdas e danos decorrentes da infecção deste patógeno sejam escassos, Ferreira et al. (1979), estimaram 50% de ‘perdas’ nas cultivares tardias de soja Viçoja e Santa Rosa, no estado do Paraná na safra 1975/76. Wrather & Kending 1998, estimam danos de 1,23 milhão de toneladas de grãos na cultura da soja, na safra de 1994, nos seguintes países: Argentina, Brasil, Canada, Paraguai e EUA. Individualmente, nos EUA, os danos atribuídos à podridão cinzenta foram de 0,28 milhões de toneladas, avaliadas em \$60,65 milhões de dólares, na mesma safra.

Podridão cinzenta da raiz é considerada uma das principais e mais importantes doenças causadas por fungo na cultura da soja. O fungo está presente em praticamente todos os campos de cultivo de soja dos EUA e do Brasil (GANGOPADHYAY et al., 1970; FRANCL et al., 1988; ALMEIDA et al., 2003). Em climas tropicais o fungo causa tombamento de plântulas com índices de morte de 77% (CANADAY et al., 1986).

Para a cultura arbórea do pinus, Barnard & Gilly (1986) classificam a podridão cinzenta da raiz ou *charcoal rot* como uma das mais sérias doenças que acometem este cultivo ao longo das regiões sul e oeste dos EUA. Na Flórida, em 1976, foram quantificados mais de 20 milhões de plântulas de pinus mortas em viveiros, decorrente do tombamento causado pelo patógeno.

Apesar da doença não ser considerada entre as principais doenças do cultivo do feijoeiro, podridão cinzenta da raiz pode causar danos em regiões áridas onde geralmente é cultivada a cultura nos EUA (MAYÉK-PÉREZ et al., 2001a). Existem poucos trabalhos que demonstrem em números a importância da doença nos cultivos agrícolas brasileiros, porém, sabe-se que o fungo é encontrado infectando soja, feijão, milho, algodão, sorgo, girassol, entre outras culturas, podendo causar redução de produção das mesmas.

### **2.2.5 Fatores de predisposição**

Em geral, o fungo é favorecido em condições de ambiente com restrição hídrica, solos com baixos teores de argila, compactados e temperatura atmosférica acima de 28°C. Plantas mal nutridas, em estágio de floração e superadensadas tendem a serem predispostas ao fungo.

Correlação significativa entre o aumento de matéria orgânica do solo e decréscimo na colonização por *M. phaseolina* foi observada por Dhingra et al. (1976). O mesmo comportamento ocorreu para aumento populacional de microrganismos naturais do solo. *M. phaseolina* possui baixa colonização competitiva saprófita (CCS) para solos sob monocultivo de soja e milho. Isto implica diretamente num ambiente desfavorável ao desenvolvimento do fungo. Pratt (2006) observou que a incorporação de cama de aves ao solo resultou em aproximadamente 75% de decréscimo na sobrevivência de microescleródios em comparação com solos não corrigidos. Incrementos de 10% no conteúdo de cama de aves resultaram em mais 75% de decréscimo, que quase eliminou os microescleródios sobreviventes.

Solos com nível de umidade baixa tendem a favorecer o desenvolvimento de *M. phaseolina*, além disso, o potencial hídrico do solo implica na ecologia deste patógeno. Solos em condição de estresse hídrico tendem a desfavorecer a microflora natural, isto pode favorecer o crescimento do fungo em decorrência do decréscimo da atividade competitiva exercida pelos organismos antagonistas (SHOKES et al., 1977; SHORT et al., 1978; FRANCL et al., 1988).

Cultivares de soja que apresentam a floração durante períodos coincidentes com temperaturas atmosféricas e de solo altas e estresses hídricos tendem a ser mais suscetíveis a

infecção por *M. phaseolina* em comparação a cultivares com ciclo maior e que possuam período de floração conseqüentemente maior, apontam estudos de Pearson et al. (1984) em Kansas (EUA). Gangopadhyay et al. (1970) observaram que *M. phaseolina* apresentou maior incidência em sementes de soja produzidas sob climas tropicais em comparação a climas temperados. Canaday et al. (1986) cita que plantas de soja florescendo, sob alta densidade de semeadura, com ferimentos ou no estágio de enchimento de grãos têm maior suscetibilidade ao patógeno.

Há escassez de relatos sobre as condições predisponentes à infecção do patógeno em plantas de feijão e milho, todavia, de forma geral, parecem seguir as mesmas condições que para a cultura da soja.

### 2.2.6 Hospedeiros

Considerado um patógeno cosmopolita, *M. phaseolina* é capaz de infectar muitas espécies vegetais em uma ampla área geográfica (ABOSHOSHA et al., 2007). A gama de hospedeiros do fungo abrange 500 espécies em mais de 100 famílias (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Além de causar infecção em culturas com importância econômica como espécies anuais e perenes, *M. phaseolina* é relatada infectando também plantas daninhas.

Dentre as culturas de importância econômica, são hospedeiros do patógeno: leguminosas como soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.)), feijão caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e amendoim (*Arachis hypogea* (L.)); gramíneas como milho (*Zea mays* (L.)), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) e trigo (*Triticum aestivum* (L.)); além de outras culturas como algodão (*Gossypium hirsutum* (L.)), girassol (*Helianthus annuus* (L.)), pinus (*Pinus lambertiana* Dougl.) e gergelim (*Sesamum indicum* (L.)) (MEYER et al., 1973; PAPAVIDAS; KLAG, 1975; PEARSON et al., 1984; KUNWAR et al., 1986; BARNARD; GILLY, 1986; MAYÉK-PÉREZ et al., 2001a; ALMEIDA et al., 2003).

É possível que exista relação de especificidade entre isolados de *M. phaseolina* à hospedeiros (FRANCL et al. 1988). Então a redução na população dos microescleródios produzidos em um dado hospedeiro específico (tendência a possuir maior concentração de propágulos por grama de solo) pode resultar na diminuição da incidência da podridão cinzenta da raiz.

Sob condições de campo, Ndiaye et al. (2008), observaram que as culturas do milheto (*Pennisetum glaucum* (L.)) e do fonio (*Digitaria exilis* stapf) não foram infectadas, porém, o tecido radicular da cultura do milheto foi colonizado saprofiticamente pelo patógeno após a



maturação fisiológica da cultura. Todavia, os autores não mencionam se as plantas de milho estavam ou não mortas.

### 2.2.7 Sintomatologia

Em geral, os sintomas induzidos por *M. phaseolina* caracterizam-se por lesões negras e deprimidas, observadas principalmente nas hastes e raízes das plantas infectadas, com evolução para murcha, tombamento e morte precoce. Caso não ocorra a morte, as plantas infectadas irão apresentar aspecto de murcha, queda foliar e redução produtiva (SINGH et al., 1990).

Os sintomas em plântulas de feijoeiro caracterizam-se por lesões negras e irregulares na base dos cotilédones, estendendo-se até as hastes causando estrangulamento e morte. Também são observados *damping-off* e murcha em plantas jovens. Os sintomas em plantas adultas geralmente são de caráter secundário e correspondem à murcha e bloqueio do sistema vascular devido à produção de microescleródios. Podem ser observadas lesões necróticas longitudinais nas hastes, redução de vigor, desfolha precoce, morte da planta em condições severas, e por fim, redução na produtividade (MAYÉK-PÉREZ et al., 2001a; VITERI; LINARES, 2017). Redução no peso seco de hastes e raízes de plantas de feijão caupí infectadas com isolados de *M. phaseolina*, caracterizando a redução de biomassa como sintoma secundário do patógeno (Ndiaye et al., 2008).

Especificamente, na cultura da soja, a infecção das raízes ocorre ainda na fase de plântula, quando as raízes secundárias entram em contato com os microescleródios presentes no solo. A penetração do fungo ocorre pela rizoderme e a colonização continua até a raiz principal. Todavia, os sintomas secundários manifestam-se na fase reprodutiva da planta. Plantas infectadas no estágio V2 (primeiro trifólio completamente expandido) (GEPTS; FERNÁNDES, 1982) irão apresentar estatura e vigor menor que as sadias. O progresso da doença causa amarelecimento, murcha e queda dos folíolos, implicando em maturação desuniforme, incompleto enchimento de grãos e morte precoce das plantas. A formação de microescleródios ocorre nos tecidos infectados e pode ser observada tanto interna como externamente, continuando mesmo após a morte do hospedeiro até que os tecidos sequem. A partir daí, os microescleródios passam a ser liberados ao solo, dando continuidade ao ciclo do patógeno (PEARSON, et al., 1984; KUNWAR et al., 1986; BIGOTES et al., 2016; ISHIKAWA et al., 2018). Sementes de soja infectadas com *M. phaseolina* podem ou não apresentar manchas negras ou apenas manchas sem coloração definida no tegumento, sendo

que as condições ambientais que causam o aparecimento ou não dos sintomas não são ainda conhecidas (KUNWAR et al. (1986).

Todavia para a cultura do milho Pereira (2005), relata a ocorrência de *M. phaseolina* como secundária em colmo, de menor importância e não apresenta nenhuma informação sobre os sintomas causados pelo patógeno na cultura do milho.

### **2.2.8 Variabilidade genética**

A diferenciação do patógeno em raças pode ser baseada na redução de Clorato (análogo do nitrato) à Clorito, pela ação da enzima nitrato redutase (Cloud; Rupe, 1991a). Clorito restringe o crescimento micelial quando a enzima nitrato redutase é ativada. Crescimento não restringido é resultado da inatividade de uma ou mais dentre cinco enzimas envolvidas na via de ação da nitrato redutase. A separação de colônias do patógeno através deste contexto propicia designar compatibilidade entre grupos correlacionados a especialização de hospedeiros. Meios de cultura contendo clorato têm sido empregados para diferenciação de isolados com base no crescimento morfológico. Microescleródios livres no solo e isolados oriundos de soja geralmente apresentam crescimento restrito neste meio, justamente por possuírem rota metabólica ativa da nitrato redutase. Isolados provenientes de milho e sorgo, geralmente apresentam crescimento abundante neste meio, implicando na ausência ou inatividade da via metabólica da nitrato redutase. Essas informações correlacionam-se com a origem do hospedeiro da qual o isolado foi recuperado e podem ser usadas como marcadores para identificação de isolados específicos ao hospedeiro. Os resultados demonstraram que o número de raízes de soja que foram colonizadas quando apenas o isolado oriundo da soja foi inoculado no solo, foi significativamente maior em comparação ao número de raízes colonizadas quando tanto o isolado da soja, quanto o isolado do sorgo estavam presentes no solo, o mesmo comportamento foi observado quando unicamente o isolado do sorgo foi inoculado. Comportamento similar foi observado para a cultura do sorgo, quando o isolado proveniente da mesma espécie colonizou significativamente maior número de raízes que os dois isolados inoculados juntos, indicando especialização ou adaptação dos isolados a um hospedeiro.

Devido à diversidade de espécies hospedeiras e a amplitude geográfica de ocorrência de *M. phaseolina* sugere-se heterogeneidade do patógeno (MAYÉK-PÉREZ et al., 2001a). Em estudo avaliando a patogenicidade de *M. phaseolina* em cultivares de feijoeiro comum, os autores utilizaram cinco cultivares designadas como tolerantes: BAT477, TLP19, Negro 8025,

SEQ 12 e G19428, e sete como suscetíveis: Pinto UI-114, G4523, Río Tibagi, Pinto Villa, Azufrado Tapatio, Bayo Mecentral e Bayo Durango, com inoculação de 84 isolados de *M. phaseolina* oriundos de cultivos de feijoeiro comum, soja, milho e berinjela (*Solanum melangena*), entre outros. Neste experimento os autores avaliaram os sintomas da doença 30 dias após a semeadura (DAS) classificando os genótipos em resistentes ou suscetíveis e também determinaram a variabilidade dos isolados em nível molecular, segundo análise de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) ou polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado. Os genótipos TLP19, Negro 8025, BAT477, SEQ 12 e G19428 previamente designados como tolerantes foram suscetíveis a no máximo 30 isolados testados. Em contrapartida, os genótipos Bayo Durango, Pinto UI114, Pinto Villa, Bayo Mecentral, G4523, Río Tibagi e Azufrado Tapatio, previamente classificados como suscetíveis foram infectados por no mínimo 55 isolados, confirmando diferenças na patogenicidade dos isolados de *M. phaseolina*. Resultados mostram ainda que todos os isolados foram capazes de infectar as cultivares independentemente de sua origem. Para os três genótipos menos suscetíveis (TLP19, Negro 8025 e BAT477), majoritariamente as infecções foram causadas por isolados provenientes de feijoeiro comum (81, 70 e 70%, respectivamente), enquanto para as demais cultivares testadas, a taxa de infecção dos isolados provenientes desta cultura variou de 41 a 50%. Além disso, os fragmentos amplificados do DNA do patógeno resultaram em um único grupo dentre 84 isolados testados. Não foram observadas correlações dos isolados com a origem geográfica nem com o hospedeiro de origem. Os autores concluíram que o estudo de reação de genótipos é de extrema importância para prover estratégias de manejo da doença, ajudando programas de melhoramento a escolher possíveis genótipos resistentes. O trabalho destes autores foi de extrema importância por apontarem a necessidade do desenvolvimento de estudos relacionando genótipos de interesse com variações nas populações dos isolados (morfológicas, patogênicas e geográficas). A partir deste trabalho, muitos estudos envolvendo variabilidade genética do fungo foram conduzidos no mundo todo.

Ao estudar a diversidade genotípica entre isolados brasileiros de *M. phaseolina*, através da técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (*Random amplified polymorphic DNA - RAPD*), Almeida et al. (2003), avaliaram a variabilidade genética entre isolados provenientes de mesma raiz e de diferentes raízes de plantas de soja, coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil. Os resultados apresentaram separação dos 55 isolados utilizados em três grupos em um nível arbitrário de 70% de similaridade. Os autores consideraram isolados apresentando 100% de similaridade em haplótipos, nos três grupos, portanto, foram encontrados 2, 21 e 14 haplótipos, respectivamente nos grupos 1, 2 e 3. O

grupo 1 consistiu de apenas três isolados, com 99% similaridade. Dois dos três isolados deste grupo não apresentaram similaridade com isolados originários da mesma raiz, demonstrando que numa mesma raiz mais do que um haplótipo pode ocorrer. Semelhante, um isolado pertencente ao terceiro grupo, originário do estado do Mato Grosso do Sul, região centro-oeste brasileira, apresentou três isolados geneticamente diferentes em uma única raiz. Em um segundo estudo, avaliando a diversidade genética entre isolados de *M. phaseolina* provenientes de diferentes hospedeiros em diferentes áreas, permitiu a diferenciação dos isolados em seis grupos, apresentando similaridade de 55%. Dentre os resultados, um isolado oriundo de uma planta de girassol (*H. annuus*), da região centro-oeste do Brasil, foi apenas 56 e 46% similar a outros dois isolados oriundos da mesma cultura, porém da região sul do país, demonstrando que isolados provenientes do mesmo hospedeiro, porém de diferentes regiões são mais distantes em termos de similaridade genética que isolados provenientes de hospedeiros diferentes mas de mesma região. Os autores citam que apesar da reprodução sexual não ocorrer neste patógeno, grande variabilidade genética foi observada, podendo ser explicada pelo possível parasexualismo que pode ocorrer através da fusão das células de diferentes hifas, e que, portanto, irão formar células com mais de um núcleo geneticamente diferentes (heterocariose). O grau de similaridade encontrado entre os isolados utilizados neste trabalho apontam que estes devem ter evoluído de uma mesma população ancestral. A disseminação pode ter ocorrido através de sementes de soja infectadas, visto que, o cultivo desta cultura iniciou na região sul do país e foi conduzida até as demais regiões. Ao observar que todos os *clusters* que não apresentaram semelhança com isolados provenientes de plantas de soja, eram na verdade originários de áreas que nunca receberam o cultivo de soja, apontando que estes isolados possam ter maior semelhança com os isolados de populações ancestrais. Em conclusão, os autores sugerem que os isolados podem ter migrado entre regiões através de possíveis sementes infectadas ou transporte de solo infestado por microescleródios.

Em estudo semelhante, Jana et al. (2003) realizaram a caracterização molecular de diferentes isolados de *M. phaseolina* provenientes da América do Norte, Índia e outras partes do globo, detectando variação entre 43 isolados utilizando a técnica de RAPD. Os índices de similaridade gerados variaram entre 27 e 100%, neste contexto, cinco grupos de *clusters* foram formados, dentro destes, subgrupos também foram observados. De um total de 11 isolados compondo o subgrupo Ia, nove apresentaram 100% de similaridade, sendo oito deles provenientes dos EUA e um apenas, originário da Índia. Os autores apontam que a

variabilidade genética dos isolados está altamente associada a localização geográfica de origem e também à relação especificidade do hospedeiro.

Ao estudar as características fenotípicas e moleculares de sete isolados venezuelanos de *M. phaseolina* oriundos das culturas do gergelim (seis isolados) e do feijoeiro comum (um isolado), Martínez-Hilders & Laurentin (2012) constataram produção de microescleródios em diferentes taxas entre os isolados cultivados em meio de cultura PDA. Esta variação também foi observada para crescimento micelial. Esses dois parâmetros permitiram supor características de agressividade aos isolados testados. O isolado nomeado 2-2010 (obtido da cultura do gergelim) foi o que apresentou a maior taxa de crescimento micelial por tempo e também foi o que apresentou as maiores taxas de produção de microescleródios, sendo considerado o mais agressivo dentre os testados. Na caracterização molecular dos isolados realizada através de metodologia RAPD foi possível observar, com coeficiente de similaridade de 34%, a formação de dois grupos. O grupo 1 constituído por dois isolados e o grupo 2, por três. Os demais, não foram agrupados em nenhum dos grupos, demonstrando a variabilidade genética do patógeno. Esta variabilidade observada em uma área considerada pequena pelos autores, e ademais, de isolados provenientes da mesma cultura hospedeira, não era esperada. Os autores remetem os resultados a evolução individual e independente de cada isolado em cada localidade.

## 2.3 CICLO BIOLÓGICO DE *Macrophomina phaseolina*

### 2.3.1 Fontes de inóculo

Microescleródios são formados em tecido hospedeiro infectado e constituem a fonte de inóculo primária (SHORT et al., 1978; SHORT et al., 1980).

Solos naturalmente infestados também são fontes de inóculo. Embora estudos apontem variação na densidade de inóculo por grama de solo, dependente de condições de clima, tipo de solo, hospedeiro cultivado e temperatura de solo (PAPAVIZAS; KLAG, 1975). Baixa densidade de microescleródios no solo implica em decréscimo de podridão radicular em plantas de soja, o contrário também é válido (FRANCL et al., 1988; SINGH et al., 1990).

O patógeno também pode ser transmitido via sementes infectadas (KUNWAR et al., 1986).

### 2.3.2 Disseminação

O fungo pode ser disseminado via sementes infectadas (KUNWAR et al., 1986; SINGH et al., 1990), porém não há informações da taxa de transmissão e da importância epidemiológica desta fonte de inóculo.

A disseminação do fungo nas áreas infestadas ocorre pela movimentação de solo infestado pelo trânsito de máquinas e implementos agrícolas e pela água de escoamento de enxurradas (BIANCHI et al., 2005).

### 2.3.3 Infecção e colonização

Ao estudar a colonização de tecido vegetal de plantas de soja por *M. phaseolina*, Short et al. (1978), observaram que o fungo penetrou o tecido radicular das plantas (com idade variando entre 7 a 42 dias) 1 dia após a inoculação. Primeiramente, ocorreu penetração intercelular do micélio no córtex da planta. A morte completa do córtex de diferentes cultivares de soja testadas ocorreu três dias após a inoculação. Uma semana após a inoculação foi observado formação de microescleródios. A formação destas estruturas foi responsável pela ruptura das células dos vasos condutores de seiva do hospedeiro. Não foram observados microescleródios em tecidos verdes da haste, indicando que a presença destas estruturas está ligada a morte da célula hospedeira. O crescimento micelial foi contínuo ao crescimento radicular, indicando que a infecção de *M. phaseolina* não é localizada. A produção de microescleródios não foi abundante até o começo da senescência (queda foliar). Inicialmente, os microescleródios encontraram-se situados principalmente na periferia da raiz e posteriormente com a morte do tecido vegetal, ocorreu produção abundante por toda raiz. O micélio do fungo é capaz de penetrar e colonizar os tecidos radiculares das plantas ainda na fase de emergência, subsequentemente chegando ao tecido das hastes.

A colonização de raízes de soja por *M. phaseolina* sofreu incremento significativo após aplicação do herbicida 2,4 D nas plantas, em avaliações feitas seis e 10 semanas após a aplicação, por outro lado, a aplicação dos herbicidas glifosato, acifluorfen e bentazon não apresentaram efeito. O herbicida alachlor apresentou ser o único a reduzir este parâmetro (CANADAY et al., 1986). Este estudo se baseia no fato dos herbicidas causarem estresses bióticos à planta, e alguns chegam a induzir a formação de raízes secundárias na região superficial do solo (0-5 cm de profundidade), local com alta concentração de restos culturais e consequentemente presença de microescleródios de *M. phaseolina*.

#### 2.3.4. Sobrevivência

O fungo sobrevive na forma de microescleródios formados a partir dos tecidos vegetais infectados e que posteriormente são liberados no solo durante o processo de decomposição dos restos culturais (MEYER et al., 1973; PAPAVIDAS; KLAG, 1975; DHINGRA et al., 1976; SINGH et al., 1990; NDIAYE et al., 2008). Estudos apontam que quanto maior o grau de decomposição de um tecido vegetal presente no solo, maior será a concentração de microescleródios. O incremento na concentração de microescleródios no ambiente se deve ao cultivo sucessivo de espécies hospedeiras, cujos restos culturais permanecem no solo proporcionando constante produção e liberação ao longo do tempo. O patógeno foi capaz de infectar hastes de soja, autoclavadas e enterradas em solo naturalmente infestado, comprovando a sua habilidade saprofítica e também a sua capacidade de sobrevivência no ambiente sem a necessidade de um tecido hospedeiro vivo (DHINGRA et al., 1976; BARNARD; GILLY, 1986). Além dos microescleródios o patógeno pode sobreviver de forma saprofítica no solo, como relatado por Watanabe (1973), que ao avaliar a longevidade de microescleródios de *M. phaseolina* em solos naturalmente infestados, observou que apesar da concentração reduzir gradualmente ao passar dos anos, o fungo manteve-se viável quatro anos após o solo ter sido amostrado. Resultados indicam que a sobrevivência de *M. phaseolina* na natureza é diretamente influenciada pelo tipo de hospedeiro presente, da disponibilidade de alguns nutrientes, da estrutura durável conferida pelo microescleródio e da grande reserva endógena de nutrientes que este possui em relação a esporos (DUBEY et al., 2009).

Da mesma forma, Cook et al. (1973) observaram sobrevivência de microescleródios de *M. phaseolina* em restos culturais de milho e sorgo no solo por período de 16 a 18 meses.

A germinação de microescleródios segue padrões normais (>90%) em solos não esterilizados, mas corrigidos com nutrientes essenciais, todavia, a germinação foi suprimida em solos naturalmente infestados, indicando dependência nutricional para germinação dos microescleródios (AYANRU; GREEN, 1974). Foi avaliado ainda, o padrão de germinação de microescleródios em solos com adição de diferentes açúcares e foi constatada germinação padrão quando adicionados maltose e D-ribose ( $5 \times 10^{-2}$  M) em comparação com lactose (germinação <12%). Esses resultados são de extrema importância no direcionamento de estudos que qualifiquem a produção de exsudatos radiculares que possam inibir a germinação padrão dos microescleródios.

O número de microescleródios germinados em solo produzidos a partir de crescimento fúngico em placas com meio PDA (Caldo de batata, dextrose e ágar) reduziu de 842 para 80 microescleródios por grama de solo, em um espaço de tempo de 10 meses (SHORT et al., 1980). Em contraste, a população de escleródios germinados a partir de solo contendo restos culturais de soja, aumentou de 1270 para 2360 microescleródios por grama de solo avaliado. Essa comparação implica diretamente na capacidade de produção constante de microescleródios nos restos culturais de tecido vegetal hospedeiro, e também da redução da viabilidade destes quando sozinhos no solo sem a presença do tecido vegetal. Os trabalhos apontam também sazonalidade entre picos de emergência de microescleródios. A habilidade de sobreviver no solo em condições de campo demonstrou ser maior quando os escleródios foram obtidos de restos culturais de tecidos de soja infectados em comparação a microescleródios produzidos a partir de colônias cultivadas em placa de Petri.

Ao estudar a longevidade de *M. phaseolina* em restos culturais de soja no solo, Baird et al. (2003) observaram que a frequência do patógeno apresentou comportamento linear decrescente em relação à profundidade que os restos culturais se localizavam, o mesmo foi observado em relação ao tempo de permanência dos restos culturais no solo. Estes resultados podem ter sofrido interação com outros microrganismos encontrados no solo. A presença de *Trichoderma* spp. pode ter afetado a densidade de microescleródios do patógeno. Os autores apontam ainda que os microescleródios constituem uma importante fonte de inóculo e que continuarão germinando e infectando novos cultivos hospedeiros ao longo das estações de cultivo.

Em sementes de soja, o patógeno é capaz de sobreviver por 2 a 3 anos (SINGH; SINGH, 1982).

Ao submeter amostras de sementes de soja com e sem sintomas de infecção por *M. phaseolina*, colhidas a partir de plantas sintomáticas, foram observadas produção de colônias do fungo em meio PDA com taxa de 4% para as sementes assintomáticas e de 100% para as sintomáticas. Sementes assintomáticas infectadas com o patógeno apresentaram microescleródios imaturos e translúcidos entre o tegumento e o endosperma das sementes, dois dias após a inoculação. Ao terceiro dia, os microescleródios aumentaram em número e tamanho, passando a apresentar coloração negra. Ao quinto dia, as sementes encontraram-se cobertas por microescleródios e mortas. Após a semente ser fragmentada, observou-se a presença de hifas esparsas intercelularmente na camada de células abaixo da epiderme. Não foram observados danos ao tecido celular. As sementes colonizadas por *M. phaseolina* ao serem seccionadas apresentaram hifas inter e intracelularmente e presença de



microescleródios nas três camadas do tegumento (epiderme, hipoderme e endoderme). Microescleródios foram observados também no endosperma destas sementes, além disso, as células endospermáticas próximas foram colapsadas e desintegradas. Não foram observados microescleródios na abertura do hilo. Apenas em duas sementes foram observados microescleródios nos cotilédones, porém, comumente observaram-se hifas colonizando a região cotiledonar. Ao quarto e quinto dia, hifas e microescleródios foram observados na região da radícula. Ao seccionar sementes sintomáticas foram observadas hifas e microescleródios presentes na maioria das vezes dentro do tegumento. As hifas encontravam-se inter e intracelularmente em todas as camadas do tegumento e também no embrião. Em alguns casos, o embrião apresentou-se quebrado e desintegrado e muitos microescleródios puderam ser vistos abaixo da camada paliçádica. As camadas da hipoderme, endoderme e do endosperma não puderam ser distinguidas devido à quantidade de hifas e microescleródios presentes. Estes se demonstraram abundantes na região da abertura do hilo, cujo parênquima paliçádico encontrou-se desintegrado. Hifas maduras foram observadas facilmente no exterior e no interior dos tecidos do tegumento. Microescleródios eram abundantemente observados nos tecidos dos cotilédones e também da radícula. Em geral o feixe vascular presente nos cotilédones foi colonizado por hifas e as células infectadas apresentavam-se desprovidas de conteúdo celular (KUNWAR et al., 1986).

## 2.4 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE *Macrophomina phaseolina*

### 2.4.1 Rotação de culturas

A amplitude da gama de hospedeiros de *M. phaseolina* torna difícil o controle do patógeno pela rotação de culturas (ALMEIDA et al., 2008). Apesar disso, muitos pesquisadores desenvolveram projetos que contribuíram muito com o entendimento da relação patógeno-hospedeiro.

Maiores concentrações de microescleródios no solo foram observadas quando a soja e o milho foram cultivadas em monocultura por períodos de seis anos em relação à monocultivos de alfafa e trigo (MEYER et al., 1973).

O uso contínuo de milho e soja resulta na persistência de microescleródios no solo, uma vez que de acordo com Cook et al. (1973) a sobrevivência de microescleródios de *M. phaseolina* nos restos culturais destas culturas alcançam até 18 meses.

Ao avaliar a influência da rotação de culturas sobre a densidade populacional de *M. phaseolina* em solo, Francl et al. (1988) observaram que o nível populacional do patógeno foi influenciado pela rotação de culturas. Altas densidades do fungo geralmente foram observadas quando a cultura da soja aparecia no esquema de rotação, independentemente se era rotacionada com milho, algodão ou sorgo granífero. O número de unidades formadoras de colônias (ufc) formadas sob monocultura de soja foi o maior dentre os sistemas de rotação e ou sucessão. Solos cultivados por períodos de 2 a 3 anos com milho, algodão e sorgo granífero demonstraram as menores contagens de ufc. Em todos os tratamentos a densidade de inóculo após o cultivo com soja foi aumentada. A densidade de inóculo foi maior quando se alternou o cultivo entre soja e milho em comparação com a uso do algodão e sorgo granífero.

Na mesma linha de pesquisa, Singh et al. (1990) observaram que a população de microescleródios no solo foi maior no final dos cultivos do que no momento de semeadura. Comparado com monocultura, a rotação de culturas entre sorgo ou feijão caupí (*V. unguiculata*) com guandú (*Cajanus cajan*) apresentou maiores níveis de inóculo no solo. A maior densidade do patógeno (38 microescleródios por grama de solo) foi recuperada quando se cultivou sorgo em rotação com guandú. A população do fungo geralmente foi reduzida quando o campo foi mantido em pousio. Os autores apontam que o cultivo com espécies não hospedeiras como o arroz (*Oryza sativa*) pode ser uma ferramenta para diminuição do nível de inóculo na área. De acordo com Cloud & Rupe (1991b) menor concentração de microescleródios foram produzidos em meios de cultura a partir de solos cultivados com arroz.

Ao estudar o efeito do plantio direto sobre a densidade de *M. phaseolina* no solo sob cultivo de soja, Wrather & Kending (1998) observaram que tanto em sistema de plantio direto quanto em plantio convencional a maior densidade populacional do patógeno foi observada entre as profundidades de 0-7,5 cm, em relação à camada de 7,5-15 cm; e que houve correlação positiva entre matéria orgânica e densidade populacional na camada de 0-7,5 cm de profundidade. Estes resultados indicam que a permanência dos restos culturais de hospedeiros infectados no solo é uma forma de manutenção de inóculo e que a concentração do patógeno fica relacionada diretamente ao local de decomposição dos resíduos culturais.

Ao comparar o efeito de nove isolados do patógeno provenientes de raízes de soja, milho, algodão e girassol a partir de solos cultivados e não cultivados (nativos), Almeida et al. (2008) demonstraram que todos os isolados causaram doença em milho e soja. Todavia,

isolados de girassol demonstraram sempre os menores níveis de produção de microescleródios em relação aos isolados de milho e soja.

A redução da densidade de microescleródios de *M. phaseolina* no solo reduziu, durante três anos de cultivo quando as culturas do milheto (*P. glaucum*) e do fonio (*D. exilis*) foram cultivadas, sendo a maior redução observada em solos cultivados com fonio.

#### **2.4.2 Resistência genética**

Ao avaliar a colonização do patógeno em cultivares de soja dos EUA, apesar de não encontrarem cultivares resistentes, Pearson et al. (1984) observaram que as cultivares comerciais Bay, Forrest e Sprite possuem restrição à colonização por *M. phaseolina*, por fatores não esclarecidos. Wrather & Kending (1998) em concordância apontam a não existência de cultivares de soja resistentes à *M. phaseolina*. Por outro lado, Coser et al. (2017), avaliaram 463 acessos de soja para resistência à *M. phaseolina*, sendo 51 acessos com doença avaliada pela área abaixo do progresso de doença cujos valores de intensidade podem ser considerados como resistentes se avaliados por escala de notas de 1 a 5, onde 1 é resistente. De qualquer forma, no Brasil, por exemplo, não há indicação de cultivares de soja resistentes a podridão cinzenta (ALMEIDA et al., 2008).

Segundo Al-Ahmadi et al. (2018), desenvolver um método de triagem para resistência para podridão de macrofomina ainda na fase de plântula traria vantagens tanto temporal quanto monetária, além de poder ser indicada para um número consideravelmente grande de cultivares (população).

Para as culturas do milho e feijão, há restrição de informações sobre a resistência genética ao patógeno.

#### **2.4.3 Controle químico**

O controle químico de *M. phaseolina* a partir de aplicações de fungicidas ao solo foi muito indicado nas décadas de 70 e 80. Eram utilizados métodos de fumigação diretamente no solo com produtos a base de brometo de metila. Ainda, aplicação de produtos com os ingredientes ativos benomyl (Benlate) e captan (Captana) também eram utilizados como forma de controle (BARNARD; GILLY, 1986). Porém, não são mais utilizados sendo proibidos pelo MAPA.

O controle químico apresenta-se na maioria das vezes economicamente inviável devido ao patógeno ser associado tanto a semente quanto ao solo (SINGH et al., 1990). Tonin et al. (2013) relatam a ausência de fungicidas registrados no Brasil para controle de *M. phaseolina* em soja. Todavia, ressaltam a importância do estudo da eficiência de moléculas no tratamento de sementes de soja visando melhorias no controle do patógeno, uma vez que este pode ser transmitido via sementes infectadas. Com base na concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) do crescimento micelial de colônias do fungo os ingredientes ativos carbendazim e penflufen + trifloxystrobin (em fase de testes) demonstraram maior nível fungitóxico.

#### **2.4.4 Medidas alternativas de controle**

Medidas alternativas têm sido estudadas visando o controle de *M. phaseolina*.

A irrigação frequentemente é ineficiente quando as condições ambientais são favoráveis para o desenvolvimento do patógeno (PEARSON et al., 1984). Ao contrário, propõem Barnard & Gilly (1986) e também Mayék-Pérez et al. (2001a), quando apontam a irrigação como estratégia de manejo da doença, e completam que as regas devem ser realizadas coincidindo com os períodos de clima quente e seco e objetivando-se: i) prevenir estresses hídricos; ii) reduzir temperaturas do solo; e, iii) promover a atividade da microfauna e flora natural do solo.

Outras práticas culturais como evitar alta densidade de plantas e a fertilização do solo são estratégias promissoras para minimizar os danos causados pelo patógeno (FRANCL et al., 1988).

Extratos vegetais têm sido explorados com efeitos promissores em condições *in vitro*. Concentrações de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), utilizando o extrato apenas filtrado tem inibido o desenvolvimento do micélio e a germinação microescleródios dois e quatro dias após tratamento com óleo (DUBEY et al., 2009).

### 3 CAPÍTULO 1 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Macrophomina phaseolina* NO ESTABELECIMENTO DE PLANTAS JOVENS DE FEIJÃO, MILHO E SOJA

#### 3.1 RESUMO

A podridão de carvão ou “*charcoal rot*” causada pelo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* é uma das principais doenças que afeta o sistema radicular das culturas da soja, milho e feijão. O manejo genético é a principal medida de controle recomendada. O uso de metodologias de inoculação eficientes é de suma importância para estudos de resistência de cultivares. Pensando nisso, objetivou-se avaliar a influência de métodos de inoculação de *M. phaseolina* no desempenho de cultivares de soja e feijão, e híbridos de milho, bem como avaliar o grau de agressividade de isolados do patógeno em infecções cruzadas nas culturas. O experimento foi conduzido sob condições de casa de vegetação, em esquema fatorial com delineamento inteiramente casualizado, contendo três métodos de inoculação (método de inoculação de suspensão de hifas incorporado ao solo (M1), método de inoculação com disco micelial (M2) e método de inoculação misto (M3)), três culturas (soja, milho e feijão), três cultivares de soja (BMX Ativa, BMX Lança e BMX Turbo), três híbridos de milho (Fórmula Viptera, P1630H e Status Viptera3), três cultivares de feijão (BRS Esteio, IPR Tangará e IPR Uirapurú) e três isolados de *M. phaseolina* (MEMR31, MEMR57 e MEMR89) com 12 repetições. As avaliações foram realizadas aos 15 dias após a emergência das plantas, aferindo-se a emergência de plantas (E), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST). Na cultura do feijoeiro comum, as plantas inoculadas sob método M3 apresentaram emergência de 64%, contrastando significativamente com os métodos M1 e M2, responsáveis respectivamente pela emergência de 89,5 e 96% das plantas inoculadas. A cultivar BRS Estilo, quando inoculada com *M. phaseolina* foi a que mais sofreu redução de MSPA (51,3%), MSR (54,5%) e MST (52,5%), em comparação as demais cultivares. Os isolados foram responsáveis pela redução média de 37,8% de MSPA, 36,4% de MSR, 37,3% de MST, de plantas de feijoeiro comum em relação a testemunha sem inóculo. Para a cultura do milho, os métodos M1 e M2 não diferindo entre si, propiciaram os maiores índices de redução de MSPA, MSR e MST em relação ao M3. O híbrido P1630H demonstrou maior suscetibilidade ao fungo em relação aos demais híbridos, reduzindo em 45,1% a MSPA e 39,6% a MST de plantas inoculadas com *M. phaseolina*. Os isolados apresentaram diferença no grau de agressividade apenas para o fator MSR, quando o MEMR31 foi o mais agressivo, juntamente com o MEMR57 que não diferiu também do isolado MEMR89 (o menos agressivo). Para a cultura da soja, a metodologia de inoculação M3 é mais eficaz em propiciar a infecção de *M. phaseolina*, reduzindo a emergência e a produção de massa seca de plantas de soja, esta por sua vez, foi afetada com maior intensidade pelos isolados MEMR31 e MEMR57. A cultivar BMX Turbo apresentou maior suscetibilidade ao patógeno, dentre as três cultivares, sofrendo redução de E em 57,3%, de MSPA em 42,3%, de MSR em 61,1% e de MST em 53,8%. Concluiu-se que: i) O método de inoculação misto (M3) foi o mais eficaz em propiciar a infecção de *M. phaseolina*, nas culturas do feijoeiro comum e da soja; ii) Para inoculação de *M. phaseolina* na cultura do milho podem ser empregados os métodos de disco micelial e de suspensão de hifas e microescleródios em preferência ao método misto; iii) Nas culturas do feijoeiro comum, milho e soja, existem graus de suscetibilidade divergentes entre cultivares/híbridos, em relação à inoculação de *M. phaseolina*; iv) Nas culturas da soja e do milho o isolado MEMR31 demonstrou maior agressividade aos parâmetros de emergência e

massa seca das plantas inoculadas; v) Os isolados MEMR31, MEMR57 e MEMR89 reduziram a massa seca das plantas de feijoeiro comum com mesmo grau de agressividade.

**Palavras-chave:** *Macrophomina phaseolina*; métodos de inoculação; isolados; genótipos.

### 3.2 INTRODUÇÃO

A safra 2017/2018, mesmo sofrendo redução de 3,4% em relação à anterior, será a segunda maior da história brasileira, indicando um volume de 229,5 milhões de t. A soja, o milho e o feijão devem ter produção de 114,9, 88,6 e 3,3 milhões de t, respectivamente. Estas três culturas em conjunto representam 90,1% da produção total de grãos brasileira (CONAB, 2018; SEAB, 2018).

Apesar do valor expressivo da produção desta safra, a média de produtividade nacional das culturas citadas ainda é considerada baixa (soja: 3.276 kg ha<sup>-1</sup>; milho: 5.336 kg ha<sup>-1</sup>; feijão 1.041 kg ha<sup>-1</sup>) em relação a padrões internacionais (CONAB, 2018). Há necessidade de incrementar a fertilidade do solo, aumentar área com irrigação e investir em qualidade de semente.

No Brasil, o milho é a principal cultura utilizada em rotação e/ou sucessão com a soja, uma prática cultural muito empregada principalmente nos estados do centro-oeste, onde a oleaginosa é cultivada em primeira safra e o cereal é cultivado em sucessão. O feijão entra no sistema como uma cultura sucessora ao milho em áreas com possibilidade de irrigação.

Assegurar a produção dessas três culturas é difícil, em razão da magnitude das variáveis que interferem na produtividade, considerando-se nível de fertilidade de solo, variabilidade genética das cultivares, época e os sistemas de cultivos, e ocorrência de pragas, doenças e plantas daninhas (VALLE et al., 1997; PINTO et al., 1997). Dentre as várias causas relacionadas à redução da produtividade, as doenças são um dos principais fatores (YORINORI, 1997; HALL et al., 1991).

O milho é uma cultura sujeita a danos causados por fungos patogênicos, como principais grupos de doenças na cultura podemos destacar: podridões do colmo, podridões de espiga e doenças foliares. Há uma relação entre a intensidade destas doenças e o sistema de cultivo. A monocultura de milho, em safra ou safrinha, no sistema de plantio direto proporciona a permanência dos restos culturais infectados e/ou infestados por patógenos sob a superfície do solo, atuando como local de sobrevivência e fonte de inóculo dos fungos (CASA et al., 2011). Para a soja, aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil, isto é agravado pela expansão da cultura

para novas áreas, pela monocultura e pela introdução de novos patógenos (ALMEIDA et al., 2005). No cultivo do feijoeiro as principais doenças são causadas por fungos e sua ocorrência é generalizada em todas as regiões produtoras brasileiras (VALLE et al., 1997; BIANCHI et al., 2005; CAMPOS et al., 2015).

Uma das principais doenças, responsável por infectar simultaneamente o sistema radicular das plantas de soja, milho e feijão é a podridão cinzenta da raiz ou “*charcoal rot*” causada pelo fungo *M. phaseolina*. (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ALMEIDA et al., 2014).

A podridão cinzenta tem sido detectada em todo o território nacional. Em soja, são mencionadas reduções que variam de 5 a 50% no rendimento, dado esse, altamente dependente das condições de infecção e também do grau de suscetibilidade do genótipo (YANG; NAVI, 2005, ISHIKAWA et al., 2018). Plantas de feijoeiro comum inoculadas artificialmente com *M. phaseolina* apresentaram redução de 60% em comparação com plantas cultivadas em solos naturalmente infestados pelo fungo (MAYÉK-PÉREZ et al., 2003), demonstrando que a inoculação artificial é mais eficiente que a natural em gerar a infecção nas plantas. Na cultura do milho, relatos são escassos, pois os sintomas da doença são visíveis no final do ciclo (próximo à colheita), passando despercebidos pelo agricultor e pessoas envolvidas com a assistência técnica.

O fungo *M. phaseolina* é habitante natural do solo com ampla gama de hospedeiros, infectando mais de 75 famílias de plantas distintas e acima de 500 espécies em todo mundo, incluindo legumes, vegetais e frutas, podendo infectar muitas espécies de interesse econômico como, milho, sorgo, feijão, soja, amendoim e algodão (VIANA; SOUZA, 2002; ALMEIDA et al., 2008; SALEH et al., 2010; RAYATANAH; DALILI, 2012; CLAUDINO; SOARES, 2014). O patógeno pode afetar plantas em qualquer estágio de crescimento, e os primeiros sintomas aparecem como lesões negras nas raízes e hastes, seguidas da morte de plântulas em decorrência do bloqueio dos vasos do xilema. No tecido infectado, o patógeno causa lesões de coloração negra/acinzentada, com produção de micélio e microescleródios. Os microescleródios atuam como principal fonte de inóculo do patógeno, além disso, sobrevivem de forma livre no solo e nos restos culturais de plantas infectadas. O fungo é disseminado via sementes infectadas (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; SURINDER et al., 2013; ASHRAF et al., 2015).

A infecção de raízes de soja por *M. phaseolina* pode ocorrer desde o início da germinação (semente), visto que o patógeno pode ser disseminado via semente infectada e é um habitante natural do solo (ALMEIDA et al., 2005). Este sistema de infecção também é relatado para feijão (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

*M. phaseolina* é um patógeno considerado cosmopolita, infectando muitas espécies vegetais em uma ampla área geográfica, conferindo grande variabilidade morfológica e patogênica entre isolados de diferentes partes do mundo (ABOSHOSHA et al., 2007). Segundo Saleh et al. (2010), ao contrário de outros fungos patogênicos que preferem condições de clima úmido, o fungo *M. phaseolina* pode ser mais problemático em áreas onde o clima resulta em secas prolongadas e altas temperaturas (30 – 35 °C), e relatam ainda que este torna-se mais agressivo durante o verão e sob temperaturas de solo entre 27 e 35 °C. Além disso, alta densidade de cultivo, plantas injuriadas, florescendo ou produzindo sementes e áreas de monocultura, também são agravantes à doença. Infecções primárias podem permanecer latentes até a ocorrência de um estresse ambiental como os acima relatados (CLAUDINO; SOARES, 2014; REIS et al., 2014).

Para o controle do fungo a rotação com culturas não susceptíveis seria uma prática viável para reduzir a quantidade de inóculo na área, porém, a ampla gama de hospedeiros pode ser uma forma de manutenção do patógeno (ALMEIDA et al., 2008). Almeida et al. (2005), confirmam que devido a ação polífaga do fungo a rotação de culturas é uma medida duvidosa de controle, porém, a cobertura do solo com restos de culturas e bom manejo físico e químico do solo, mostrou eficiência por reduzir o estresse hídrico, diminuindo a predisposição da planta a infecção por *M. phaseolina*.

O controle genético pelo uso de cultivar resistente é a estratégia de manejo mais prática e aceitável para *M. phaseolina* (MAYÉK-PÉREZ et al., 2003; CRUCIOL; COSTA, 2018; ISHIKAWA et al., 2018). Reis et al. (2014), relatam a não existência de cultivares de soja resistentes e que as demais técnicas de controle tem baixa eficiência.

Muitos estudos para desenvolvimento de materiais resistentes a podridão negra são conduzidos a campo, em áreas com histórico de ocorrência da doença ou em solos com infestação artificial. Todavia, no campo, vários fatores inerentes a doença podem ocorrer e, além disso, a ocorrência de *M. phaseolina* isoladamente no campo é rara, tornando-se difícil a obtenção de dados confiáveis de avaliação. Em casa de vegetação torna-se possível a condução de ensaios prévios para qualificar cultivares com potencial de resistência de forma rápida e confiável (CRUCIOL; COSTA, 2018).

A escolha da metodologia de inoculação a ser seguida no trabalho é de suma importância. Metodologias naturais simulam a forma de infecção que ocorre naturalmente a campo. Em metodologias artificiais o patógeno é inoculado através de ferimentos na planta. Ishikawa et al. (2018), testaram quatro métodos de inoculação de *M. phaseolina* em plantas de soja, considerando o método do disco de micélio sobre a haste cortada o mais eficiente para



seleção de genótipos de soja resistentes. Cruciol e Costa (2018), ao testar cinco metodologias de inoculação do patógeno também em soja, concluíram que todos os métodos testados foram eficientes em causar a doença nas plantas, no entanto, o método de inoculação diretamente na semente por 48 e 72 horas desenvolveu sintomas precoces. Para as culturas do feijão e do milho os trabalhos nesta área são escassos.

Desta forma, há necessidade de desenvolvimento e adaptação de metodologias específicas para inoculação de *M. phaseolina* em espécies vegetais de interesse, que possibilitem de forma precisa a quantificação da suscetibilidade de genótipos ao patógeno e sua relação com os danos às plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar três métodos de inoculação e a agressividade de isolados do fungo *M. phaseolina* em função da emergência e massa seca de cultivares de soja e feijão e híbridos de milho.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia (LF) e casa de vegetação da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages-SC.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, contendo três métodos de inoculação [método de inoculação de suspensão de hifas incorporado ao solo (M1), método de inoculação com disco micelial (M2) e método de inoculação misto (M3)], três culturas (soja, milho e feijão), três cultivares de soja (BMX Ativa, BMX Lança e BMX Turbo), três híbridos de milho (Fórmula Viptera, P1630H e Status Viptera3), três cultivares de feijão (BRS Esteio, IPR Tangará e IPR Uirapurú) e três isolados de *M. phaseolina* com 12 repetições.

Os isolados utilizados foram obtidos a partir de raízes com sintomas de podridão cinzenta da raiz da cultivar de feijão BRSMG Madrepérola do município de Lucas do Rio Verde/MT (MEMR31), da cultivar BMX Lança de soja do município de Passo Fundo/RS (MEMR57) e do híbrido de milho P1630H do município de Nova Mutum/MT (MEMR89) (Tabela 1). Os isolados estão mantidos na “Micoteca Erlei Melo Reis” (MEMR) do CAV/UDESC. O inóculo de cada isolado foi multiplicado em meio de cultura BSA (Batata, sacarose e Ágar) e incubado a 28°C por um período de sete dias em incubadoras do tipo BOD sob fotoperíodo de 12 horas para completo crescimento micelial.

Tabela 1 – Identificação dos isolados de *Macrophomina phaseolina* utilizados nos ensaios Lages, SC, 2018.

Identificação do isolado	Município/Estado	Latitude	Longitude	Altitude	Cultura de origem
MEMR31	Lucas do Rio Verde/MT	13°03'01" S	55°54'40" W	390 m	Feijão Comum
MEMR57	Passo Fundo/RS	28°15'46" S	52°24'24" W	687 m	Soja
MEMR89	Nova Mutum/MT	13°49'44" S	56°04'56" W	460 m	Milho

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Para confirmação de que o fungo isolado das raízes sintomáticas das culturas previamente citadas, e posteriormente utilizado no estudo era mesmo pertencente a espécie *M. phaseolina* o isolado MEMR31 foi submetido a caracterização morfológica através da avaliação das características de colônias puras do patógeno e também à técnica molecular PCR (*Polimerase chain reaction*), pela seguinte metodologia: o isolado foi previamente cultivado em placas de Petri contendo meio BSA (Batata, sacarose e ágar) por 10 dias a 28°C +/- 2°C, com 12h de fotoperíodo. Foram coletados 200mg do micélio fúngico, provenientes de aproximadamente cinco colônias, em cadinhos esterilizados. Com auxílio de uma espátula, o micélio foi raspado cuidadosamente, evitando-se a coleta de meio de cultura. O conteúdo do cadinho foi macerado utilizando nitrogênio líquido e posteriormente foi transferido para microtubos de 1,5ml. Para extração do DNA foi utilizado o kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

A reação de PCR foi realizada para um volume final de 25 µl. Na reação foram adicionados 5µl de Buffer 5x (Promega), 2µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM, Promega), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,225µl de enzima Go Taq DNA Polimerase (5 u/µL, Promega), 5µl do DNA extraído e 0,5µl de cada um dos iniciadores (10µM), o restante do volume da reação foi completado com água livre de RNase (11,275µl). Utilizou-se para esta reação um par de iniciadores universais para a espécie *M. phaseolina*, sendo estes ITS 4Mph (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS 1Mph (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') (ALMEIDA et al., 2003). Após a completa mistura dos componentes da PCR estes foram colocados em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems®), programado para realizar desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, sendo cada um dos ciclos composto pela de desnaturação das duplas fitas de DNA a 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 minuto e extensão do fragmento a 72°C por 2 minutos. Após os 35 ciclos realizados foi realizada a extensão final do fragmento a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese com gel de agarose a 1%. Para cada amostra foi adicionado 5µl do produto da PCR, 1µl de GelRed (Biotium), e 1µl de azul de bromofenol, sendo estes dois últimos corantes utilizados para permitir a

visualização da corrida dos fragmentos e dos fragmentos amplificados em luz ultravioleta, respectivamente. A reação se deu em cubas de eletroforese preenchidas com solução TBE 0,5X, a 100V e 100mA.

Os métodos de inoculação testados foram:

Disco micelial (Método 1: M1): Placas de Petri contendo o inóculo multiplicado em meio de cultura BDA por 10 dias foram acomodadas entre duas camadas de substrato (o disco de micélio ficou situado à quatro centímetros de profundidade e à dois centímetros abaixo da semente). A proporção utilizada foi de um disco de micélio de 90 milímetros de diâmetro para cada copo de 400 ml contendo substrato. Na testemunha (substrato sem inóculo) discos de BDA isentos do patógeno foram acomodados entre as camadas de substrato, substituindo o inóculo do fungo.

Suspensão de hifas e microescleródios incorporadas ao solo (Método 2: M2): Colônias do fungo foram multiplicadas em placas de Petri por 7 dias a temperatura de 28°C +/- 2°C, sob fotoperíodo de 12 horas. O disco micelial, contendo micélio e microescleródios do fungo foram trituradas em liquidificador na proporção de dez placas para 500 ml de água esterilizada contendo uma gota de Tween 80 para uniformização. Com auxílio de borrifador manual a suspensão foi aspergida e incorporada ao substrato sendo revolvida manualmente até atingir uniformidade. O substrato permaneceu em repouso em recipientes de plástico, acomodado no interior de casa de vegetação, durante sete dias para colonização do patógeno. A testemunha (substrato sem inóculo) recebeu apenas adição de água esterilizada.

Sistema misto M1 + M2 (Método 3: M3): Os dois procedimentos descritos acima foram realizados conjuntamente neste método.

Realizou-se a semeadura (após a inoculação respectiva para cada tratamento) em copos plásticos de 400 ml, na profundidade de dois centímetros. Cada tratamento consistiu de 36 sementes distribuídas em 12 repetições, sendo três sementes por unidade experimental (copo). Os copos foram mantidos em casa de vegetação a temperatura de 25 °C +/- 2°C até o momento da avaliação.

As avaliações foram realizadas aos 15 dias após semeaduras (DAS), quando as plantas foram arrancadas cuidadosamente, lavadas (com objetivo de eliminar o substrato remanescente nas raízes), separadas (com auxílio de um bisturi) em parte aérea e sistema radicular, acondicionadas em sacos de papel, secas em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 60°C (até estabilidade de peso) e pesadas. Os parâmetros avaliados foram: emergência de plântulas (E) expressa em porcentagem; massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST= MSPA+MSR) expressa em g.plântula<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>. Na cultura do feijoeiro, foi avaliada a área foliar (AF) expressa em  $\text{cm}^2 \cdot \text{planta}^{-1}$ , aos 15 DAS, com auxílio de equipamento eletrônico integrador de área foliar modelo LI-3100C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de TUKEY a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR. Os dados de emergência de plântulas foram transformados pela equação:  $\text{Arcsen} \left( \sqrt{\frac{x}{100}} \right)$ , para obtenção do parâmetro normalidade.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

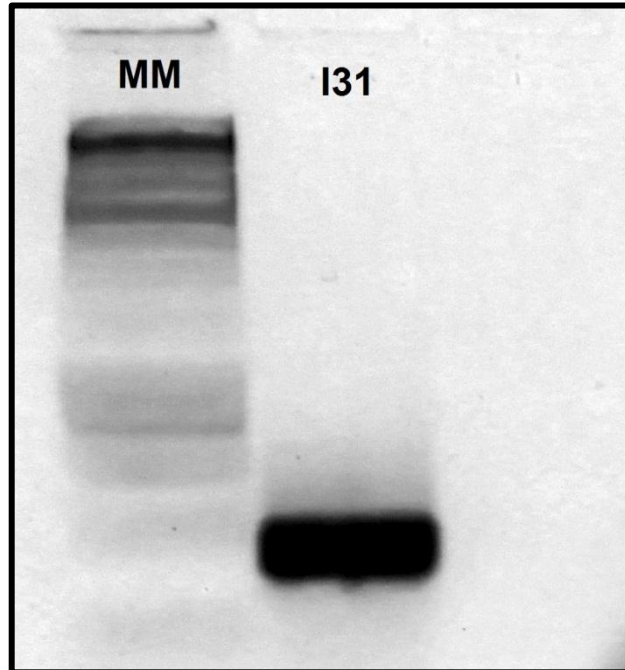
#### 3.4.1 Caracterização molecular do isolado

A qualidade e quantidade do DNA extraído foram analisadas em *nanodrop*. A concentração de DNA amostral foi de 195,7  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . A relação 260/280 que mede a concentração de ácidos nucleicos em relação às proteínas contaminantes da amostra foi de 1,77 apresentando-se dentro dos parâmetros aceitáveis de qualidade (1,6 a 2,0) (SAMBROOK; RUSSEL, 2002), enquanto que a relação 260/230 que relaciona a concentração de ácidos nucleicos e os componentes contaminantes da preparação permaneceram em 0,86 sendo considerados aceitáveis valores acima de 0,8 desta forma, a amostra apresentou ambos os parâmetros aceitáveis de qualidade para realização da PCR.

Observou-se na figura 4 que houve amplificação do fragmento corresponde ao tamanho esperado de 620 pares de base para os primers utilizados, comprovando a espécie fúngica utilizada no estudo como *M. phaseolina*.

Após uma hora de corrida a amostra foi visualizada sob luz UV em transluminador, sendo fotografada e editada (Figura 4).

Figura 4 – Eletroforese em gel agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de *Macrophomina phaseolina*, utilizando oligonucleotídeos específicos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

MM: Marcador molecular 1kb (Promega); I31: Isolado MEMR31 de *M. phaseolina*.

A seguir serão demonstrados os resultados dos métodos de inoculação para cada cultura estudada.

### 3.4.2 Feijoeiro comum

Os dados de análise de variância para as avaliações de emergência de plantas (E), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST) e área foliar (AF) do feijoeiro constam na tabela 2.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados em função de métodos de inoculação, origem de isolados de *Macrophomina phaseolina* e cultivares de feijoeiro comum. UDESC, Lages/SC, 2018.

FV	E <sup>1</sup>	MSPA <sup>2</sup>	MSR <sup>3</sup>	MST <sup>4</sup>	AF <sup>5</sup>
Método (M)	10,76*	41,26*	0,74 <sup>NS</sup>	20,83*	17,38*
Isolado (I)	0,36 <sup>NS</sup>	2,57 <sup>NS</sup>	0,42 <sup>NS</sup>	0,72 <sup>NS</sup>	2,84 <sup>NS</sup>
Cultivar (C)	8,93*	27,11*	34,28*	32,33*	6,80*
M x I	1,95 <sup>NS</sup>	0,67 <sup>NS</sup>	8,85*	1,86 <sup>NS</sup>	0,30 <sup>NS</sup>
M x C	3,13*	12,04*	4,61*	9,43*	1,02 <sup>NS</sup>
I x C	1,18 <sup>NS</sup>	1,29 <sup>NS</sup>	4,43	2,33 <sup>NS</sup>	3,26*
M x I x C	2,22*	1,05 <sup>NS</sup>	2,48*	1,45 <sup>NS</sup>	0,99 <sup>NS</sup>
C.V. (%)	19,66	42,49	41,26	39,93	21,22

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Emergência de plantas; <sup>2</sup>Massa seca de parte aérea; <sup>3</sup>Massa seca radicular; <sup>4</sup>Massa seca total; <sup>5</sup>Área foliar; \*Significativo a 5% de probabilidade de erro; <sup>NS</sup> não significativo.

A análise estatística dos fatores de variação revelou significância para o fator método de inoculação (M) nas variáveis MSPA, MST, E e AF. A variável MSR não foi influenciada pelos métodos de inoculação.

De modo geral, o M3 foi o método mais eficiente para redução dos componentes da variação estudados, o M2 apresentou-se como intermediário e o M1 como o método tênue. Porém, ao contrário do exposto, a análise do fator MSPA demonstrou que o M2 foi o método responsável pela maior redução de massa seca da parte aérea das plantas infectadas, diferindo-se estatisticamente do M3 e M1. Estes, por sua vez, também diferiram entre si, novamente o M1 sendo o menos eficiente. Além disso, para o fator MST os métodos M2 e M3 não diferem estatisticamente entre si, produzindo massa seca total de 0,32 e 0,35 g.planta<sup>-1</sup> respectivamente, a diferença ocorre somente em comparação com o M1 responsável pela produção de 0,45 g.planta<sup>-1</sup>. Para E e AF o M3 comprovou sua eficiência e diferiu-se dos demais métodos (Tabela 3).

Todos os métodos de inoculação testados resultaram no desenvolvimento da doença nas plantas de feijão. Programas de identificação de genótipos resistentes a *M. phaseolina* conduzidos em casa de vegetação têm seu foco direcionado aos estágios vegetativos iniciais da cultura, principalmente em sementes e plântulas (VITERI; LINARES, 2017), desta forma, as metodologias aplicadas no presente trabalho comprovam ser úteis para programas de seleções de genótipos.

A MSPA foi influenciada significativamente pelos diferentes métodos de inoculação. O M2 foi responsável pelos menores pesos secos de parte aérea de plantas de feijão inoculadas com o fungo *M. phaseolina*. Plantas inoculadas com o método M2 produziram 40% menos do que plantas inoculadas com o M1. Esta eficiência na redução de massa seca não foi observada para o fator MST, onde plantas inoculadas com o M3 não diferindo do M2, reduziram em 20% o peso total em comparação às plantas inoculadas com o M1 (Tabela 3).

A baixa eficácia do M1 sobre a MSPA pode ser explicada pelo curto período de colonização do substrato pelo fungo, pois a semeadura ocorreu logo após o posicionamento do disco micelial no copo plástico a quatro centímetros de profundidade. Dessa forma não houve tempo suficiente para o fungo completar a colonização do substrato e posteriormente infectar os tecidos hospedeiros. De maneira similar, Silva et al. (2016), não observaram diferenças estatísticas entre a produção de MSPA de plantas de feijão inoculadas sob o método do disco de micélio e a testemunha sem inóculo.

A influência dos métodos de inoculação também foi expressa sobre a emergência das plantas de feijão. As sementes semeadas sob o M3 apresentaram menores valores de

emergência em comparação aos demais métodos. Em média apenas 64,0% das sementes deste tratamento emergiram, enquanto nos tratamentos M1 e M2, não diferindo entre si, apresentaram emergência de 89,5 e 96%, respectivamente. Da mesma forma, Silva et al. (2016), ao comparar três métodos de inoculação de *M. phaseolina* em sementes de feijão, observaram redução da emergência de plantas em avaliação realizada 10 DAE no método de contato com restrição hídrica. Os autores afirmam ainda que métodos de inoculação nos quais a semente entra em contato direto com o patógeno reduzem o poder germinativo das mesmas.

O fator de variação métodos de inoculação foi significativo para a AF, demonstrando diferença estatística entre os métodos utilizados (Tabela 3). Observou-se que o método M3 foi responsável pelos menores índices de área foliar das plantas de feijão inoculadas. Em valores médios a redução foi de 3,6 e 6,0 cm<sup>2</sup>.planta<sup>-1</sup> para o M1 e M2 respectivamente.

Tabela 3 – Emergência de plantas (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), e área foliar (AF) de plantas de feijoeiro comum submetidas a isolados de *Macrophomina phaseolina* utilizando distintos métodos de inoculação, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método de inoculação	E (%)	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	MST (g.planta <sup>-1</sup> )	AF (cm <sup>2</sup> .planta <sup>-1</sup> )
M1	89,5A	0,30A	0,45A	23,4A
M2	96,0A	0,18C	0,32B	25,8A
M3	64,0B	0,22B	0,35B	19,8B

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A análise estatística de variância para o fator isolado (I) não demonstrou diferença significativa entre os parâmetros avaliados. Contudo, as variáveis MSPA, MSR, MST e AF apresentaram diferença estatística quando comparadas à testemunha sem a presença do inóculo. Diferente deste contexto, a emergência de plantas não diferiu estatisticamente da testemunha, assim, os isolados testados no experimento não influenciaram significativamente a emergência de plantas de feijoeiro (Tabela 4). Todavia, a mesma relação não ocorreu para Sarkar & Mandal (2015), quando observaram diferença no grau de agressividade de isolados originários de Jute (*Corchorus olerius*), na emergência de plantas da mesma espécie.

Apesar de não haver diferença estatística entre os isolados testados, existe diferença percentual nos valores dos parâmetros avaliados em relação às testemunhas. A MSPA foi influenciada pela inoculação do fungo *M. phaseolina* e sofreu redução de 0,14 g.planta<sup>-1</sup> ou 37,8% em comparação a plantas não inoculadas. O mesmo ocorreu para: MSR reduzindo em 0,08 g.planta<sup>-1</sup> ou 36,4%, MST reduzindo em 0,22 g.planta<sup>-1</sup> ou 37,3% e AF reduzindo em

34,7 cm<sup>2</sup>.planta<sup>-1</sup> ou 60,2% (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados por Ndiaye et al. (2008) quando inocularam isolados provenientes de solo e plantas de feijão caupí infectados por *M. phaseolina* em plantas de feijão caupí, relatando que plantas infectadas apresentaram redução na biomassa de hastes e das raízes quando comparadas com plantas saudas. A redução percentual observada pelos autores para a biomassa de hastes e de raízes foi de, respectivamente, 60,7% e 40,6%.

Todos os isolados foram efetivos ao causar a infecção nas plantas, diferindo-se estatisticamente da testemunha e causando redução dos parâmetros avaliados. No entanto, não foi constatado grau de agressividade entre isolados em relação aos fatores avaliados. Viteri e Linares (2017), ao inocular plantas de feijoeiro comum com dois isolados de *M. phaseolina*, PRI16 e PRJD16, obtidos respectivamente, da folha cotiledonar e da haste de plantas de feijão infectadas com o fungo, observaram maior agressividade do isolado PRI16 em relação ao PRJD16.

Tabela 4 – Emergência de plantas (E), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST), e área foliar (AF) de plantas de feijoeiro comum em função da origem de isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Isolado	E (%)	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )	MST (g.planta <sup>-1</sup> )	AF (cm <sup>2</sup> .planta <sup>-1</sup> )
MEMR31	80,2A	0,23B	0,14B	0,37B	24,4B
MEMR57	81,6A	0,22B	0,14B	0,36B	22,1B
MEMR89	86,2A	0,25B	0,13B	0,39B	22,5B
Média <sup>1</sup>	82,7	0,23	0,14	0,37	23,0
Testemunha	88,6A	0,37A	0,22A	0,59A	57,7A
Redução <sup>2</sup> (%)	6,6	37,8	36,4	37,3	60,2

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Média geral dos três isolados.; <sup>2</sup>Redução: 100-[(Média<sup>1</sup>/Testemunha)\*100]; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A análise estatística demonstrou diferença significativa em todos os parâmetros testados para o fator cultivares de feijoeiro comum (Tabela 5).

Foi observado grau de suscetibilidade ao fungo *M. phaseolina* entre as cultivares de feijoeiro testadas. A cultivar BRS Estilo demonstrou ser a mais suscetível ao patógeno. Salvas as diferenças intrínsecas cabíveis a cada genótipo, esta cultivar foi a que menos emergiu (65,8%) e a que menos produziu MSPA (0,19 g.planta<sup>-1</sup>), MSR (0,12 g.raiz<sup>-1</sup>) e conseqüentemente MST (0,31 g.planta<sup>-1</sup>). Em dados percentuais, foi a que mais sofreu redução de todos os componentes avaliados, com exceção da AF quando a cultivar IPR Tangará apresentou valores semelhantes, 22,0 e 21,8 cm<sup>2</sup>.planta<sup>-1</sup>, respectivamente. Para



MSPA a cultivar produziu 51,3% a menos que a respectiva testemunha, da mesma forma, 54,5% a menos MSR e, por consequência, 52,5% a menos MST. A E e a AF também foram afetadas em 23,1% e 60,1%, respectivamente. Por outro lado, a cultivar IPR Tangará apresentou menor suscetibilidade à infecção de *M. phaseolina*. Os valores de redução de MSPA, MSR, MST e AF foram de, respectivamente: 13,8%, 25,0%, 18,0% e 63,4%. Esta cultivar não apresentou diferença significativa em relação ao fator E quando comparada com a testemunha sem inóculo. A cultivar IPR Uirapurú apresentou valores intermediários, porém significativos. A redução de MSPA, MSR, MST e AF nesta cultivar foi de, respectivamente: 40,0%, 30,4%, 36,7% e 60,3% (Tabela 5).

Apesar de não existirem trabalhos publicados na literatura a respeito da reação das cultivares, testadas neste experimento, ao fungo *M. phaseolina*, a diferença na suscetibilidade das cultivares de feijão à infecção de isolados aqui descrita também foi observada por Viteri & Linares (2017), quando não encontraram genótipos resistentes à *M. phaseolina* e classificaram os genótipos: A 195, Badillo e PC 50 (Andinos) e 92BG-7 e I9365-31 (meio americanos) como intermediários no grau de suscetibilidade.

Tabela 5 - Emergência de plantas (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST), e área foliar (AF) de cultivares de feijoeiro comum, submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*. UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
E (%)	IPR Uirapurú	95,4Aa	95,1Aa	-0,3
	BRS Estilo	65,8Ba	85,6Aa	23,1
	IPR Tangará	88,0Aa	85,4Aa	-3,0
	Média	83,1	88,7	6,3
MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	IPR Uirapurú	0,27Ab	0,45Aa	40,0
	BRS Estilo	0,18Bb	0,37Ba	51,3
	IPR Tangará	0,25Aa	0,29Ca	13,8
	Média	0,23	0,37	37,8
MSR (g.planta <sup>-1</sup> )	IPR Uirapurú	0,16Ab	0,23Aa	30,4
	BRS Estilo	0,10Bb	0,22Aa	54,5
	IPR Tangará	0,15Ab	0,20Aa	25,0
	Média	0,14	0,22	36,4
MST (g.raiz <sup>-1</sup> )	IPR Uirapurú	0,43Ab	0,68Aa	36,8
	BRS Estilo	0,28Bb	0,59ABa	52,5
	IPR Tangará	0,41Ab	0,50Ba	18,0
	Média	0,37	0,59	37,3
AF (cm <sup>2</sup> .planta <sup>-1</sup> )	IPR Uirapurú	25,2Ab	63,4Aa	60,3
	BRS Estilo	22,0Bb	50,2Ba	56,2
	IPR Tangará	21,8Bb	59,6Aa	63,4
	Média	23,0	57,7	60,1

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução:  $100 - [(Média^1 / Testemunha) * 100]$ ; Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O parâmetro analisado AF apresentou interação dupla entre os fatores: isolado (I) e cultivares (C). Os dados do desdobramento da interação mencionada estão dispostos na tabela 6.

A interação dupla envolvendo o parâmetro AF e cultivares pode ser explicada pela diferença na produção de área foliar própria de cada genótipo, uma vez que o potencial de crescimento e desenvolvimento inicial é característica própria de cada cultivar. Esta interação ainda possibilita aferir a existência de um grau de agressividade dos isolados ou ainda de suscetibilidade da cultivar ao patógeno. Observou-se que o isolado MEMR31 apresentou maior agressividade quando inoculado na cultivar IPR Tangará, reduzindo a AF desta em 64,5%. O MEMR57 apresentou maior redução de AF quando inoculado na cultivar IPR Uirapurú (62,7%) e o MEMR89 foi responsável pela redução de 63,8% para as cultivares IPR Uirapurú e IPR Tangará (Tabela 6).

Tabela 6 - Desdobramento da análise de variância para área foliar de plantas de feijoeiro comum em função da origem dos isolados de *Macrophomina phaseolina* e cultivares. UDESC, Lages/SC, 2018.

Isolado	Cultivares		
	IPR Uirapurú	BRS Estilo	IPR Tangará
MEMR31	28,95Ba	23,06Bab	21,11Bb
MEMR57	23,62Ba	19,89Ba	22,69Ba
MEMR89	22,93Ba	23,05Ba	21,53Ba
Média <sup>1</sup>	25,2	22,0	22,1
Testemunha	63,38Aa	50,21Ab	59,57Aa
Redução <sup>2</sup>	60,3	56,2	62,9

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Média geral dos três isolados; <sup>2</sup>Redução:  $100 - [(Média^1 / Testemunha) * 100]$ ; Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As variáveis MSPA e MST apresentaram interação dupla entre os fatores método (M) e cultivar (C), os dados do desdobramento encontram-se expostos na tabela 7.

A produção de MSPA foi afetada de forma distinta, entre as cultivares testadas, pelos métodos de inoculação. Na cultivar IPR Uirapurú o M2 proporcionou maior redução de MSPA em relação aos demais métodos, o mesmo ocorreu com a cultivar IPR Tangará. Por outro lado, não há diferença significativa entre métodos na cultivar BRS Estilo, que diferiu estatisticamente das demais cultivares nos métodos M1 e M3 (Tabela 7).

A MST das plantas de feijoeiro foi afetada de forma similar à MSPA, porém, para a cultivar IPR Uirapurú os métodos M2 e M3 não diferiram estatisticamente entre si, e proporcionaram as maiores reduções de MST (Tabela 7).

Tabela 7 - Desdobramento da análise de variância para massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST) médias, em função de métodos de inoculação e cultivares de feijoeiro comum, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivar	Métodos de inoculação		
		M1	M2	M3
MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	IPR Uirapurú	0,40Aa	0,18Ac	0,25Ab
	BRS Estilo	0,19Ca	0,19Aa	0,16Ba
	IPR Tangará	0,32Ba	0,18Ac	0,26Ab
MST (g.planta <sup>-1</sup> )	IPR Uirapurú	0,58Aa	0,33Ab	0,39Ab
	BRS Estilo	0,28Ca	0,31Aa	0,25Ba
	IPR Tangará	0,48Ba	0,32Ab	0,42Aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As variáveis MSR e E testadas na cultura do feijoeiro apresentaram interação tripla entre os fatores método (M), isolado (I) e cultivar (C). Seguindo a discussão da interação de maior grau, os dados do desdobramento da interação tripla encontram-se nas tabelas 8 e 9.

As médias de produção de MSR das cultivares de feijoeiro oscilaram entre 0,04 e 0,19 g.raiz<sup>-1</sup>. A MSR não foi afetada na cultivar IPR Uirapurú quando esta foi inoculada com o MEMR31 independente do método utilizado. Por outro lado, quando foi inoculada com o MEMR89 sob o M2 apresentou 0,09 g.planta<sup>-1</sup> (menores valores de MSR observados para esta cultivar). A cultivar BRS Estilo apresentou os menores valores de MSR quando inoculada com os isolados MEMR31 e MEMR57 sob o M3, não diferindo entre si. A cultivar IPR Tangará não sofreu influência dos métodos de inoculação e isolados, exceto quando inoculada com o MEMR89 diferiu-se dos demais isolados inoculados sob o M3 (Tabela 8).

Tabela 8 - Desdobramento da interação tripla do fator massa seca radicular média de plantas de feijoeiro comum, em função de métodos de inoculação e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

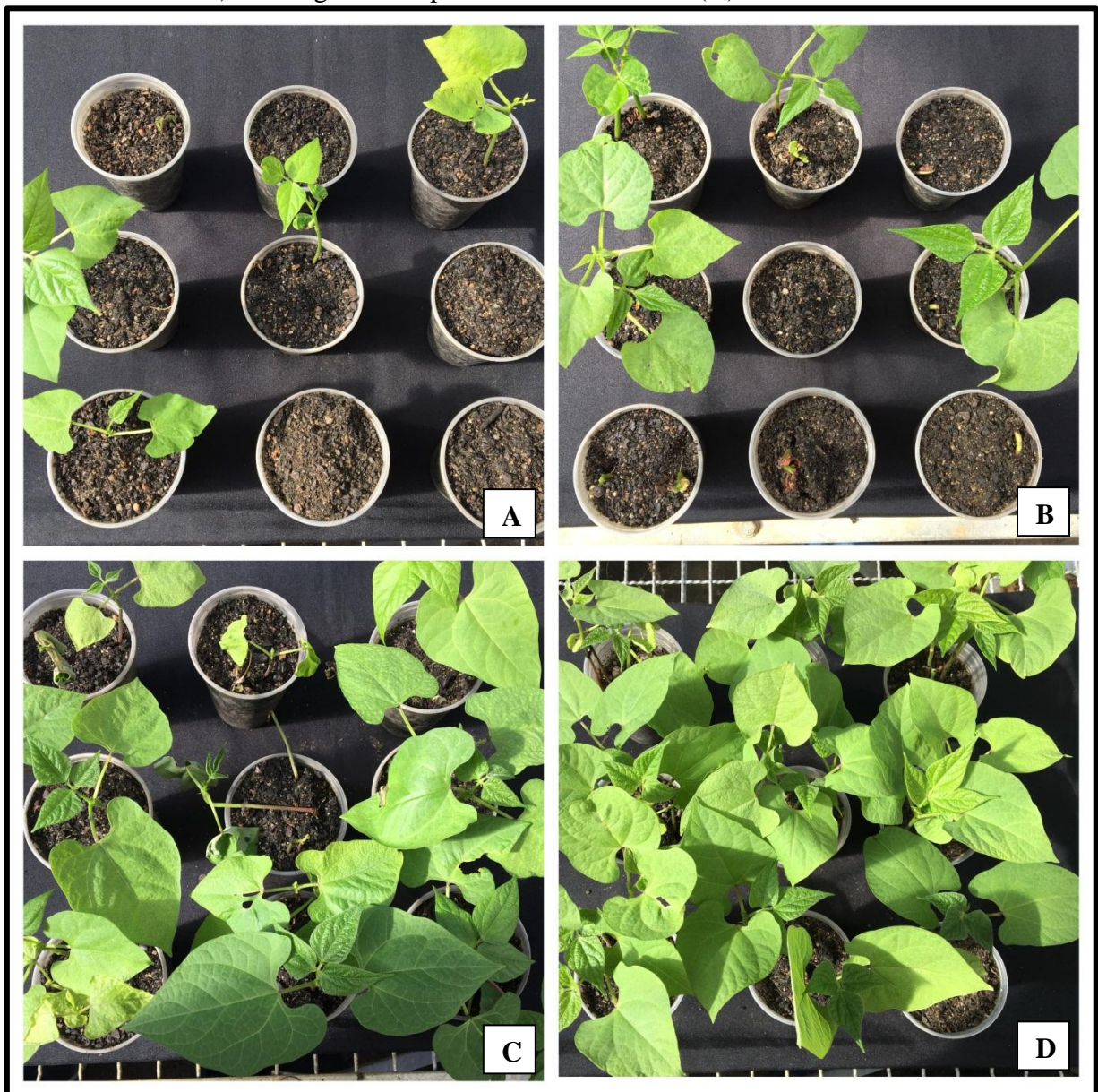
Método/Isolado	IPR Uirapurú		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,18Aa	0,18ABa	0,19Aa
M2	0,17Aa	0,19Aa	0,09Bb
M3	0,13Aa	0,14Ba	0,16Aa
Método/Isolado	BRS Estilo		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,09ABa	0,09ABa	0,09Ba
M2	0,13Aa	0,13Aa	0,10Ba
M3	0,04Bb	0,07Bb	0,17Aa
Método/Isolado	IPR Tangará		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,17Aa	0,14Aa	0,16Aa
M2	0,16Aa	0,15Aa	0,11Aa
M3	0,20Aa	0,16Aab	0,14Ab

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A E das plantas de feijoeiro foi afetada pela interação tripla entre os fatores analisados. Esta interação é resultado dos baixos valores de emergência das plantas da cultivar BRS Estilo quando inoculadas com o MEMR31 (11,1%) e o MEMR57 (31,3%) sob o M3 (Figura 5).

Figura 5 – Plantas de feijoeiro comum, cultivar BRS Estilo, apresentando emergência desuniforme devido à inoculação de isolados de *Macrophomina phaseolina* (A, B e C) e emergência de plantas não inoculadas (D).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

A: Isolado MEMR31; B: Isolado MEMR57; C: Isolado MEMR89; D: Testemunha não inoculada. Fonte:

Para as demais cultivares não houve diferença estatística entre os métodos e isolados (Tabela 9). Em ensaios de suscetibilidade de cultivares a patógenos não são eficientes metodologias destrutivas, ou que causem a total morte total de plantas. Pensando nisso, o ajuste da concentração de inóculo ideal deve ser estudado para garantir a manutenção de plantas visando o estudo comportamental da doença.

Tabela 9 - Desdobramento da interação tripla do fator emergência média de plantas de feijão, em função de métodos de inoculação e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método/Isolado	IPR Uirapurú		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	100,0Aa	100,0Aa	100,0Aa
M2	100,0Aa	91,1Aa	100,0Aa
M3	85,9Aa	91,1Aa	91,4Aa
Método/Isolado	BRS Estilo		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	100,0Aa	57,0ABa	57,0Aa
M2	100,0Aa	91,1Aa	100,0Aa
M3	11,1Bb	31,3Bb	85,9Aa
Método/Isolado	IPR Tangará		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	100,0Aa	100,0Aa	100,0Aa
M2	91,1Aa	100,0Aa	91,1Aa
M3	69,0Aa	88,9Aa	57,8Aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Observou-se que, para o feijoeiro, todos os métodos de inoculação de *M. phaseolina* testados foram eficazes, porém destacou-se o método M3, com maior potencial destrutivo, principalmente para a emergência de plantas. Considerando-se avaliar genótipos de feijoeiro comum exclusivamente em relação à capacidade de emergência na presença do fungo, o M3 é indicado. Todavia, em experimentos objetivando-se analisar o efeito do patógeno em componentes da planta, o M2 e o M1, são indicados pela eficácia dos métodos sem ocasionar a deterioração de sementes e morte precoce de plântulas, o que inviabilizaria o trabalho. Em relação ao fator cultivar, o comportamento dos genótipos IPR Uirapurú e IPR Tangará foi em geral semelhante, demonstrando suscetibilidade ao patógeno em menor grau em comparação com a cultivar BRS Estilo aos isolados de *M. phaseolina*. Não foram observadas diferenças em relação à agressividade dos isolados em relação aos parâmetros testados, todavia estes diferiram da testemunha sem inóculo, comprovando a infecção por *M. phaseolina*.

### 3.4.3 Milho

Os dados de análise de variância para as avaliações de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST) e emergência (E) de plantas de milho encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 – Resumo da análise de variância para os parâmetros analisados na cultura do milho em função de métodos de inoculação, origem de isolados de *Macrophomina phaseolina* e híbridos. UDESC, Lages/SC, 2018.

FV	E <sup>1</sup>	MSPA <sup>2</sup>	MSR <sup>3</sup>	MST <sup>4</sup>
Método (M)	2,27 <sup>NS</sup>	90,83*	124,42*	108,04*
Isolado (I)	0,08 <sup>NS</sup>	0,49 <sup>NS</sup>	13,38*	2,29 <sup>NS</sup>
Híbrido (H)	3,78 <sup>NS</sup>	11,83*	27,61*	22,60*
M x I	1,70 <sup>NS</sup>	18,47*	6,50*	10,08*
M x H	0,25 <sup>NS</sup>	1,43 <sup>NS</sup>	5,75*	3,25*
I x H	0,82 <sup>NS</sup>	1,91 <sup>NS</sup>	5,80*	2,89*
M x I x H	1,34 <sup>NS</sup>	0,69 <sup>NS</sup>	5,54*	2,29*
C.V.	12,40	34,94	31,12	30,11

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Emergência de plantas; <sup>2</sup>Massa seca de parte aérea; <sup>3</sup>Massa seca radicular; <sup>4</sup>Massa seca total; \*Significativo a 5% de probabilidade de erro; <sup>NS</sup>não significativo.

A análise de variância demonstrou significância sobre o fator de variação método de inoculação (M) para MSPA, MSR e consequentemente MST. Desta forma, observou-se diferença entre os métodos testados também para a cultura do milho, bem como visto na cultura do feijão. Todavia, a emergência de plantas, independente dos fatores de variação envolvidos, não foi afetada pela inoculação com o patógeno.

Ao estudar a resistência do Fonio (*D. exilis*) e do milheto (*P. glaucum*) à isolados de *M. phaseolina*, obtidos a partir de solo e de tecido de plantas de feijão caupi (*V. unguiculata*) infectados, Ndiaye et al. (2008), não observaram redução na emergência de plantas destas culturas em relação à plantas não inoculadas. No presente estudo também não foram observados efeitos negativos da inoculação independentemente da origem dos isolados de *M. phaseolina* em híbridos de milho. Sugere-se, portanto, relação de especificidade entre isolados e hospedeiros do patógeno. De forma geral, a emergência de gramíneas parece não ser afetada por *M. phaseolina*.

Para a cultura do milho, ao contrário do observado para a cultura do feijoeiro comum, o M3 demonstrou ser o método menos efetivo dentre os testados. A provável explicação para esse fato é a demora no tempo para colonização do substrato pelo patógeno, propiciando maior tempo para crescimento vegetal até que o fungo possa infectar a planta. Outra hipótese seria baixa suscetibilidade da cultura do milho ao acréscimo no potencial de inóculo ocasionado pela adição dos métodos.

A MSPA de plantas de milho foi afetada pelos distintos métodos. O M1 e M2 não diferiram estatisticamente entre si, e foram responsáveis pelos menores valores observados de MSPA. Diferente do ocorrido com a cultura do feijão, o M3 foi o método menos eficiente na redução de massa seca para a cultura do milho. Em média, o M3 produziu 0,11 g.planta<sup>-1</sup> ou

40,7% a mais que plantas inoculadas com o M1 ou M2. O método M2 proporcionou maior redução de MSR. Em geral, plantas inoculadas com o M2 produziram metade da massa seca radicular produzida por plantas inoculadas com o M1 ou M3. Observou-se então que a adição do disco micelial ao método M3 não foi efetiva para este parâmetro. O comportamento apresentado pela variável MST foi semelhante ao apresentado pela MSPA, demonstrando a inexistência de diferença estatística entre os métodos M1 e M2, considerados, neste caso, com maior eficiência em causar infecção pelo patógeno em comparação ao M3 (Tabela 11).

Agressividade de isolados de *M. phaseolina* foi observada por Khan et al. (2017), quando inocularam o patógeno sob método do palito em cultivares de grão-de-bico. As plantas inoculadas apresentaram redução no comprimento radicular de 44 - 49% e no peso fresco de 55 - 63%, todavia, o peso seco de plantas infectadas foi 26 - 38% maior que plantas saudáveis. Da mesma forma os autores avaliaram o comportamento dos isolados na cultura do girassol, observando redução de 41 - 52% de massa fresca de plantas inoculadas com o patógeno em comparação com seu controle.

Tabela 11 - Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de plantas de milho submetidas a isolados do fungo *Macrophomina phaseolina* em distintos métodos de inoculação, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método de inoculação	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )	MST (g.planta <sup>-1</sup> )
M1	0,17B	0,21A	0,37B
M2	0,15B	0,11B	0,32B
M3	0,27A	0,22A	0,45A

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A inoculação de *M. phaseolina* foi responsável pela redução significativa de MSR das plantas de milho infectadas, todavia a MSPA e a MST não foram afetadas. De maneira semelhante, Ndiaye et al. (2008) não observaram redução significativa da massa seca radicular e total de plantas de fonio e de milho inoculadas com isolados de *M. phaseolina* oriundos de solo e de plantas de feijão caupí infectados. Estes resultados em conjunto demonstram variação no grau de resistência de plantas da família Poaceae em relação ao patógeno. Os dados contendo a MSR das plantas de milho inoculadas com *M. phaseolina* sob diferentes isolados encontram-se na tabela 12.

Observou-se que todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha, comprovando a eficiência destes em gerar infecção nas plantas de milho, independentemente de sua origem. O mesmo foi observado por Khan et al. (2017), quando constataram a infecção de *M. phaseolina* ao inocular grão-de-bico e girassol com isolados provenientes das culturas



do gergelim, algodão e feijão caupí. E também por Sarkar & Mandal (2015), quando inocularam quatro isolados de *M. phaseolina* em plantas de Juta (*Corchorus olitorius*), originários de diferentes regiões produtoras da Índia e observaram que o isolado proveniente de Nagaon foi o mais agressivo para os fatores avaliados.

Dentre os três isolados, o MEMR31 e o MEMR57 apresentaram maior redução da MSR das plantas testadas, não diferindo entre si. Todavia, o MEMR57 também não diferiu do MEMR89, sendo considerado de aspecto intermediário quanto ao grau de agressividade para este parâmetro. Em termos percentuais a redução de MSR causada pelos isolados em relação à testemunha foi de 36% para o MEMR31, 28% para o MEMR57 e 20% para o MEMR89 (Tabela 12). De forma similar, Khan et al. (2017), relataram a redução do crescimento radicular de plantas de grão-de-bico e girassol infectadas com *M. phaseolina*, porém sem grau de agressividade entre isolados.

Tabela 12 – Massa seca radicular (MSR) de plantas de milho em função da origem de isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Isolado	MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )
MEMR31	0,16C
MEMR57	0,18BC
MEMR89	0,20B
Média <sup>1</sup>	0,18
Testemunha	0,25A
Redução <sup>2</sup> (%)	28,0

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Média geral dos três isolados; <sup>2</sup>Redução:  $100 - [(Média^1 / Testemunha) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Foram observadas diferenças significativas para MSPA, MSR e, conseqüentemente, MST, entre os híbridos de milho. Todos os genótipos sofreram redução, em diferentes graus, de massa seca das plantas em comparação com as testemunhas sem inóculo, comprovando a eficiência dos métodos de inoculação de *M. phaseolina* para a cultura do milho.

De modo geral, foi observado, grau de suscetibilidade dos híbridos de milho à inoculação de *M. phaseolina*. Neste caso, observou-se que o híbrido Status Viptera3 foi o que menos sofreu redução de MSPA, MSR e MST. O híbrido Fórmula Viptera sofreu, dentre os três, a maior redução de MSR, 33% em relação à testemunha sem inóculo, e o híbrido P1630H sofreu a maior redução de MSPA, 45,1% e de MST, 39,6% também em relação à testemunha sem inóculo (Tabela 13).

Tabela 13 - Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de híbridos de milho submetidos, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*. UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Híbridos	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
<b>MSPA</b> (g.planta <sup>-1</sup> )	Fórmula Viptera	0,21Ab	0,35Aa	40,0
	P1630H	0,17Bb	0,31Aa	45,1
	Status Viptera3	0,22Ab	0,31Aa	29,0
	Média	0,20	0,32	37,5
<b>MSR</b> (g.raiz <sup>-1</sup> )	Fórmula Viptera	0,18Bb	0,27Aa	33,3
	P1630H	0,15Cb	0,22Ba	31,8
	Status Viptera3	0,20Ab	0,26Aa	23,0
	Média	0,18	0,25	28,0
<b>MST</b> (g.planta <sup>-1</sup> )	Fórmula Viptera	0,39Ab	0,62Aa	37,0
	P1630H	0,32Bb	0,53Ba	39,6
	Status Viptera3	0,42Ab	0,57ABa	26,3
	Média	0,38	0,57	33,3

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução:  $100 - [(Média^1 / Testemunha) * 100]$ ; Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Observou-se interação dupla entre os fatores método (M) e isolado (I) para a variável analisada MSPA. Os dados do desdobramento encontram-se na tabela 14.

De modo geral foi observado comportamento similar para os três isolados de *M. phaseolina* utilizados, os quais diferiram estatisticamente dentre os métodos testados apenas para o M3. No M1 e no M2 os isolados apresentaram comportamento semelhante, não diferindo estatisticamente entre métodos. Todavia, dentro de cada método observaram-se diferenças significativas entre os isolados testados. No M1 o isolado MEMR89, não diferiu estatisticamente do MEMR31, porém, proporcionou os menores valores de MSPA dentro deste método. De forma similar, no M2 o MEMR89 apresentou diferença estatística dos isolados testados e também foi responsável pela maior redução de MSPA do método. Já no M3 o inverso foi observado, e o M3 diferindo dos demais foi o que menos influenciou a MSPA das plantas de milho (Tabela 14).

Em relação à severidade de *M. phaseolina* em acessos de meloeiro, Medeiros et al. (2015) verificaram diferenças entre os métodos de inoculação palito e com substrato, neste caso, o método do palito foi mais eficiente para discriminar os acessos para resistência ao patógeno. Porém, ao contrário do observado no presente trabalho, não foram observadas diferenças de agressividade entre os isolados.

Tabela 14 - Desdobramento da análise de variância para massa seca da parte aérea (MSPA: g.planta<sup>-1</sup>) de plantas de milho em função da origem dos isolados de *Macrophomina phaseolina* e métodos de inoculação, UDESC, Lages/SC, 2018.

Isolado	Métodos de inoculação		
	M1	M2	M3
MEMR31	0,17ABb	0,18Ab	0,25Ba
MEMR57	0,19Ab	0,18Ab	0,24Ba
MEMR89	0,14Bb	0,11Bb	0,33Aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A MSR das plantas de milho apresentou interação tripla entre os fatores analisados. O comportamento dos isolados sofreu influência dos métodos de inoculação para o híbrido Fórmula Viptera. O comportamento dos isolados foi estatisticamente igual no M1 e M2, porém, no M3 o MEMR57 demonstrou redução nos valores de MSR diferindo-se dos demais. Para o híbrido P1630H, o comportamento dos isolados seguiu a mesma tendência observada no híbrido Fórmula Viptera para os métodos M1 e M2, porém no M3 o MEMR31 demonstrou os menores valores para MSR, diferindo-se dos demais. Já no híbrido Status Viptera3 o comportamento dos isolados foi igual apenas no M1. No M2 o MEMR31 e o MEMR57 foram os responsáveis pelos menores valores de MSR e diferiram estatisticamente do MEMR89. No M3 os menores valores foram apresentados pelos isolados MEMR31 e MEMR57, porém este último não diferiu estatisticamente do MEMR89 para este método (Tabela 15).

Quando comparamos o comportamento dos isolados independentemente do fator híbridos, observou-se que os menores valores para MSR foram encontrados no M2 para os três isolados testados.

Tabela 15 - Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca radicular (MSR: g.raiz<sup>-1</sup>) média de plantas de milho em função de métodos de inoculação, isolados e híbridos, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método/Isolado	Fórmula Viptera		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,20Aa	0,25Aa	0,21Ba
M2	0,12Ba	0,10Ba	0,14Ca
M3	0,21Ab	0,13Bc	0,27Aa
Método/Isolado	P1630H		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,14Aa	0,19Ba	0,14ABa
M2	0,09Ba	0,08Ca	0,12Ba
M3	0,13ABb	0,26Aa	0,18Ab
Método/Isolado	Status Viptera3		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,25Aa	0,24Aa	0,24Aa
M2	0,08Bb	0,09Bb	0,17Ba
M3	0,22Ab	0,25Aab	0,29Aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A MST das plantas de milho também apresentou interação tripla entre os fatores analisados. Os dados do desdobramento desta interação tripla são apresentados na tabela 16.

Observou-se comportamento distinto dos métodos de inoculação e dos isolados dentro do híbrido Fórmula Viptera. Analisando o comportamento dos isolados no método de inoculação M1, observou-se que o MEMR89, não diferindo estatisticamente do MEMR31 apresentou os menores valores de MST obtidos para o híbrido mencionado. No M2, não foram observadas diferenças estatísticas entre os isolados. No M3, no entanto, os isolados MEMR31 e MEMR57 apresentaram os menores valores de MST, diferindo estatisticamente do MEMR89. Para o híbrido P1630H o comportamento dos isolados no M1 e no M2 foi semelhante, não diferindo entre si, ao contrário do M3 quando o MEMR31, não diferindo do MEMR89, apresentou os menores valores de MST para este método. Para o híbrido Status Viptera3, no M1 e M2 não foram observadas diferenças entre os isolados, porém no M3 o MEMR31 e o MEMR57, não diferindo entre si, foram os isolados que proporcionaram maior redução de MST.

Tabela 16 - Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca total (MST: g.planta<sup>-1</sup>) média de plantas de milho em função de métodos de inoculação, isolados e híbridos, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método/Isolado	Fórmula Viptera		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,39ABab	0,46Aa	0,35Bb
M2	0,30Ba	0,31Ba	0,25Ba
M3	0,46Ab	0,36ABb	0,62Aa
Método/Isolado	P1630H		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,29Aa	0,35Ba	0,24Ba
M2	0,25Aa	0,25Ba	0,21Ba
M3	0,35Ab	0,49Aa	0,45Aab
Método/Isolado	Status Viptera3		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,43Aa	0,43Aa	0,42Ba
M2	0,28Ba	0,24Ba	0,28Ca
M3	0,49Ab	0,53Ab	0,68Aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Diante do exposto, pode-se observar que para cultura do milho, a adição do M1 e M2, formando o M3 não é eficiente em aumentar o grau de redução dos parâmetros analisados pela infecção de *M. phaseolina*, desta forma, em programas de seleção de genótipos, tanto o M1 quanto o M2 podem ser indicados em detrimento do M3. Dentre os híbridos testados, o P1630H demonstrou maior suscetibilidade ao patógeno, já os híbridos Fórmula Viptera e Status Viptera3 demonstraram resultados semelhantes de menor suscetibilidade. Os isolados apresentaram grau de agressividade contrastante apenas para o parâmetro MSR, sendo o MEMR31 juntamente com o MEMR57, considerados os mais agressivos, em contraste ao MEMR89.

#### 3.4.4 Soja

Os dados de análise de variância para as avaliações de emergência (E), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST) de plantas de soja, encontram-se na tabela 17.

Tabela 17 - Resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados na cultura da soja em função de métodos de inoculação, origem de isolados de *Macrophomina phaseolina* e cultivares. UDESC, Lages/SC, 2018.

FV	E <sup>1</sup>	MSPA <sup>2</sup>	MSR <sup>3</sup>	MST <sup>4</sup>
Método (M)	61,89*	66,95*	256,72*	114,28*
Isolado (I)	1,26 <sup>NS</sup>	3,96*	30,43*	8,99*
Cultivar (C)	24,60*	31,75*	68,52*	41,54*
M x I	1,12 <sup>NS</sup>	3,21*	10,56*	4,10*
M x C	15,01*	31,27*	42,19*	34,95*
I x C	0,45 <sup>NS</sup>	2,22 <sup>NS</sup>	3,41*	2,76*
M x I x C	1,42 <sup>NS</sup>	3,45*	6,70*	4,10*
C.V. (%)	27,72	43,90	36,15	40,02

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Emergência de plantas; <sup>2</sup>Massa seca de parte aérea; <sup>3</sup>Massa seca radicular; <sup>4</sup>Massa seca total; \*Significativo a 5% de probabilidade de erro; <sup>NS</sup> não significativo.

O fator de variação método de inoculação (M) apresentou significância para todas as variáveis testadas. Ao contrário do observado por Cruciol & Costa (2018) que ao avaliar o comportamento de metodologias de inoculação de *M. phaseolina* em plantas de soja, não observaram influência dos métodos de inoculação na altura de plantas da cultivar CD 2737 RR.

Em termos gerais, observou-se que o M3 (método misto) foi o método mais efetivo, diferindo-se do M1 (disco micelial), mais tênue, e do M2 (suspensão de hifas e microescleródios incorporadas ao solo), considerado de aspecto intermediário (Tabela 18). Outra variável e outra cultura.

A MSPA de plantas apresentou diferença significativa entre métodos de inoculação. O M3 foi responsável pela maior redução de MSPA das plantas inoculadas. O M2 foi o que menos afetou este parâmetro. Plantas inoculadas com o M3 apresentaram redução de 50% no peso de parte aérea de planta do que as inoculadas no M2. Da mesma forma, a MSR e a MST foram afetadas pelos métodos de inoculação e apresentaram comportamentos similares. Plantas inoculadas no M3 reduziram em 63% a MSR e 56% a MST em comparação com as plantas inoculadas no M1 (Tabela 18).

A redução de massa seca pode ser explicada pela queda no vigor das plantas inoculadas quando a infecção ocorre no estágio de primeiro trifólio, como relatado por Ishikawa et al. (2018).

Os métodos de inoculação também influenciaram significativamente a emergência de plantas de soja. As sementes que foram semeadas no M3 apresentaram emergência de apenas 20,6%. No M2 a germinação foi de 93,4%, enquanto que no M1 esse valor foi de 79,5% (Tabela 2). O método M3 é constituído pela adição do M1 e M2, portanto, a concentração de inóculo neste caso foi maior que nos demais (concentração aproximada de microescleródios:

M1:  $6 \times 10^3$ ; M2:  $3 \times 10^4$ ; M3:  $3,6 \times 10^4$ ), possibilitando indicar a existência de uma concentração de inóculo ideal para infecção pelo patógeno.

Tabela 18 – Emergência (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de plantas de soja submetidas a isolados de *Macrophomina phaseolina* utilizando distintos métodos de inoculação, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método de inoculação	E (%)	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )	MST (g.planta <sup>-1</sup> )
M1	79,5A	0,22A	0,11A	0,34A
M2	93,4A	0,15B	0,07B	0,21B
M3	20,6B	0,11C	0,04C	0,15C

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Com exceção da emergência, todos os parâmetros apresentaram (da mesma forma ocorrida com método de inoculação) diferença significativa entre os isolados testados (Tabela 19).

A produção de massa seca da planta foi afetada pela presença do fungo *M. phaseolina* independente do isolado utilizado, porém, estes apresentaram grau de agressividade diferente. Em geral, os isolados MEMR31 (proveniente de raízes de feijão infectadas) e MEMR57 (proveniente de raízes de soja infectadas) promoveram maior redução dos parâmetros avaliados em comparação ao MEMR89 (proveniente de raízes de milho infectadas). Estes resultados levam a aferir relação entre a família botânica da espécie originária do isolado e a família da espécie inoculada, uma vez que os isolados MEMR31 e MEMR57 são originários de plantas pertencentes à mesma família Fabaceae. Diferenças na agressividade de isolados também foram observadas por Sexton et al. (2016) ao inocular isolados de *M. phaseolina* oriundos do sul e norte dos Estados Unidos da América, em cultivares de soja oriundas de ambas as regiões. Neste caso, os isolados provenientes do norte do país foram mais agressivos que os isolados do sul, em dois dos três experimentos analisados.

A produção de MSR de plantas de soja foi afetada em 62,5% quando se utilizaram os isolados MEMR31 e MEMR57 em relação à testemunha sem inóculo. Neste contexto, a redução de MSPA e de MST foi de 62,5 e 46,3%, respectivamente. O MEMR89 diferiu significativamente dos demais isolados e da testemunha apresentando menores valores de redução na produção de massa seca da planta: 25,0% para MSPA, 43,7% para MSR e 36,6% para MST (dados não apresentados).

A emergência de plantas de soja não foi influenciada pelos isolados utilizados, não diferindo entre si estatisticamente, todavia, este parâmetro se difere das plantas não

inoculadas com o fungo. Estas plantas apresentaram média de emergência de 99,0%, enquanto apenas 59,8% das plantas emergiram na presença do inóculo (Tabela 19).

Tabela 19 – Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST) e emergência (E) de plantas de soja em função da origem de isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Isolado	E (%)	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )	MST (g.planta <sup>-1</sup> )
MEMR31	58,6B	0,15C	0,06C	0,21C
MEMR57	54,3B	0,16BC	0,06C	0,23C
MEMR89	66,4B	0,18B	0,09B	0,26B
Média <sup>1</sup>	59,8	0,16	0,07	0,23
Testemunha	99,0A	0,24A	0,16A	0,41A
Redução <sup>2</sup>	39,6	33,3	56,2	43,9

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Média geral dos três isolados; <sup>2</sup>Redução:  $100 - [(Média^1 / Testemunha) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Foram observadas, para todos os parâmetros testados, diferenças significativas entre as cultivares de soja (Tabela 20).

De modo geral a cultivar BMX Ativa foi a menos suscetível à inoculação com o fungo *M. phaseolina*, diferindo-se estatisticamente das demais em todas as variáveis testadas. Além disso, para emergência de plantas esta cultivar apresentou resultados iguais estatisticamente à testemunha sem inóculo. Por outro lado, a cultivar BMX Turbo foi considerada a mais suscetível ao fungo, não diferindo da cultivar BMX Lança (que apresentou resultados intermediários) apenas nos parâmetros MSPA e E demonstrando assim, existência de grau de resistência de genótipos de soja ao patógeno, da mesma forma observada por Ishikawa et al. (2018), quando separou as cultivares de soja testadas, em grupos de acordo com a suscetibilidade a *M. phaseolina*, classificando as cultivares BMX Apolo, NA5909 e BMX Tornado em suscetíveis, BMX Potência e Vmx como intermediárias e BMX Elite e GDM15I029 como resistentes.

A cultivar BMX Turbo, considerada como a mais suscetível ao patógeno, sofreu redução de 40,9% na MSPA, 70,6% na MSR, 53,8% na MST e 57,3% na E de plantas quando comparada a mesma cultivar não inoculada. Para a cultivar BMX Lança, considerada de suscetibilidade intermediária, a redução foi de 42,3% na MSPA, 61,1% na MSR, 43,6% na MST e 50,8% na EMERG, também em comparação com a sua respectiva testemunha. A cultivar BMX Ativa, menos suscetível, esses valores de redução foram de 16% na MSPA, 40% na MSR, 31,8% na MST e 5,8% na E (Tabela 20).



Com exceção da cultivar BMX Ativa que não diferiu da testemunha no parâmetro E, todas as variáveis e todas as cultivares apresentaram reduções estatisticamente significativas, comprovando novamente a eficácia dos diferentes métodos de inoculação do fungo *M. phaseolina* empregados. Da mesma forma, todos os métodos de inoculação de *M. phaseolina* testados por Cruciol & Costa (2018), foram eficientes demonstrando o desenvolvimento da doença em plantas de soja inoculadas.

Tabela 20 - Emergência de plantas (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de cultivares de soja, submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
E (%)	BMX Turbo	42,7Bb	100,0Aa	57,3
	BMX Lança	47,7Bb	97,0Aa	50,8
	BMX Ativa	94,2Aa	100,0Aa	5,8
	Média	61,5	99,0	37,9
MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	BMX Turbo	0,13Bb	0,22Ba	40,9
	BMX Lança	0,15Bb	0,26Aa	42,3
	BMX Ativa	0,21Ab	0,25ABa	16,0
	Média	0,16	0,24	33,3
MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )	BMX Turbo	0,05Cb	0,17Aa	70,6
	BMX Lança	0,07Bb	0,18Aa	61,1
	BMX Ativa	0,09Ab	0,15Ba	40,0
	Média	0,07	0,17	58,8
MST (g.planta <sup>-1</sup> )	BMX Turbo	0,18Cb	0,39Aa	53,8
	BMX Lança	0,22Bb	0,39Aa	43,6
	BMX Ativa	0,30Ab	0,44Aa	31,8
	Média	0,23	0,41	43,9

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução:  $100 - [(Média^1 / Testemunha) * 100]$ ; Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A análise de variância apresentou para o parâmetro E interação dupla entre os fatores método de inoculação (M) e cultivares (C). Observou-se que no M1 as cultivares BMX Lança e BMX Ativa não diferiram estatisticamente e apresentaram emergência máxima (100%), diferindo apenas da cultivar BMX Turbo que apresentou 45,2% de emergência. No M2 as três cultivares não se diferem estatisticamente, ao contrário do observado no M3, quando as cultivares BMX Turbo e BMX Lança apresentando valores de 10,2 e 1,6% de emergência, respectivamente, iguais entre si, diferem da cultivar BMX Ativa com E de 83,0% (Tabela 21).

Diferenças de suscetibilidade de genótipos de soja à inoculação com *M. phaseolina* em diferentes métodos de inoculação também foram observadas por Ishikawa et al. (2018), quando as plantas foram inoculadas pelo método da punção da haste com palito colonizado, as cultivares BMX Apolo, BMX Tornado e BMX Potência foram suscetíveis, enquanto BMX

Elite apresentou-se com maior grau de resistência. Por outro lado, quando as plantas foram inoculadas pelo método de inoculação por infestação do solo, a cultivar BMX Tornado foi a que apresentou maior grau de resistência, enquanto as demais cultivares apresentaram comportamento intermediário.

Tabela 21 - Desdobramento da análise de variância para emergência (E: %) média de plantas de soja em função de métodos de inoculação e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

Cultivar	Métodos de inoculação		
	M1	M2	M3
BMX Turbo	45,2Bb	92,9Aa	10,2Bc
BMX Lança	100,0Aa	87,4Aa	1,6Bb
BMX Ativa	100,0Aa	100,0Aa	83,0Aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os fatores testados MSPA, MSR e MST apresentaram, na análise de variância, interação tripla entre método (M), isolado (I) e cultivar (C) (Tabela 22). Como a interação tripla é a de maior grau presente no trabalho serão demonstradas em preferencia às demais interações duplas apontadas pela estatística dos dados.

Para esta interação observou-se a mesma tendência, salvo exceções, do menor grau de agressividade do isolado MEMR89, da maior suscetibilidade da cultivar BMX Ativa ao patógeno e também do maior potencial destrutivo do método de inoculação M3.

A existência da interação tripla pode ser explicada pelo fato da cultivar BMX Lança apresentar MSPA de 0,01 g.planta<sup>-1</sup> quando inoculada com o isolado MEMR31 dentro do método de inoculação M2. Por tratar-se de valores considerados baixos, em relação aos demais tratamentos, a média do devido isolado e método sofreram redução. Porém, existe a confiabilidade dos dados, pois, a mesma cultivar dentro do mesmo método de inoculação apresenta valores médios baixos para os demais isolados (MEMR57= 0,05 g.planta<sup>-1</sup> e MEMR89= 0,08 g.planta<sup>-1</sup>) não diferindo entre si estatisticamente (Tabela 22).

Isolados de *M. phaseolina* originários do norte dos Estados Unidos da América (EUA), apresentaram incremento da doença em cultivares provenientes da mesma região quando comparado com a ação de isolados provenientes do sul do país (SEXTON et al., 2016). A implicação prática deste contexto está na necessidade de analisar a interação entre origem, no que se refere à região, e a cultura infectada da qual o isolado foi obtido. Assim futuros ensaios visando obtenção de cultivares com grau de resistência ao patógeno devem ser

conduzidos em condições específicas, com inoculação de isolados provenientes da mesma região e, de preferência, oriundos de mesma espécie botânica.

Tabela 22 - Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca da parte aérea (MSPA) média em g.planta<sup>-1</sup>, de plantas de soja em função de métodos de inoculação, isolados e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método/Isolado	BMX Turbo		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,14Ab	0,11Ab	0,24Aa
M2	0,09Ab	0,16Aab	0,19Aa
M3	0,09Aa	0,10Aa	0,08Ba
Método/Isolado	BMX Lança		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,29Aa	0,27Aa	0,25Aa
M2	0,11Bb	0,11Bb	0,20Aa
M3	0,01Ca	0,05Ba	0,02Ba
Método/Isolado	BMX Ativa		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,25Aa	0,25Aa	0,21ABa
M2	0,16Ba	0,15Ba	0,16Ba
M3	0,20ABa	0,24Aa	0,23Aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Da mesma forma que para a variável anterior discutida, a MSR também apresentou interação tripla entre os fatores testados. Para o fator método observou-se a mesma linha de tendência, ou seja, o M3 apresentando menores valores de MSR e diferindo-se dos demais métodos, salvo exceções. Neste contexto, observamos que a produção de MSR foi quase nula na cultivar BMX Lança inoculada com o M3 (a média dos três isolados foi equivalente a 0,006 gramas de massa seca radicular por planta).

A tendência para o comportamento dos três isolados também foi mantida, ou seja, o grau maior de agressividade é designado ao MEMR31 e MEMR57, em geral não diferindo entre si, e o grau menor ao MEMR89. A diferença entre os três isolados não foi constatada quando houve alta suscetibilidade das cultivares ao patógeno. Esse caso pode ser exemplificado pelo comportamento da cultivar BMX Turbo, quando inoculada com o M3 produziu MSR de 0,02 g.raiz<sup>-1</sup> para o MEMR31, 0,03 g.raiz<sup>-1</sup> para o MEMR57 e 0,02 g.raiz<sup>-1</sup> para o MEMR89, e também pela cultivar BMX Ativa quando inoculada com o M3 produziu MSR de 0,07 g.raiz<sup>-1</sup> para o MEMR31, 0,06 g.raiz<sup>-1</sup> para o MEMR57 e 0,08 g.raiz<sup>-1</sup> para o MEMR89 (Tabela 23).

A origem dos isolados MEMR31 e MEMR89 utilizados neste experimento provém da região centro-oeste brasileira, já as cultivares de soja, são cultivadas preferencialmente no sul do país. Esta informação é relevante uma vez que ocorreu a interação entre estes fatores adicionalmente ao fator método de inoculação. Sexton et al. (2016), ao analisar o comportamento de isolados de diferentes regiões dos EUA, sugeriram que metodologias que visem estudar a resistência de cultivares de soja, sejam conduzidas, em ensaios prévios de casa de vegetação, utilizando-se isolados e cultivares originários da mesma região, uma vez que o patógeno é heterogêneo. Neste contexto seria interessante analisar a suscetibilidade de cultivares do centro-oeste brasileiro com o MEMR31 e MEMR89 utilizados.

Tabela 23 - Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca radicular (MSR) média em g.raiz<sup>-1</sup>, de soja em função de métodos de inoculação, isolados e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método/Isolado	BMX Turbo		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,03Abb	0,04Ab	0,12Aa
M2	0,05Ab	0,05Ab	0,09Ba
M3	0,02Ba	0,03Aa	0,02Ca
Método/Isolado	BMX Lança		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,12Ab	0,14Aab	0,15Aa
M2	0,06Bb	0,05Bb	0,11Ba
M3	0,01Ca	0,01Ca	0,0Ca
Método/Isolado	BMX Ativa		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,14Aa	0,14Aa	0,12Aa
M2	0,05Bb	0,06Bb	0,10Ba
M3	0,07Ba	0,06Ba	0,08Ba

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A variável MST também apresentou interação tripla, justamente por ser um resultado da soma da MSPA e da MSR. As linhas de tendência observadas anteriormente também foram constatadas neste fator, levando a crer na existência de um grau de agressividade entre os isolados, grau de suscetibilidade entre as cultivares e grau de eficácia dos métodos de inoculação. Os dados desdobrados para a interação tripla do parâmetro MST das plantas de soja encontram-se na tabela 24.

Tabela 24 - Desdobramento da interação tripla da variância para massa seca total (MST) média em g.planta<sup>-1</sup>, de soja em função de métodos de inoculação, isolados e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

Método/Isolado	BMX Turbo		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,14Ab	0,11Ab	0,24Aa
M2	0,09Ab	0,16Aab	0,19Aa
M3	0,09Aa	0,10Aa	0,08Ba
Método/Isolado	BMX Lança		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,29Aa	0,27Aa	0,25Aa
M2	0,11Bb	0,11Bb	0,20Aa
M3	0,01Ca	0,05Ba	0,02Ba
Método/Isolado	BMX Ativa		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
M1	0,25Aa	0,25Aa	0,21ABa
M2	0,16Ba	0,15Ba	0,16Ba
M3	0,20ABa	0,24Aa	0,23Aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

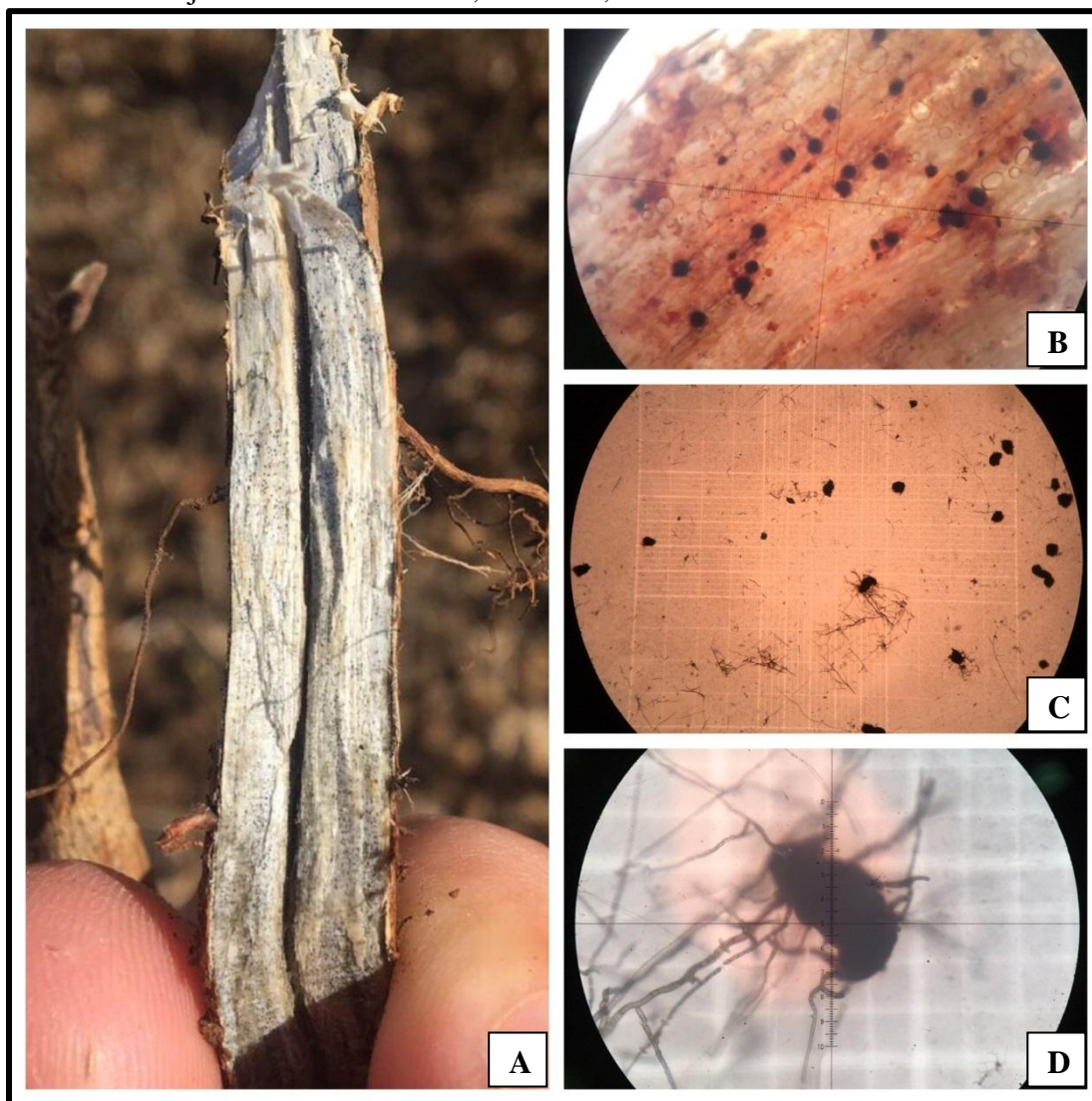
Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para a cultura da soja observou-se que o M3 foi o método mais eficiente ao reduzir significativamente os parâmetros testados, contrastando com os demais métodos, podendo ser indicado para programas de seleção de cultivares de soja visando resistência a podridão cinzenta da raiz, da mesma forma, apesar do M2 ter apresentado comportamento menos eficaz que o M3, este também apresentou resultados satisfatório, podendo também ser indicado para a mesma finalidade. Dentre as cultivares testadas, observou-se grau de suscetibilidade contrastante, sendo a cultivar BRS Turbo a mais suscetível ao patógeno, seguida da cultivar BRS Lança, considerada intermediária, e da cultivar BRS Ativa, considerada a menos suscetível. Dentre os isolados, observou-se comportamento similar entre os isolados MEMR31 e MEMR57, contrastando com o isolado MEMR89 em agressividade, sendo este último considerado como menos agressivo dentre os três.

Para as três culturas, a redução geral de massa seca (MSPA, MSR e MST) é explicada pela infecção de *M. phaseolina* inicialmente nas raízes destas culturas e progredindo para a colonização da haste/colmo (Figura 6). Durante a fase de colonização, ocorre a produção de microescleródios nas células dos vasos condutores, estas estruturas são, em tamanho, maiores que os vasos possam comportar, ocorrendo a ruptura da parede celular e conseqüentemente interrupção no fluxo de seiva da planta, resultando em menor acúmulo de massa, menor

crescimento vegetal e também diminuição do vigor, além de também afetar a área foliar (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

Figura 6 – Microescleródios de *Macrophomina phaseolina* produzidos em raízes infectadas de soja cultivar BRS Turbo, Barracão, RS.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

A: Raiz de soja apresentando produção de microscleródios visíveis a olho nu; B: Microescleródios de *M. phaseolina* vistos em microscópio óptico sob lente de 5x; C: Contagem de microscleródios em câmara de Neubauer em microscópio óptico sob lente de 10x; D: Detalhe de microscleródio germinado visto em microscópio óptico sob lente de 40x.

### 3.5 CONCLUSÕES

O método de inoculação misto (M3) foi o mais eficaz em propiciar a infecção de *Macrophomina phaseolina*, nas culturas do feijoeiro comum e da soja.

Para inoculação de *Macrophomina phaseolina* na cultura do milho podem ser empregados os métodos de disco micelial e de suspensão de hifas e microescleródios em preferência ao método misto.

Nas culturas do feijoeiro comum, milho e soja, existem graus de suscetibilidade divergentes entre cultivares/híbridos, em relação à infecção de *Macrophomina phaseolina*.

Nas culturas da soja e do milho o isolado MEMR31 demonstrou maior agressividade aos parâmetros de emergência e massa seca das plantas inoculadas.

Os isolados MEMR31, MEMR57 e MEMR89 reduziram a massa seca das plantas de feijoeiro comum com mesmo grau de agressividade.





## 4 CAPÍTULO 2 SEVERIDADE DE PODRIDÃO CINZENTA DA RAIZ E COMPONENTES DE RENDIMENTO DE CULTIVARES DE FEIJÃO SUBMETIDAS À INOCULAÇÃO COM ISOLADOS DE *Macrophomina phaseolina*

### 4.1 RESUMO

*Macrophomina phaseolina* é um dos principais patógenos associados à podridão radicular em feijoeiro comum. O trabalho foi dividido em dois subprojetos objetivando, avaliar: subprojeto I) o estabelecimento inicial dos genótipos de feijoeiro comum submetidos à inoculação com isolados de *M. phaseolina*; subprojeto II) a reação de genótipos de feijoeiro comum em relação à severidade da podridão cinzenta da raiz e seu efeito nos componentes do rendimento. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com as cultivares ANFC 9 Agro Norte, BRS Esteio, BRS Estilo, BRS Pérola, FTS Soberano, IPR Campos Gerais, IPR Tangará, IPR Tuiuiú, IPR Uirapurú e TAA Dama, e com os isolados MEMR31 (oriundo de feijoeiro comum), MEMR57 (oriundo da soja) e MEMR89 (oriundo do milho) em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. O inóculo de cada isolado foi adicionado ao substrato antes da semeadura. No subprojeto I, no estágio V4, (21 dias após a semeadura (DAS)), foram avaliadas a emergência (E), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) de plântulas. No subprojeto II, no estágio R9 (maturação de colheita) foram avaliados os componentes do rendimento: número de vagens por planta (NVP); número de grãos por planta (NGP); massa de grãos por planta (MGP); a severidade de podridão radicular (SPR) e a MSR das plantas de feijoeiro comum. Foram observados os seguintes resultados: no subprojeto I, todas as variáveis analisadas foram influenciadas significativamente pela inoculação de isolados de *M. phaseolina*, sendo o MEMR31 considerado o mais agressivo, MEMR57 intermediário e MEMR89 menos agressivo. Dentre as variáveis testadas, o fator que sofreu a maior redução percentual causada pela infecção do fungo foi a MSPA, com valor de 50%, seguido da MST com redução de 47,76, da AF com 45,38%, da MSR com 42,10% e da E com 38,45%; no subprojeto II, todas as cultivares apresentaram severidade da doença acima de 75%, independentemente do isolado de *M. phaseolina*. A redução média na massa seca radicular decorrente da infecção pelo patógeno foi de 54,3% em relação às plantas sadias. As cultivares IPR Tangará, ANFC 9, BRS Esteio, BRS Pérola e FTS Soberano apresentaram redução nos componentes do rendimento avaliados, e a única cultivar a reduzir simultaneamente todos os componentes de rendimento foi a IPR Tangará, por outro lado, as cultivares IPR Campos Gerais, BRS Estilo, IPR Tuiuiú, TAA Dama e IPR Uirapurú não apresentaram redução significativa de nenhum dos componentes avaliados em relação à testemunha sem inóculo. Os isolados MEMR31 e MEMR57 e MEMR89, não diferiram entre si, foram responsáveis, respectivamente, pela redução de NVP de 7,89, 7,57 e 7,18% e de MGP de 14,1, 12,9 e 10,1%. O isolado MEMR89, diferindo-se dos demais, foi o menos agressivo para os parâmetros NGP e MSR, reduzindo-os em 6,74 e 41,4%, respectivamente. Concluiu-se que: subprojeto I: *M. phaseolina* foi capaz de reduzir a E, MSPA, MSR e MST, influenciando negativamente no desenvolvimento inicial de plantas de feijoeiro comum; subprojeto II: todos os genótipos testados foram suscetíveis à podridão cinzenta da raiz, acarretando em redução significativa de MSR. A infecção de *M. phaseolina* em planta de feijoeiro comum é capaz de reduzir número de vagens por planta, número de grãos por planta e massa de grãos por planta, em diferentes graus de intensidade, dependendo do genótipo utilizado. Os isolados MEMR31

e MEMR57, oriundos de feijoeiro comum e de soja, respectivamente, apresentaram maior agressividade em relação ao MEMR89, oriundo de milho.

**Palavras chave:** *Phaseolus vulgaris*; controle genético; cultivar resistente.

## 4.2 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*P. vulgaris* L.) é uma leguminosa que possui alto teor de proteína e aminoácidos de grande importância para o consumo humano. O Brasil é o terceiro maior produtor de feijão do mundo, produzindo 3,33 milhões de t em 3,19 milhões de ha, valores estes, que indicam baixa produtividade (1.043 kg ha<sup>-1</sup>) em relação aos padrões internacionais, ocasionada entre outros fatores pelas doenças que acometem o cultivo (SEAB, 2018; CONAB, 2018).

A maior parte das doenças da cultura é causada por fungos (HALL et al., 2005). As principais doenças fúngicas do feijoeiro são antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav.), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary), ferrugem (*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger.) e mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris), que infectam os órgãos aéreos da planta (CAMPOS et al., 2015). Dentre as podridões radiculares destacam-se a Podridão radicular seca (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc), Murcha de Fusarium (*F. oxysporum* Schlecht), Podridão radicular de Rhizoctonia (*Rhizoctonia solani* Kuhn) e a podridão cinzenta da raiz (*M. phaseolina* (Tassi) Goid), este último, considerado como um dos patógenos com maior prevalência no Brasil (VALLE et al., 1997; ALMEIDA et al., 2005; DALLA PRIA; SILVA, 2010).

O fungo *M. phaseolina* infecta principalmente raízes e hastes, interferindo na circulação de seiva, reduzindo o vigor das plantas, podendo levar a morte da mesma ou, caso isto não ocorra, reduzir a produtividade (MAYÉK-PÉREZ et al., 2001b; BOARETTO; DANELLI, 2012; GUPTA et al., 2012; GARCÉS-FIALLOS, 2013; ALMEIDA et al., 2014). O patógeno pode estar associado a sementes e ser transmitido para a plântula (NORONHA et al., 2012). Os microescleródios são produzidos em estágio avançado de infecção de tecido hospedeiro suscetível. Estas estruturas caracterizam-se por aspecto globoso e coloração negra, e sua presença torna o tecido mais escuro/acinzentado, levando a denominação de podridão cinzenta da raiz. O microescleródio pode sobreviver saprofiticamente, em restos culturais e de forma livre no solo, constituindo-se na principal fonte de inóculo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; VALLE et al., 1997; MARINGONI; LAURETTI, 1999; MAYÉK-PÉREZ et al., 2001b).

Considerado cosmopolita, este patógeno possui ampla gama de hospedeiros sendo relatado em mais de 500 espécies vegetais incluindo culturas de relevância econômica, tais como: feijão (*P. vulgaris* L.), milho (*Z. mays* L.), soja (*G. max* (L.) Merrill), sorgo (*S. bicolor* (L.) Moench, amendoim (*A. hypogaea* L.), girassol (*H. annuus* L.) e algodão (*G. hirsutum* L.) (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; GUPTA et al., 2012; MENGISTU et al., 2013; ISHIKAWA et al., 2018). Na cultura da soja, são descritas reduções no rendimento de 5 a 50% dependendo das condições ambientais para infecção e da susceptibilidade do genótipo (YANG; NAVI, 2005, ISHIKAWA et al., 2018). Em feijão, Mayék-Pérez et al. (2003), observaram que plantas inoculadas artificialmente com *M. phaseolina* reduziram em 60% o rendimento de sementes quando comparadas com plantas cultivadas em solos naturalmente infestados.

As condições predisponentes para infecção de raízes são: compactação do solo e períodos de restrição hídrica (GILL-LANGARICA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2014; MARTÍNEZ-VILLAREAL et al., 2016). Devido à ampla gama de hospedeiros e a sobrevivência do inóculo no solo, práticas culturais que envolvem a rotação e sequência de culturas são praticamente inviáveis para reduzir a incidência de *M. phaseolina* (ALMEIDA et al., 2014; REIS et al., 2014).

O uso de cultivar resistente é a estratégia de controle mais viável para esse patossistema (MAYÉK-PÉREZ et al., 2001b; MAYÉK-PÉREZ et al., 2003; CRUCIOL; COSTA, 2018; ISHIKAWA et al., 2018), no entanto, no Brasil, para a cultura do feijoeiro existem poucos trabalhos sobre resistência de genótipos à podridão cinzenta da raiz. Em Porto Rico, Viteri & Linares (2017), inocularam dois isolados do patógeno em 23 genótipos de feijão em condições de casa de vegetação e não encontraram genótipos resistentes. No México, Mayék-Pérez et al. (2004), determinaram a reação de 56 genótipos de feijão ao patógeno, observando ampla variabilidade dos genótipos em relação ao rendimento de grãos, no entanto, sem classificação do grau de suscetibilidade.

Para adotar essa estratégia de controle é necessário conhecimento da variabilidade do patógeno em termos de patogenicidade. Devido à abrangência territorial em que ocorre e à amplitude de espécies hospedeiras, sugere-se que o fungo seja heterogêneo em termos de isolados, além disso, tentativas para classificar isolados de *M. phaseolina* em subgrupos baseados em morfologia e patogenicidade não são consistentes (MAYÉK-PÉREZ et al., 2001a; MUÑOZ-CABAÑAS et al., 2005).

Havendo necessidade de condução de trabalhos que avaliem a variabilidade genética de diferentes isolados de *M. phaseolina* e a partir disso, buscar cultivares com nível de resistência ao patógeno, o trabalho teve como objetivo avaliar: i) o estabelecimento inicial dos

genótipos de feijoeiro comum submetidos à inoculação com isolados de *M. phaseolina*; ii) a reação de genótipos de feijoeiro comum em relação à severidade da podridão cinzenta da raiz e seu efeito nos componentes do rendimento.

#### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos nas safras 2017 e 2018 no Laboratório de Fitopatologia (LF) e na casa de vegetação do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, CAV/UEDESC, município de Lages, Santa Catarina, Brasil (-27°47'35"S; -50°18'07"W). O experimento foi conduzido em duas etapas/subprojetos.

##### 4.3.1 Subprojeto I: Avaliação de genótipos de feijoeiro comum em relação ao estabelecimento inicial da cultura.

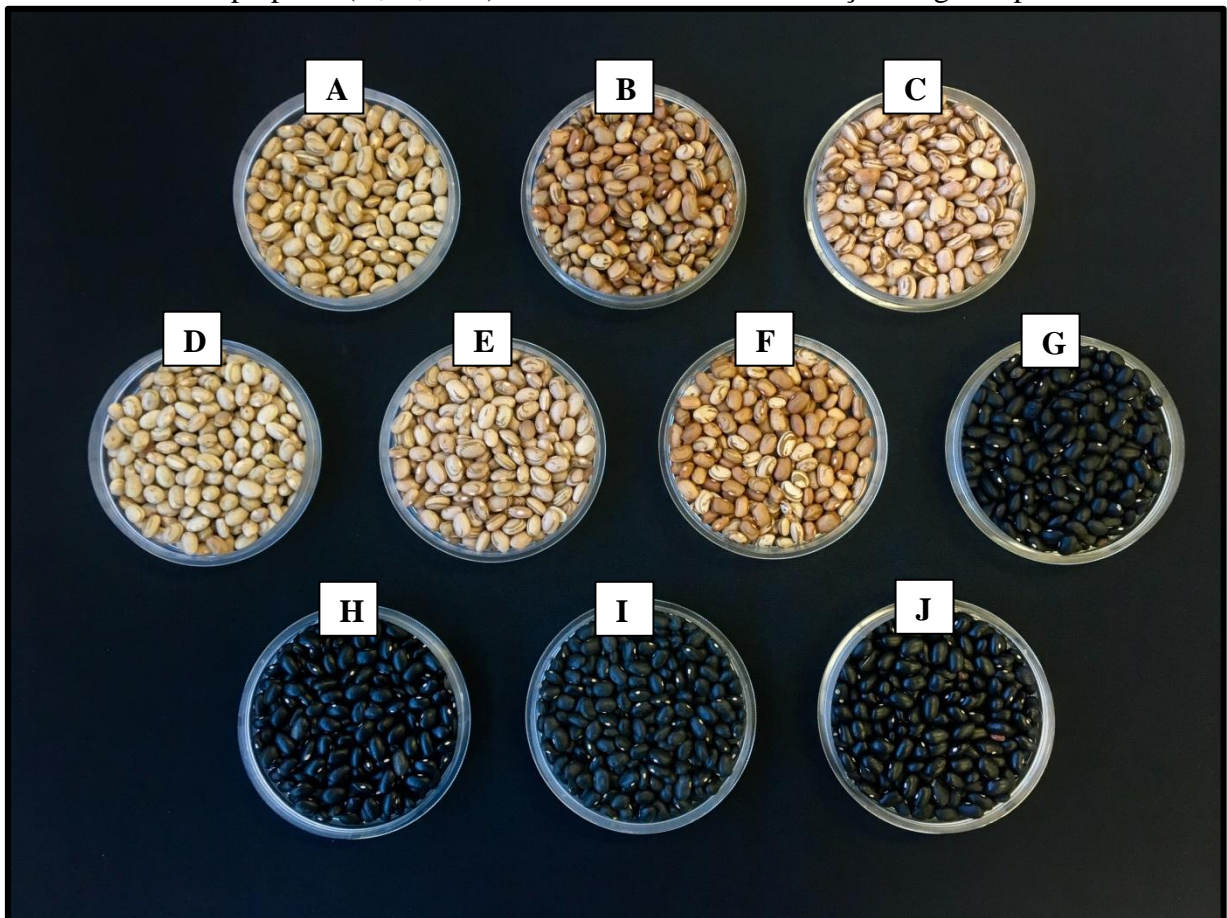
Foram utilizados três isolados de *M. phaseolina* denominados MEMR31, MEMR57 e MEMR89, ambos armazenados na Micoteca “Erlei Melo Reis” do LF do CAV/UEDESC. Os três isolados foram obtidos de tecido radicular infectado da cultivar de feijão BRSMG Madrepérola (MEMR31), da cultivar de soja BMX Lança (MEMR57) e do híbrido de milho P1630H (MEMR89). A multiplicação do fungo foi realizada em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), mantendo-se as placas de Petri incubadas em câmara de crescimento a 28°C durante 10 dias. Colônias puras de *M. phaseolina* foram trituradas em liquidificador seguindo proporção de 10 placas de Petri (90 mm) para cada 500 mL de água destilada com uma gota de Tween 20 (0,1mL) para uniformização da solução. A concentração final de inóculo foi ajustada em hemacitômetro para  $3 \times 10^4$  microescleródios mL<sup>-1</sup>.

Com o auxílio de um borrifador manual, 250 mL da suspensão de inóculo, não filtrada, foi inoculada em uma mistura homogênea de 0,5 kg de substrato e areia, na proporção de 2,3: 1. O “produto final obtido da mistura do substrato com o inóculo” após receber agitação constante, foi acondicionado em recipientes plásticos com capacidade de 500 mL, e então, acomodados em casa de vegetação por dez dias até a data de semeadura. Foram realizadas regas controladas a cada três dias para não comprometer a colonização do fungo no substrato.

Foram utilizadas dez cultivares de feijoeiro, sendo estas: ANFC 9 Agro Norte, BRS Esteio, BRS Estilo, BRS Pérola, FTS Soberano, IPR Campos Gerais, IPR Tangará, IPR Tuiuiú, e IPR Uirapurú e TAA Dama (Figura 7). Não foram encontradas informações sobre

reação à *M. phaseolina* nas fichas técnicas fornecidas pelos detentores destes genótipos. Foram semeadas quatro sementes por recipiente. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dez repetições, cada recipiente contendo quatro plantas constituiu uma unidade amostral. Foram realizadas irrigações controladas para manter o crescimento e desenvolvimento normal das plantas.

Figura 7 – Sementes das cultivares de feijoeiro comum do tipo carioca (A, B, C, D, E e F) e do tipo preto (G, H, I e J) utilizadas no ensaio de reação de genótipos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Cultivares: A - ANFC 9; B - IPR Campos Gerais; C - BRS Estilo; D - TAA Dama; E - IPR Tangará; F - BRS Pérola; G - FTS Soberano; H - IPR Tuiuiú; I - BRS Esteio; J - IPR Uirapurú.

No estágio fenológico V4 (terceira folha trifoliolada aberta e plana) (GEPTS; FERNÁNDES, 1982), 21 DAS, as plantas foram coletadas, lavadas cuidadosamente (com objetivo de eliminar o substrato remanescente nas raízes), separadas em parte aérea e radicular, acondicionadas em sacos de papel, secas em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 60°C (até estabilidade de peso) e pesadas. Os parâmetros avaliados foram: emergência de plântulas (E) expressa em porcentagem; massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca radicular (MSR); massa seca total (MST= MSPA+MSR) expressa em  $\text{g.plântula}^{-1}$

e área foliar (AF), com auxílio de equipamento eletrônico Integrador de Área Foliar modelo LI-3100C, expressa em  $\text{cm}^2 \cdot \text{planta}^{-1}$ .

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial pelo teste de F a 5% de probabilidade de erro utilizando o programa SISVAR 5.6. Os dados de emergência de plântulas foram transformados pela equação:  $\text{Arcsen} \left( \sqrt{\frac{x}{100}} \right)$ , para obtenção do parâmetro normalidade. Os tratamentos foram submetidos ao teste de médias SCOTT-KNOTT para o fator de variação cultivares (C) e ao teste de médias de Tukey para o fator de variação isolados (I).

#### **4.3.2 Subprojeto II: Reação de genótipos de feijoeiro comum à podridão cinzenta da raiz e seus efeitos nos componentes de rendimento.**

Foram utilizados os mesmos isolados, o preparo e multiplicação do inóculo e o método de inoculação, descritos no subprojeto I.

Depois de inoculado, o “produto final obtido da mistura do substrato com o inóculo” recebeu agitação constante e foi acondicionado em vasos plásticos com capacidade de 8 litros, então, acomodados em casa de vegetação por dez dias até a data de semeadura. Da mesma forma, foram realizadas regas controladas a cada três dias para não comprometer a colonização do fungo no substrato. O substrato recebeu adubação química de N-P-K seguindo as recomendações da comissão de adubação e fertilidade do solo para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina com base na produtividade de  $4.000 \text{ kg ha}^{-1}$  (COMISSÃO, 2016).

Foram utilizadas as mesmas cultivares de feijoeiro utilizadas no subprojeto I, sendo estas: ANFC 9 Agro Norte, BRS Esteio, BRS Estilo, BRS Pérola, FTS Soberano, IPR Campos Gerais, IPR Tangará, IPR Tuiuiú, e IPR Uirapurú e TAA Dama. Foram semeadas seis sementes por vaso e três dias após emergência (DAE) foi realizado o desbaste deixando apenas duas plantas por vaso. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, cada vaso constituindo uma unidade amostral. Foram realizadas irrigações controladas para manter o crescimento e desenvolvimento normal das plantas objetivando a produção de grãos.

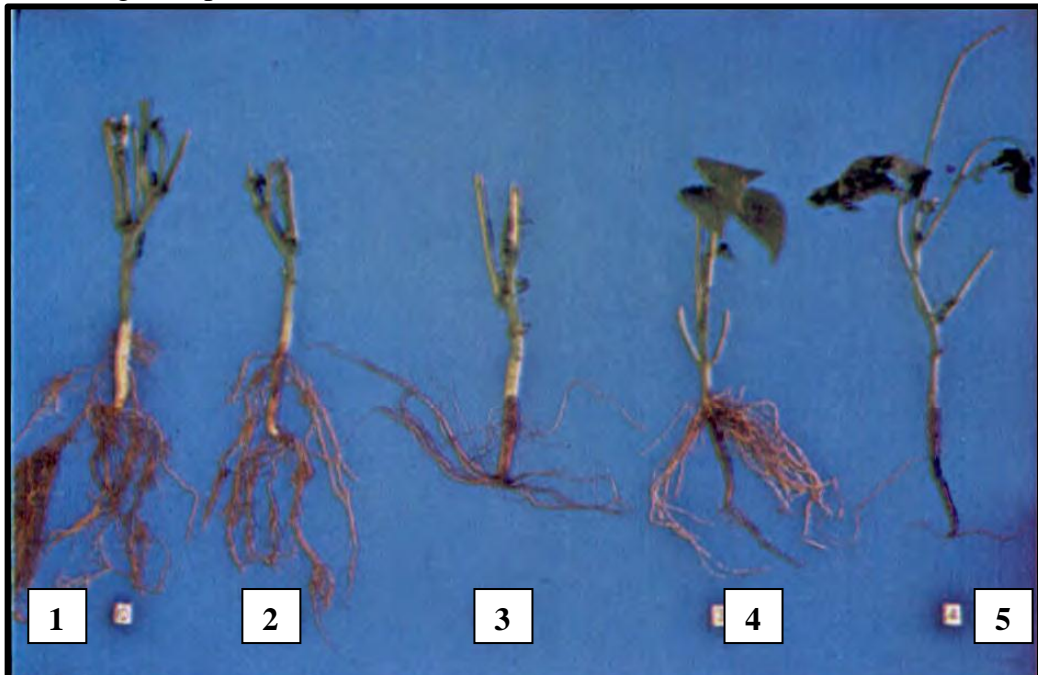
No estágio fenológico R9 (maturidade de colheita dos grãos) (GEPTS; FERNÁNDES, 1982), foram avaliados: i) número de vagens por planta (NVP); ii) número de grãos por planta

(NGP); iii) massa de grãos por planta (MGP); iv) severidade de podridão radicular (SPR); v) massa seca radicular (MSR).

Todas as vagens foram contadas e removidas das plantas (obtenção do NVP), com posterior trilha manual, separação e contagem dos grãos (obtenção do NGP), secagem dos grãos em estufa com circulação de ar a 60°C até adquirirem peso constante e finalmente pesagem dos grãos em balança analítica (obtenção da MGP).

Todas as plantas foram removidas dos vasos com o sistema radicular lavado cuidadosamente em água corrente para remoção do substrato e posterior determinação da SPR e MSR. As raízes das plantas foram mergulhadas em bandejas com fundo branco contendo água para visualização e quantificação da SPR, seguindo adaptação da escala diagramática descrita por Abawi & Pastor-Corrales (1990), com valores de severidade enquadrados em 0% (plantas e raízes saudias, não apresentando sintoma algum), 0 a 25%, 25 a 50% e 50 a 75% e 75 a 100% (plantas morrendo ou já mortas) (Figura 8). O sistema radicular foi cortado e separado da parte aérea das plantas, depositado em sacos de papel e acondicionados em estufa de secagem até adquirirem peso constante com posterior pesagem e obtenção dos dados da MSR.

Figura 8 – Escala diagramática de severidade de podridão radicular em plantas de feijoeiro, sugerida por Abawi & Pastor-Corrales (1990).



Fonte: Abawi & Pastor-Corrales (1990).

1: Ausência de sintomas, planta sadia, 0% de severidade; 2: Leve descoloração radicular, lesões limitando-se a 10% do tecido radicular; 3: 25% do tecido radicular apresentando lesões, queda no número e volume de raízes secundárias; 4: 50% do tecido radicular apresentando lesões, microescleródios visíveis; 5: 75% do tecido radicular apresentando lesões, sistema radicular com mínimas raízes.



Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial pelo teste de F a 5% de probabilidade de erro utilizando o programa SISVAR 5.6. Os tratamentos foram submetidos ao teste de médias SCOTT-KNOTT para o fator cultivar e ao teste de Tukey para o fator isolado.

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.4.1 Subprojeto I

Os resultados da análise de variância para as avaliações: emergência de plantas (E); massa seca de parte aérea (MSPA); massa seca radicular (MSR); massa seca total (MST) e área foliar (AF) dos dez genótipos de feijoeiro comum constam na tabela 25. Os fatores estudados na análise de variância apresentaram significância para todas as variáveis mensuradas.

Tabela 25 - Resumo da análise de variância para os fatores de variação (FV): emergência de plantas (E); massa seca de parte aérea (MSPA); massa seca radicular (MSR); massa seca total (MST) e área foliar (AF), avaliados na cultura do feijoeiro comum em função da origem de isolados de *Macrophomina phaseolina* e cultivares. UDESC, Lages/SC, 2018.

FV	E <sup>1</sup>	MSPA <sup>2</sup>	MSR <sup>3</sup>	MST <sup>4</sup>	AF <sup>5</sup>
Isolado (I)	188,35*	238,48*	133,09*	224,28*	83,32*
Cultivar (C)	24,57*	21,87*	17,15*	22,14*	13,33*
I x C	5,22*	7,41*	4,29*	6,97*	2,90*
C.V. (%)	13,00	22,52	29,33	22,67	31,99

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Emergência de plantas; <sup>2</sup>Massa seca de parte aérea; <sup>3</sup>Massa seca radicular; <sup>4</sup>Massa seca total; <sup>5</sup>Área foliar; \*Significativo a 5% de probabilidade de erro; <sup>NS</sup>não significativo.

O fator de variação isolado (I) seguiu comportamento padrão para todos os parâmetros avaliados (todos diferiram estatisticamente entre si) sendo: MEMR31 considerado o mais agressivo, MERM57 intermediário e MEMR89 menos agressivo. Dentre as variáveis testadas, o fator que sofreu a maior redução percentual causada pela infecção de *M. phaseolina* foi a MSPA, com valor de 50%, seguido da MST com redução de 47,8, da AF com 45,4%, da MSR com 42,1% e da E com 38,4% (Tabela 26). Estes resultados comprovam a eficiência da inoculação com os três isolados de *M. phaseolina*.

A emergência de plantas de feijoeiro comum sofreu redução significativa em função dos isolados de *M. phaseolina* (Tabela 26). Todos os isolados diferiram estatisticamente uns dos outros e da testemunha, sendo o MEMR31 (obtido de plantas de feijão) o mais agressivo



e MEMR89 (obtido de milho) o menos. Comparando estes resultados com os obtidos por Ndiaye et al. (2008), que ao estudar a resistência do Fonio (*D. exilis*) e do milheto (*P. glaucum*) à isolados de *M. phaseolina*, obtidos a partir de solo e de tecido de plantas de feijão caupí (*V. unguiculata*) infectados, não observaram redução na emergência de plantas destas culturas em relação à plantas sadias os quais sugeriram relação de especificidade entre isolados e hospedeiros do patógeno, uma vez que, fonio e milheto são gramíneas e foram inoculadas com isolado proveniente de uma leguminosa não apresentando redução de emergência. No presente estudo, quando os genótipos de feijão comum foram inoculados com o isolado MEMR89, originário da gramínea, apresentaram os menores índices de redução de emergência de plantas, demonstrando baixa relação específica entre patógeno e hospedeiro, no entanto, ainda significativa.

Tabela 26 – Emergência de plantas (E), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR), massa seca total (MST) e área foliar (AF), de plantas de feijoeiro comum em função da origem de isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Isolado	E (%)	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )	MST (g.planta <sup>-1</sup> )	AF (cm <sup>2</sup> .planta <sup>-1</sup> )
MEMR31	21,0D	0,14D	0,07D	0,21D	31,3D
MEMR57	60,0C	0,21C	0,10C	0,31C	45,6C
MEMR89	73,0B	0,36B	0,17B	0,52B	68,4B
Média <sup>1</sup>	51,3	0,24	0,11	0,35	48,4
Testemunha	83,4A	0,48A	0,19A	0,67A	88,6A
Redução <sup>2</sup> (%)	38,4	50,0	42,1	47,8	45,4

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018

<sup>1</sup>Média geral dos três isolados; <sup>2</sup>Redução:  $100 - [(Média^1 / Testemunha) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..

A presença do fungo *M. phaseolina* foi responsável pela redução significativa na emergência de plantas de feijoeiro comum, independentemente do genótipo utilizado. Todos os genótipos inoculados apresentaram, em diferentes graus, diminuição na emergência de plantas. Em média, plantas inoculadas apresentaram emergência de 50,2% enquanto plantas sem inóculo emergiram em 83,6% dos casos. Em termos relativos, esta redução entre plantas inoculadas e sadias é de praticamente 40,0% (Tabela 27).

O comportamento discrepante para o parâmetro emergência foi observado apenas quando os genótipos receberam adição do inóculo. Plantas não inoculadas apresentaram comportamento estatisticamente igual. O grau de intensidade na redução da emergência variou entre 14 e 77% entre os genótipos. A cultivar BRS Esteio, diferindo-se das demais, apresentou o maior percentual de redução de emergência (77,3%), sendo considerada a mais suscetível ao patógeno para este parâmetro. Nenhuma cultivar inoculada apresentou

emergência igual à testemunha, porém, a menor redução foi observada na cultivar BRS Pérola (14,5%), considerada a menos suscetível (Tabela 27).

Tabela 27 – Emergência (E) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
E (%)	ANFC-9	40,3Cb	79,9Aa	49,6
	BRS Esteio	16,0Db	70,5Aa	77,3
	BRS Estilo	55,2Bb	89,0Aa	38,0
	BRS Pérola	74,2Ab	86,8Aa	14,5
	FTS Soberano	61,4Bb	86,8Aa	29,3
	IPR Campos Gerais	57,4Bb	89,0Aa	35,5
	IPR Tangará	41,4Cb	77,5Aa	46,6
	IPR Tuiuiú	49,3Bb	86,9Aa	43,3
	IPR Uirapurú	72,5Ab	86,8Aa	16,5
	TAA Dama	34,1Cb	82,3Aa	58,6
	Média	50,18b	83,55a	39,9

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo / Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A inoculação com isolados de *M. phaseolina* foi efetiva ao causar infecção nas plantas de feijoeiro comum, reduzindo a MSPA independentemente do genótipo, todavia, estes apresentaram graus de suscetibilidade diferentes. O contraste entre genótipos foi observado apenas nas plantas inoculadas. Em plantas sadias não houve diferença significativa na produção de MSPA entre os genótipos. Em média, estas plantas apresentaram 0,48 gramas de massa seca da parte aérea, enquanto plantas inoculadas apresentaram menos da metade deste valor ( $0,23\ g.planta^{-1}$ ). Esta redução em termos percentuais remete a dano direto de 52% na produção de massa seca de parte aérea em plantas inoculadas (Tabela 28).

O grau de suscetibilidade dos genótipos à inoculação com o patógeno variou entre 34 e 75%. Novamente, a cultivar BRS Esteio foi a mais suscetível à *M. phaseolina*, apresentando 75% de redução de MSPA em relação à testemunha sem inóculo. Os genótipos menos suscetíveis, dentre os testados, foram o BRS Pérola e IPR Tuiuiú, com redução percentual de 35,3 e 34,1%, respectivamente.

Tabela 28 – Massa seca de parte aérea (MSPA) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	ANFC-9	0,23Cb	0,47Aa	51,1
	BRS Esteio	0,12Db	0,48Aa	75,0
	BRS Estilo	0,28Bb	0,47Aa	40,4
	BRS Pérola	0,33Ab	0,51Aa	35,3
	FTS Soberano	0,24Cb	0,45Aa	46,7
	IPR C. Gerais	0,26Cb	0,49Aa	47,0
	IPR Tangará	0,22Cb	0,48Aa	54,2
	IPR Tuiuiú	0,23Cb	0,51Aa	54,9
	IPR Uirapurú	0,29Bb	0,44Aa	34,1
	TAA Dama	0,15Db	0,46Aa	67,4
	Média	0,23b	0,48a	52,1

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo / Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

De modo geral, plantas inoculadas apresentaram em média 0,11 g de massa seca radicular, enquanto plantas sadias apresentaram 0,19 g. Essa relação demonstra redução percentual de 42,1% na produção de MSR devido à infecção causada por *M. phaseolina* em plantas de feijoeiro comum, independentemente do genótipo. Além disso, a produção de MSR demonstrou variação estatisticamente significativa, tanto para plantas inoculadas quanto para plantas não inoculadas. Este resultado remete diretamente a variações individuais na capacidade de produção radicular de cada genótipo. Para observar o desempenho destes, em relação à inoculação com o patógeno, foram considerados os valores da relação entre plantas infectadas e sadias. Desta forma, observou-se grau de suscetibilidade dos genótipos variando entre 20 e 66% (Tabela 29).

A produção de MSR diferiu entre as cultivares, bem como, o grau de suscetibilidade entre estas. Novamente, dentre as mais suscetíveis, observou-se a cultivar BRS Esteio com redução de 66,7%, não diferindo estatisticamente da cultivar TAA Dama (56,2%) em relação às devidas testemunhas não inoculadas. Da mesma forma, as cultivares menos suscetíveis foram: BRS Estilo e BRS Pérola com redução de 20 e 25% na MSR (Tabela 29). Redução de biomassa de hastes e de raízes infectadas por isolados de *M. phaseolina* em plantas de feijão caupí também foram observadas por Ndiaye et al (2008). Os autores relatam que plantas infectadas apresentaram redução de biomassa de 60,7% e 40,6%, respectivamente, para hastes e raízes em relação a plantas sadias.

Tabela 29 – Massa seca radicular (MSR) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )	ANFC-9	0,10Cb	0,17Da	41,2
	BRS Esteio	0,07Db	0,21Ba	66,7
	BRS Estilo	0,12Ba	0,15Da	20,0
	BRS Pérola	0,15Ab	0,20Ca	25,0
	FTS Soberano	0,13Bb	0,18Ca	27,8
	IPR C. Gerais	0,12Bb	0,20Ca	40,0
	IPR Tangará	0,10Cb	0,17Da	41,2
	IPR Tuiuiú	0,13Bb	0,26Aa	50,0
	IPR Uirapurú	0,16Ab	0,23Ba	30,4
	TAA Dama	0,07Db	0,16Da	56,2
	Média	0,11b	0,19a	42,1

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo/Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A produção de MST, da mesma forma como ocorreu para o parâmetro MSR, diferiu em grau tanto nas plantas inoculadas quanto nas não inoculadas. Em geral, plantas inoculadas com isolados de *M. phaseolina* produziram 35 gramas de massa seca total, enquanto plantas sadias apresentaram média de 67 g, representando redução de 47,8% na MST das plantas. A variação observada entre os genótipos situou-se entre valores de 30 e 72% (Tabela 30).

Novamente, as cultivares BRS Esteio e TAA Dama apresentaram os maiores índices de redução na MST, 72,5 e 66,7%, respectivamente, em relação às testemunhas, sendo consideradas como as mais suscetíveis à inoculação de isolados de *M. phaseolina* dentre as testadas para este parâmetro. As cultivares BRS Pérola e IPR Uirapurú apresentaram os menores índices de redução de MST: 31,0 e 32,8%, respectivamente (Tabela 30).

Tabela 30 – Massa seca total (MST) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
MST (g.planta <sup>-1</sup> )	ANFC-9	0,34Bb	0,64Ba	46,9
	BRS Esteio	0,19Cb	0,69Aa	72,5
	BRS Estilo	0,39Bb	0,62Ba	37,1
	BRS Pérola	0,49Ab	0,71Aa	31,0
	FTS Soberano	0,37Bb	0,64Ba	42,2
	IPR Campos Gerais	0,38Bb	0,69Aa	44,9
	IPR Tangará	0,32Bb	0,65Ba	50,8
	IPR Tuiuiú	0,36Bb	0,77Aa	53,2
	IPR Uirapurú	0,45Ab	0,67Ba	32,8
	TAA Dama	0,21Cb	0,63Ba	66,7
	Média	0,35b	0,67a	47,8

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo / Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A área foliar dos genótipos de feijoeiro comum testados sofreu variação de 24 a 67% no grau de suscetibilidade em função da inoculação com isolados de *M. phaseolina*. A inoculação do patógeno proporcionou redução percentual de 49,9% na área foliar das plantas infectadas. As cultivares mais suscetíveis foram: BRS Esteio e TAA Dama, reduzindo a produção de AF em 65,0 e 67,4% quando comparadas à plantas sadias. A cultivar FTS Soberano não sofreu redução de AF significativa, sendo a única, dentre as testadas, a não apresentar efeito negativo após inoculação com isolados do patógeno (Tabela 31).

Tabela 31 – Área foliar (AF) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
AF (cm <sup>2</sup> .planta <sup>-1</sup> )	ANFC-9	41,6Cb	74,6Ba	44,2
	BRS Esteio	31,7Db	90,6Aa	65,0
	BRS Estilo	52,2Bb	83,7Ba	37,6
	BRS Pérola	69,1Ab	104,1Aa	33,7
	FTS Soberano	60,1Aa	79,4Ba	24,4
	IPR Campos Gerais	51,5Bb	91,1Aa	43,5
	IPR Tangará	38,8Cb	84,3Ba	53,9
	IPR Tuiuiú	50,2Bb	102,4Aa	51,0
	IPR Uirapurú	62,5Ab	95,0Aa	34,2
	TAA Dama	26,5Db	81,1Ba	67,4
	Média	48,4b	88,6a	49,9

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo / Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

#### 4.4.2 Subprojeto II

Os resultados da análise de variância para as avaliações: número de vagens por planta (NVP); número de grãos por planta (NGP); massa de grãos por planta (MGP) e massa seca radicular (MSR), de dez genótipos de feijoeiro comum, realizadas no experimento são apresentados na tabela 32.

Tabela 32 - Resumo da análise de variância para os fatores de variação (FV): número de vagens por planta (NVP); número de grãos por planta (NGP); massa de grãos por planta (MGP) e massa seca radicular (MSR), avaliados na cultura do feijoeiro comum em função de isolados de *Macrophomina phaseolina* e cultivares. UDESC, Lages/SC, 2018.

FV	NVP <sup>1</sup>	NGP <sup>2</sup>	MGP <sup>3</sup>	MSR <sup>4</sup>
Isolado (I)	0,02 <sup>NS</sup>	3,40*	0,93 <sup>NS</sup>	61,15*
Cultivar (C)	4,94*	9,96*	8,73*	25,71*
I x C	0,89 <sup>NS</sup>	2,54*	2,08*	6,25*
C.V. (%)	14,17	14,21	15,39	19,58

Fonte: Elaborada pelo autor

<sup>1</sup>Número de vagens por planta; <sup>2</sup>Número de grãos por planta; <sup>3</sup>Massa de grãos por planta; <sup>4</sup>Massa seca radicular; \*Significativo a 5% de probabilidade de erro; <sup>NS</sup> não significativo., 2018.

O fator de variação isolado (I) apresentou significância estatística para os parâmetros NGP e MSR. No entanto, as variáveis NVP e MGP não apresentaram este comportamento, demonstrando não haver diferença de agressividade entre os isolados testados.

O número de grãos por planta (NGP) foi afetado pela presença do fungo *M. phaseolina* em diferentes graus de agressividade. Os isolados MEMR31 e MEMR57, não diferindo entre si, foram os responsáveis pela menor produção de grãos por planta. O MEMR89, diferindo destes e também da testemunha sem inóculo foi o menos agressivo (Tabela 33).

A massa seca radicular foi o parâmetro avaliado que mais sofreu redução devido à infecção causada pelo patógeno, em média plantas inoculadas produziram 1,31 gramas de massa seca a menos por raiz em relação a plantas sadias, em termos percentuais essa redução remete a 54,3%, indicando suscetibilidade dos genótipos à *M. phaseolina*. Dentre os isolados utilizados, o MEMR31 e o MEMR57, não diferindo entre si, foram os mais agressivos. Em média, plantas inoculadas com estes isolados produziram 0,94 gramas de massa seca radicular, enquanto plantas inoculadas com o MEMR89, diferindo-se dos demais isolados e da testemunha, produziram 1,41g (Tabela 33).

Os isolados utilizados neste experimento são originários de regiões tropicais e subtropicais do Brasil. Muñoz-Cabañas et al. (2005), observaram que isolados provenientes

de regiões tropicais e subtropicais do México, apresentaram maior agressividade a cultivares de feijoeiro, entre outras culturas, em comparação a isolados provenientes de regiões áridas do país. Muitos autores relatam a significativa variabilidade genética de *M. phaseolina*, tanto para isolados provenientes do mesmo hospedeiro quanto para hospedeiros diferentes, explicando as diferenças encontradas entre os isolados MEMR31 (feijão) e MEMR57 (soja) comparadas com o MEMR89 (milho) (ALMEIDA et al., 2003; PRABHU et al., 2012; SARKAR; MANDAL, 2015; SEXTON et al., 2016; SÁNCHEZ et al., 2017). Observou-se também que os isolados MEMR31 (feijão) e MEMR57 (soja) não diferindo significativamente, apresentaram maior agressividade para a variável MSR em comparação ao isolado MEMR89 (milho), sugerindo a existência de semelhança na agressividade dos isolados a partir da mesma família botânica (uma vez que feijão e soja pertencem à família Fabaceae), além disso, estes resultados demonstram a diferença de agressividade na população do fungo.

Apesar do fator isolado (I) não diferir estatisticamente nos parâmetros NVP e MGP, observou-se, na média dos três isolados, redução de 7,6% no número de vagens por planta e 12,4% na massa dos grãos por planta em comparação às devidas testemunhas sem inóculo (Tabela 33).

Tabela 33 – Número de vagens por planta (NVP), número de grãos por planta (NGP), massa de grãos por planta (MGP) e massa seca radicular (MSR) de plantas de feijoeiro comum em função da origem de isolados de *Macrophomina phaseolina*. UDESC, Lages/SC, 2018.

Isolado	NVP (vagens.planta <sup>-1</sup> )	NGP (grãos.planta <sup>-1</sup> )	MGP (g.planta <sup>-1</sup> )	MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )
MEMR31	14,11B	56,14C	13,40B	0,94C
MEMR57	14,16B	56,50C	13,59B	0,95C
MEMR89	14,22B	60,45B	14,03B	1,41B
Média <sup>1</sup>	14,16	57,70	13,67	1,10
Testemunha	15,32A	64,82A	15,61A	2,41A
Redução <sup>2</sup> (%)	7,6	11,0	12,4	54,4

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Média geral dos três isolados; <sup>2</sup>Redução:  $100 - [(Média^1 / Testemunha) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Todas as variáveis analisadas diferiram estatisticamente para o fator cultivar (C). Neste caso, foram levadas em consideração as características produtivas de cada cultivar, apesar disso, a infecção causada pelo fungo *M. phaseolina* afetou os componentes do rendimento avaliados em diferentes graus de intensidade.

Não há diferença estatística entre os isolados testados para o parâmetro NVP. Analisando separadamente as plantas inoculadas e não inoculadas, observou-se que o NVP não diferiu estatisticamente nas plantas que não receberam inoculação. No entanto, nas inoculadas, observou-se comportamento distinto entre dois grupos. As cultivares: ANFC-9, BRS Estilo, BRS Pérola, IPR Campos Gerais, IPR Tuiuiú e IPR Uirapurú, apresentaram maior produção de vagens por planta em comparação às cultivares BRS Esteio, FTS Soberano, IPR Tangará e TAA Dama. A única cultivar que sofreu influência significativa da inoculação com *M. phaseolina*, foi a IPR Tangará, com redução percentual de NVP de 24,6% em relação à testemunha sem inóculo sendo considerada para este parâmetro a cultivar mais suscetível ao patógeno (Tabela 34).

Tabela 34 – Número de vagens por planta (NVP) de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
NVP (vagens.planta <sup>-1</sup> )	ANFC-9	14,58Aa	16,12Aa	9,5
	BRS Esteio	12,96Ba	13,87Aa	6,6
	BRS Estilo	14,37Aa	14,12Aa	-1,8
	BRS Pérola	14,87Aa	16,75Aa	11,2
	FTS Soberano	12,83Ba	15,37Aa	16,5
	IPR Campos Gerais	16,75Aa	16,75Aa	0,0
	IPR Tangará	11,96Bb	15,87Aa	24,7
	IPR Tuiuiú	14,50Aa	14,37Aa	-0,9
	IPR Uirapurú	15,46Aa	16,50Aa	6,3
	TAA Dama	13,37Ba	13,50Aa	1,0
	Média	14,16a	15,32a	7,6

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo / Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

As cultivares de feijoeiro comum testadas apresentaram significância para a variável NGP. Novamente foi levada em consideração as características produtivas de cada cultivar. No entanto, observou-se que plantas inoculadas produziram 11% menos grãos que plantas não inoculadas. As cultivares não inoculadas que mais produziram grãos foram: BRS Esteio (81,7 grãos.planta<sup>-1</sup>) e IPR Uirapurú (79,1 grãos.planta<sup>-1</sup>), diferindo-se das demais. Dentre as inoculadas, somente a cultivar IPR Uirapurú diferiu-se das demais, porém, também sofreu redução no NGP (7,1%). A cultivar BRS Esteio apresentou o maior valor percentual de redução deste parâmetro, 23,5% em relação à testemunha sem inóculo (Tabela 35).



Tabela 35 – Número de grãos por planta (NGP) de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
NGP (grãos.planta <sup>-1</sup> )	ANFC-9	57,21Cb	64,25Ba	11,0
	BRS Esteio	62,50Bb	81,75Aa	23,5
	BRS Estilo	55,87Ca	52,50Ca	-6,4
	BRS Pérola	56,25Cb	68,87Ba	18,3
	FTS Soberano	51,00Db	63,62Ba	19,8
	IPR Campos Gerais	61,71Ba	59,87Ca	-3,1
	IPR Tangará	45,25Db	58,12Ca	22,1
	IPR Tuiuiú	58,79Ca	65,37Ba	10,1
	IPR Uirapurú	73,46Aa	79,12Aa	7,1
TAA Dama	54,92Ca	54,75Ca	-0,3	
	Média	57,69a	64,82a	11,0

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo / Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A massa de grãos (MGP) também apresentou significância para o fator cultivar. Em média, plantas inoculadas produziram 12,4% menos massa de grãos por planta em relação a plantas não inoculadas. Dentre as cultivares inoculadas, a cultivar FTS Soberano foi a que demonstrou menores valores para MGP (10,21 g.planta<sup>-1</sup>), diferindo-se das demais. No entanto, quando esta cultivar não foi inoculada, apresentou 12,36 g.planta<sup>-1</sup> não diferindo das cultivares IPR Tuiuiú (13,39 g.planta<sup>-1</sup>) e TAA Dama (14,79 g.planta<sup>-1</sup>). Todas as cultivares apresentaram grau na redução de MGP, variando de 1,8 a 24,2%. A cultivar IPR Tangará sofreu redução de 24,2%, sendo considerada a mais suscetível para este parâmetro (Tabela 36).

Tabela 36 – Massa de grãos por planta (MGP) de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
MGP (g.planta <sup>-1</sup> )	ANFC-9	14,35Ba	15,73Aa	8,8
	BRS Esteio	13,54Bb	17,63Aa	23,2
	BRS Estilo	16,16Aa	16,45Aa	1,8
	BRS Pérola	13,26Bb	16,32Aa	18,8
	FTS Soberano	10,21Da	12,36Ba	17,4
	IPR Campos Gerais	15,12Aa	15,63Aa	3,3
	IPR Tangará	12,86Cb	17,01Aa	24,2
	IPR Tuiuiú	11,68Ca	13,39Ba	12,8
	IPR Uirapurú	15,48Aa	16,83Aa	8,0
TAA Dama	14,06Ba	14,79Ba	4,9	
	Média	13,67a	15,61a	12,4

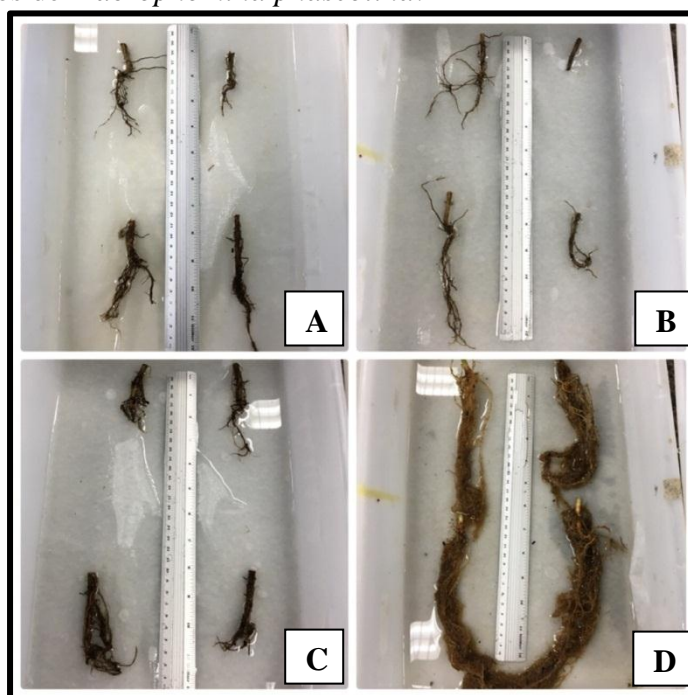
Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo / Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

A massa seca radicular apresentou significância para o fator cultivar. Em geral, plantas inoculadas com *M. phaseolina* apresentaram redução de 54,3% na massa seca de raízes. A redução deste parâmetro ocorreu em todas as cultivares, em diferentes graus de intensidade, variando de 34,0 a 70,0%. A cultivar BRS Esteio apresentou a maior redução de MSR, 70,0% em relação à testemunha sem inóculo (Figura 9). A cultivar IPR Uirapurú, em contrapartida apresentou a menor redução, 34,0% (Tabela 37).

Foram observadas lesões negras longitudinais no tecido radicular e nas hastes das plantas infectadas, com produção de micélio escuro e microescleródios. Além disso, as raízes infectadas apresentaram menor tamanho aparente e desconstituídas de raízes secundárias. Os sintomas observados conferem com os descritos para podridão cinzenta da raiz por Méndez-Aguilar et al. (2013). Todas as raízes inoculadas com *M. phaseolina* apresentaram sinais de infecção (Figura 9). Foi constatada a partir de microscópio eletrônico, a formação de microescleródios no tecido radicular das plantas de feijoeiro infectadas. A taxa de crescimento dos genótipos de feijoeiro testados diferiu, apresentando comportamento distinto se tratando de floração, senescência foliar e morte de plantas. Em geral, plantas inoculadas com *M. phaseolina* apresentaram queda prematura de folhas e maturação precoce, resultando na morte da planta (Figura 10).

Figura 9 – Detalhes de raízes de feijoeiro comum, cultivar BRS Esteio, com inoculação de isolados de *Macrophomina phaseolina*.

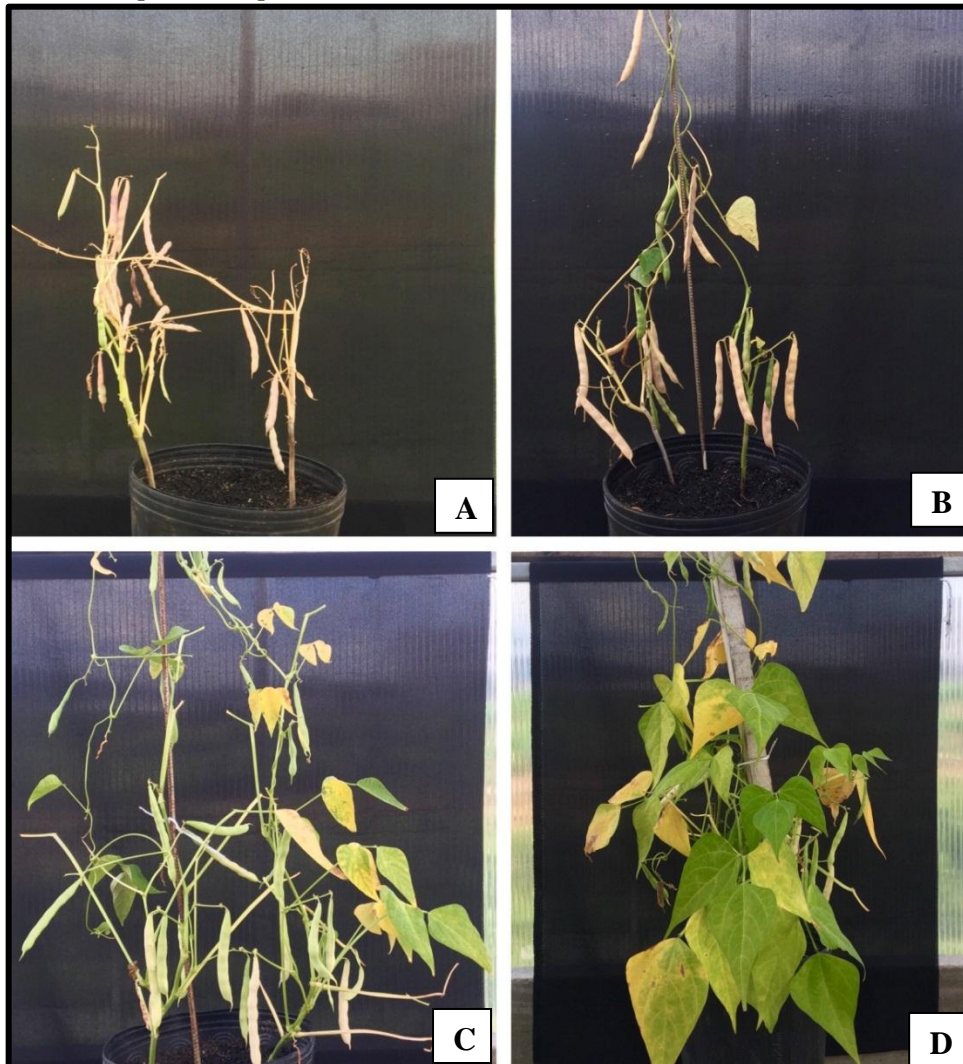


Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

A: Raízes inoculadas com o isolado MEMR31; B: Raízes inoculadas com o isolado MERM57; C: Raízes inoculadas com o isolado MERM89; D: Raízes não inoculadas.

Variação na resposta de genótipos de feijoeiro à *M. phaseolina* é comumente observada por pesquisadores que trabalham neste patossistema. Mayék-Pérez et al. (2001b), relatam que a diferença na produção de grãos ou sementes, está estreitamente relacionada aos níveis de dano causados pelo patógeno, fator este, que se relaciona com a estrutura genética e capacidade patogênica das populações dos isolados fúngicos. Em outros casos, o comportamento depende do grau de adaptação do genótipo a este patógeno.

Figura 10 - Plantas de feijoeiro comum, cultivar TAA Dama, próximas ao estágio de maturação fisiológica R9, apresentando sintoma secundário caracterizado por queda precoce de folhas (A, B e C), depois de inoculadas com isolados de *Macrophomina phaseolina*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

A: Plantas cultivadas em solo inoculado com o isolado MERM31; B: Plantas cultivadas em solo inoculado com o isolado MERM57; C: Plantas cultivadas em solo inoculado com o isolado MERM89; D: Plantas cultivadas em solo não inoculado;

Tabela 37 – Massa seca radicular (MSR) de plantas de feijoeiro comum submetidas, ou não, à inoculação com isolados de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.

Variável	Cultivares	Com inóculo	Sem inóculo	Redução <sup>1</sup>
MSR (g.raiz <sup>-1</sup> )	ANFC-9	0,69Db	1,34Ea	48,5
	BRS Esteio	1,42Bb	4,74Aa	70,0
	BRS Estilo	1,33Bb	2,70Ca	50,7
	BRS Pérola	1,15Cb	3,33Ba	65,5
	FTS Soberano	1,14Cb	2,50Ca	54,4
	IPR Campos Gerais	0,77Db	1,20Ea	35,8
	IPR Tangará	1,14Cb	2,00Da	43,0
	IPR Tuiuiú	1,05Cb	1,93Da	45,6
	IPR Uirapurú	1,63Ab	2,47Ca	34,0
	TAA Dama	0,69Db	1,89Da	63,5
	Média	1,10b	2,41a	54,4

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

<sup>1</sup>Redução (%):  $100 - [(Com\ inóculo / Sem\ inóculo) * 100]$ ; Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O parâmetro avaliado NGP apresentou significância para a interação entre isolado (I) e cultivar (C). Os isolados MEMR31 e o MEMR57, iguais entre si, diferiram estatisticamente do MEMR89. Todos os isolados diferiram da testemunha sem inóculo.

Em geral, plantas inoculadas com o MEMR89 produziram em média, 4,31 e 3,95 grãos a mais que plantas inoculadas com os isolados MEMR31 e MEMR57, estes valores em porcentagem representam 7,1 e 6,5%, respectivamente (dados não mostrados).

O comportamento geral das cultivares em relação aos isolados foi similar, diferindo apenas para a BRS Esteio, a mais suscetível ao MEMR31. Nesta cultivar os demais isolados também diferiram entre si. O MEMR89 apresentou menor agressividade (Tabela 38).

Tabela 38 - Desdobramento da análise de variância para número de grãos por planta (NGP: grãos.planta<sup>-1</sup>) de feijoeiro comum em função de isolados de *Macrophomina phaseolina* e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

Cultivar	Isolados			
	MEMR31	MEMR57	MEMR89	
ANFC-9	60,12Aa	50,37Ba	61,12Ca	
BRS Esteio	46,00Bc	62,87Ab	78,62Aa	
BRS Estilo	54,62Aa	54,50Ba	58,50Ca	
BRS Pérola	59,25Aa	56,37Ba	53,12Ca	
FTS Soberano	50,87Ba	55,75Ba	46,37Da	
IPR Campos Gerais	64,50Aa	55,87Ba	64,75Ba	
IPR Tangará	40,12Ba	50,75Ba	44,87Da	
IPR Tuiuiú	56,62Aa	54,25Ba	65,50Ba	
IPR Uirapurú	71,75Aa	73,12Aa	75,50Aa	
TAA Dama	57,50Aa	51,12Ba	56,12Ca	
	Média	56,1b	56,5b	60,4a

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O parâmetro analisado MGP apresentou significância para a interação entre isolado (I) e cultivar (C). Em média, os isolados não diferem entre si estatisticamente, porém, estes apresentaram diferença no comportamento das cultivares BRS Esteio e IPR Tangará. Para a BRS Esteio os três isolados demonstraram contraste significativo de agressividade, sendo o MEMR31 o mais agressivo e o MEMR89 o menos. Para a cultivar IPR Tangará, os isolados MEMR31 e MEMR89 não diferiram entre si e foram mais agressivos que o MEMR57 (Tabela 39).

Tabela 39 - Desdobramento da análise de variância para massa de grãos por planta (MGP: g.planta<sup>-1</sup>) de feijoeiro em função de isolados de *Macrophomina phaseolina* e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

Cultivar	Isolados		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
ANFC-9	15,26Aa	12,57Ba	15,22Aa
BRS Esteio	9,87Bc	13,74Ab	17,02Aa
BRS Estilo	16,71Aa	16,25Aa	15,53Aa
BRS Pérola	14,00Aa	13,04Ba	12,74Ba
FTS Soberano	9,86Ba	10,99Ba	9,78Ba
IPR Campos Gerais	15,58Aa	13,98Aa	15,79Aa
IPR Tangará	11,43Bb	14,92Aa	12,24Bb
IPR Tuiuiú	11,25Ba	11,35Ba	12,42Ba
IPR Uirapurú	15,18Aa	15,39Aa	15,89Aa
TAA Dama	14,84Aa	13,70Aa	13,62Ba
Média	13,4a	13,6a	14,0a

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Foi observada interação entre os fatores isolado (I) e cultivar (C) para a variável MST. Os isolados MEMR31 e MEMR57 apresentaram maior agressividade para este parâmetro, diferindo-se do MEMR89. Em média, plantas inoculadas com o isolado MEMR89 produziram 0,47 gramas de massa seca radicular a mais que plantas inoculadas com os isolados MEMR31 e MEMR57. As cultivares ANFC-9, BRS Estilo e IPR Campos Gerais não apresentaram alteração de comportamento na transição entre isolados. O MEMR89 foi menos agressivo para as cultivares BRS Pérola, FTS Soberano, IPR Tangará, IPR Tuiuiú e TAA Dama. Para as cultivares BRS Esteio e IPR Uirapurú o MEMR31 foi o mais agressivo (Tabela 40).

Tabela 40 - Desdobramento da análise de variância para massa seca radicular (MSR: g.raiz<sup>-1</sup>) de plantas de feijoeiro em função de isolados de *Macrophomina phaseolina* e cultivares, UDESC, Lages/SC, 2018.

Cultivar	Isolados		
	MEMR31	MEMR57	MEMR89
ANFC-9	0,88Ba	0,51Da	0,68Da
BRS Esteio	1,12Ab	1,54Aa	1,62Ba
BRS Estilo	1,28Aa	1,31Ba	1,40Ba
BRS Pérola	0,80Bb	0,62Db	2,01Aa
FTS Soberano	1,10Ab	0,72Dc	1,61Ba
IPR Campos Gerais	0,72Ba	0,62Da	0,95Ca
IPR Tangará	0,68Bc	1,14Bb	1,61Ba
IPR Tuiuiú	0,90Bb	0,94Cb	1,31Ba
IPR Uirapurú	1,32Ab	1,72Aa	1,86Aa
TAA Dama	0,63Bb	0,40Db	1,04Ca
Média	0,94b	0,95b	1,41a

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e minúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O parâmetro SPR não foi analisado estatisticamente devido à falta de variância entre os dados. Todos os tratamentos resultaram em avaliações de severidade cujos valores foram superiores a 75%, indicando segundo escala proposta por Abawi & Pastor-Corrales (1990), intensidade severa (75-100%). Desta forma, para a avaliação de severidade da podridão radicular, todas as cultivares testadas neste experimento foram consideradas suscetíveis à inoculação de *M. phaseolina* (Tabela 33). O resultado observado para este parâmetro comprova a eficácia do método de inoculação utilizado para infecção do patógeno em plantas de feijoeiro, podendo este ser utilizado em futuros ensaios cuja finalidade seja avaliação de genótipos resistentes à *M. phaseolina*.

Tabela 41 – Severidade de podridão cinzenta da raiz (SPD), causada por *Macrophomina phaseolina* em raízes de cultivares de feijoeiro comum, UDESC, Lages/SC, 2018.

Cultivares	Severidade (%)	Reação
ANFC-9	75-100	Suscetível
BRS Esteio	75-100	Suscetível
BRS Estilo	75-100	Suscetível
BRS Pérola	75-100	Suscetível
FTS Soberano	75-100	Suscetível
IPR Campos Gerais	75-100	Suscetível
IPR Tangará	75-100	Suscetível
IPR Tuiuiú	75-100	Suscetível
IPR Uirapurú	75-100	Suscetível
TAA Dama	75-100	Suscetível

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Ao avaliar 13 genótipos de feijoeiro (branco e colorido) Maringoni & Lauretti (1999) detectaram 12 suscetíveis e apenas um (PI175829 branco) como resistente, todos os acessos

no presente experimento foram considerados suscetíveis, com severidade acima de 75% a nível radicular. Mayék-Pérez et al. (2001b), não encontraram nenhum genótipo resistente à *M. phaseolina*, entre os 64 avaliados a campo no México, porém alguns acessos demonstraram aceitáveis níveis de resistência. Em experimento a campo, foi avaliada a incidência de *M. phaseolina* em sete genótipos de feijoeiro comum e foi observado médias de 5,8 a 11,3% de incidência. Dentre os genótipos testados pelos autores, o FTS Soberano apresentou incidência de 11%, sendo o segundo a apresentar maior incidência de *M. phaseolina* (GARCÉS-FIALLOS; GAMARRA-YÁNEZ, 2014). Os autores ainda sugerem que a alta susceptibilidade verificada nos genótipos testados se deve a inexistência de resistência nos seus progenitores.

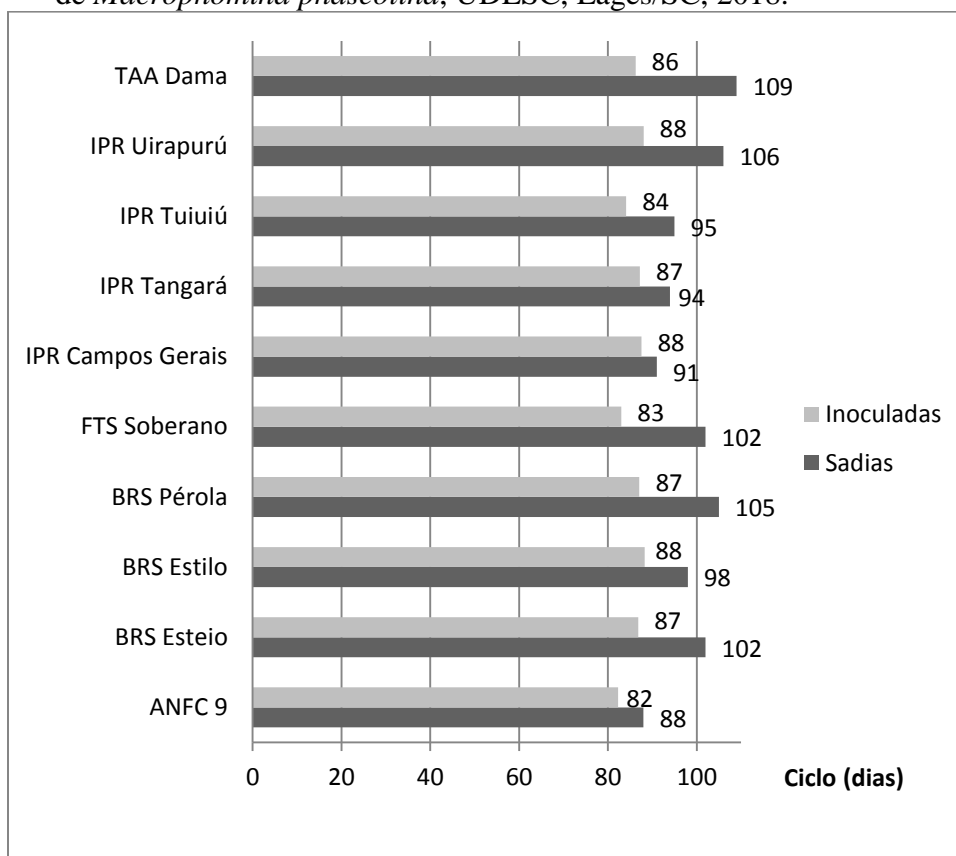
Resultados de severidade acima de 75% no experimento podem ser explicados pela condição de inoculação do mesmo. Mayék-Pérez et al. (2001b), observaram maior severidade da doença em cultivares de feijão quando inoculadas artificialmente em casa de vegetação quando comparada às condições de campo. As avaliações em casa de vegetação tendem a oferecer condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, tais como, alto nível de inóculo e pressão de seleção uniforme, o que favorece a expressão da reação do genótipo testado, condições estas que não são facilmente aplicáveis a campo, conferindo discrepância nos resultados obtidos nestas duas condições. Uma alternativa neste caso seria trabalhar com menor potencial de inóculo, diminuindo a concentração inoculada do patógeno por unidade amostral, simulando com mais coerência a realidade encontrada a campo.

Experimentos objetivando a inoculação de plantas com *M. phaseolina* devem seguir tendências naturais, assim, devendo ser utilizado solos naturalmente infestados pelo patógeno e com preservação de suas características físico-químicas. A alteração das propriedades do solo pode influenciar a capacidade de inoculação do substrato pelo patógeno (Dhingra et al., 1976). Além disso, os autores observaram correlação significativa entre a diminuição de matéria orgânica do solo e acréscimo no desenvolvimento do patógeno. Além disso, Mihail & Alcorn, (1982), observaram redução na concentração de inóculo quando solo artificialmente infestado foi misturado a areia esterilizada. No presente experimento foi utilizado mistura de areia e substrato, o que proporcionou diminuição da matéria orgânica da mistura final, favorecendo o crescimento de *M. phaseolina* e por outro lado, diminuindo a concentração de inóculo.

A redução no ciclo observado para os genótipos testados variou de 3 a 23 dias dependendo da cultivar. A cultivar que antecipou mais seu ciclo devido à infecção pelo patógeno foi a TAA Dama, 23 dias em relação à testemunha sem inóculo (Figura 11). Este

comportamento não é atípico, Short et al. (1978) e também Pearson et al. (1984), observaram desenvolvimento similar da doença na cultura da soja. Em geral, plantas inoculadas com isolados de *M. phaseolina* apresentaram 13 dias a menos no ciclo de vida, em relação às testemunhas não inoculadas.

Figura 11 – Ciclo médio das cultivares de feijoeiro comum em função da inoculação, ou não, de *Macrophomina phaseolina*, UDESC, Lages/SC, 2018.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Todos os genótipos testados foram considerados suscetíveis à podridão cinzenta da raiz causada por *Macrophomina phaseolina*, reduzindo a massa seca radicular das plantas de feijoeiro comum.

A infecção de *Macrophomina phaseolina* em planta de feijoeiro comum é capaz de reduzir número de vagens por planta, número de grãos por planta e massa de grãos por planta, em diferentes graus de intensidade, dependendo do genótipo utilizado.



A infecção de plantas de feijoeiro por *Macrophomina phaseolina* ocorreu independente da origem do isolado testado, porém o MEMR31 e o MEMR57 apresentaram maior agressividade em relação ao MEMR89.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Testando métodos de inoculação de um dos principais patógenos associados à podridão radicular nas culturas de lavoura do Brasil, avaliando a reação de genótipos de feijoeiro comum à severidade de podridão cinzenta de raiz e também estudando as relações de infecção cruzada de *M. phaseolina* nestas culturas, avaliando a possibilidade e efetividade no controle pela rotação de culturas, houve a comprovação do potencial de um dos métodos e sua aplicabilidade em ensaios de reação à doença. Todavia, os resultados apontam para a capacidade de infecção cruzada dos isolados do fungo nas espécies testadas, o que implica diretamente na ineficiência da rotação e sucessão de culturas com a soja, milho e feijão.

O controle genético através do uso de cultivares com grau de resistência é a melhor opção para manejo do patógeno, todavia, este estudo aponta grau de suscetibilidade de diferentes genótipos em relação à infecção poro *M. phaseolina*, porém sem resultados positivos quanto à obtenção de genótipos resistente.

Estudos que busquem quantificar os danos ao rendimento das culturas causados por *M. phaseolina* se fazem necessários. Experimentos com este objetivo, a campo, tem enorme dificuldade visto que o patógeno geralmente não ocorre de forma isolada, e sim, associado à outros fungos que também são capazes de afetar o sistema radicular das plantas. Todavia, experimentos em casa de vegetação apontam resultados confiáveis e promissores, e estes devem ser incentivados principalmente para a cultura do milho, visto que pesquisadores tratam a podridão cinzenta da raiz, ou da base do colmo, nesta cultura como de aspecto secundário ou de menor importância.

De toda forma, o presente trabalho tentou elucidar um pouco mais sobre um dos patógenos de difícil manejo integrado. Espera-se que futuros projetos sejam derivados e que a compreensão da melhor forma de manejo da podridão cinzenta da raiz seja obtida.



## REFERÊNCIAS

- ABAWI, G.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies**. Cali: CIAT, 114 p., 1990.
- ABOSHOSHA, S. S.; ALLA, S. I. A.; EL-KORANY, A. E. & EL-ARGAWI, E. Characterization of *Macrophomina phaseolina* Isolates Affecting Sunflower Growth in El-Behera Governorate, Egypty. **International Journal of Agriculture & Biology**, El-Shatby, v.9, p. 807-815, 2007.
- AL-AHMADI, A. H.; SUBEDI, A.; WANG, G.; CHOUDHARY, R.; FAKHOURY, A. & WATSON, D. Detection of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) toxin effects in soybean (*Glycine max*) seedlings using hyperspectral spectroscopy. **Computers and electronics in Agriculture**, v.150, p.188-195, 2018.
- ALMEIDA, A.M.R.; ABDELNOOR, R.V., ARIAS; C.A.A., CARVALHO; V.P, JACOUD FILHO; D.S., MARIN, S.R.R.; BENATO, L.C., PINTO, M.C. & CARVALHO, C.G.P. Genotypic diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 279-285, 2003.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M. & MEYER, M. C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. **A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronomia Ceres, cap.64, p.642-664, 2005.
- ALMEIDA, A. M. R.; SOSA-GOMEZ, D. R.; BINNECK, E.; MARIM, S. R. R.; ZUCCHI, M. I.; ABDELNOOR, R. V. & SOUTO, E. R. Effect of crop rotation on specialization and genetic diversity of *Macrophomina phaseolina*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 257-264, 2008.
- ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S. **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 399 p., 2010.
- ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N. de; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M. da; GAUDÊNCIO, C. de A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 55 p, 2014.
- ASHRAF, W.; SHAHBAZ, T. S.; IMRAN, ul H. & AHMED, S. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with maize (*Zea*

mays) in Punjab-Pakistan. **International Journal of Agriculture & Biology**. Faisalabad, v.17, p. 1037-1042, 2015.

AYANRU, D. K. G. & GREEN, R. J. Jr. Alteration of germination patterns of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* on soil surfaces. **Phytopathology**, v.64, p. 595-601, 1974.

BAIRD, R. E.; WATSON, C. E. & SCRUGGS, M. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. **Plant Disease**, v. 87, p. 563-566, 2003.

BARNARD, E. L. & GILLY, S. P. Charcoal root rot of pines. **Plant Pathology**, n. 290, 1986.

BIANCHI, A.; MARINGONI, A. C. & CARNEIRO, B. M. S. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronomia Ceres, cap.34, p.354-377, 2005.

BIGOTES, A. G.; GALINDO, G. I. E.; DELGADO, P. S.; VILLANUEVA, J. C.; STOWASER, E. S. von & ZAROR, R. H. Eventos tempranos en el proceso de infección de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. em raíces de plântulas de *Pinus radiata* D. Don y sus efectos em la eficiencia fotosintética como indicador de estrés biótico. **Gayana Botánica**, v.73, n.2, p. 430-437, 2016.

BOARETTO, C. & DANELLI, A.L.D. Podridão cinzenta da raiz. In: REIS, E. M.; CASA, R. T. **Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado**. Passo Fundo: Berthier, p. 281-296, 2012.

CAMPOS, A. A. B.; SCOTTON, J. C.; COSTA, W. L. F.; GIASSI, V.; PINTO, D. F. P.; HOMMA, S. K. Seleção de fungicidas visando à preservação de fungos micorrízicos arbusculares nativos no cultivo do feijoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 9, p. 898-902, 2015.

CANADAY, C. H.; HELSEL, D. G. & WYLLIE, T. D. Effects of herbicide-induced stress on root colonization of soybeans by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v.70, n.9, p. 863-866, 1986.

CASA, R. T.; KRIEGER, I. JUNIOR, P. R. K.; BOGO, A.; MOREIRA, E. N. & RIZZI, F. P. Podridão radicular em feijão no sistema plantio direto. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 10, n.1, 2011.

CLAUDINO, M. R. & SOARES, D. J. Pathogenicity and aggressiveness of *Macrophomina phaseolina* isolates to castor (*Ricinus communis*). **Tropical Plant Pathology**, v.39, n.6, p. 453-456, 2014.

CLOUD, G. L. & RUPE, J. C. Morphological instability on a chrolate medium of isolates of *Macrophomina phaseolina* from soybean and sorghum. **Ecology and Epidemiology**, v. 81, p. 892-895, 1991a.

CLOUD, G. L. & RUPE, J. C. Comparison of three media for enumeration of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 75, p. 771-772, 1991b.

COMISSÃO DE QUIMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 11. Ed. Porto Alegre, 375 p., 2016.,

CONAB, **Acompanhamento da safra brasileira de Grãos**, v. 5, Safra 2017/18 – Nono levantamento, Brasília, p. 1-178, jun., 2018.

COOK, G. E.; BOOSALIS, M. G.; DUNKLE, L. D. & ODVODY, G. N. Survival of *Macrophomina phaseoli* in corn and sorghum stalk residue. **Plant Disease**, v.57, p. 873-875, 1973.

COSER, S. M.; REDDY, V. C.; ZHANG, J.; MUELLER, D. S.; MENGISTU, A.; WISE, K. A.; ALLEN, T. W.; SINGH, A. & SINGH, A. K. Genetic architecture of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance in soybean revealed using a diverse panel. **Frontiers in Plant Science**, v.8, 2017.

CRUCIOL, G. C. D. & COSTA, M. L. N. Influência de inoculação de *Macrophomina phaseolina* no desempenho de cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p. 32-37, 2018.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. da. Doenças causadas por fungos: Diagnose e epidemiologia. In: DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. da. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa, PR: Editora UEPG, p. 47-116, 2010.

DHINGRA, O. D.; TENNE, F. D. & SINCLAIR, J. B. Method for the determination of competitive saprophytic colonization of soil fungi. **Transactions of British Mycological Society**, v. 66, n.3, p. 447-456, 1976.

DHINGRA, O. D. & SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa, MG: Imprensa universitária Universidade Federal de Viçosa, 166 p., 1978.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DUBEY, R. C.; KUMAR, H. & PANDEY, R. R. Fungitoxic effect of Neem extracts on growth and sclerotial survival of *Macrophomina phaseolina in vitro*. **Journal of American Science**, New Haven, v. 5, n. 5, p. 17-24, 2009.

FAO. The food systems of the future need to be smarter, more efficient. Janeiro, 2017. Disponível em:<<http://www.fao.org/news/story/en/item/275009/icode/>>. Acesso em: 05 de maio de 2018.

FAO. Brasil será um dos maiores exportadores de alimentos, Setembro, 2016. Disponível em:<<http://www.fao.org/news/story/en/item/275009/icode/>>. Acesso em: 05 de maio de 2018.

FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S. & ALMEIDA, A. M. R. Doenças da soja no Brasil. Londrina, PR, EMBRAPA-CNPSo, 1979.

FRANCL, L. J.; WYLLIE, T. D. & ROSENBROCK, S. M. Influence of crop rotation on population density of *Macrophomina phaseolina* in soil infested with *Heterodera glycines*. **Plant Disease**, v. 72, p. 760-764, 1988.

GANGOPADHYAY, S.; WYLLIE, T. D. & LUEDDERS, V. D. Charcoal rot disease of soybean transmitted by seeds. **Plant Disease**, v.54, p. 1088-1091, 1970.

GARCÉS-FIALLOS, F. R. Cuantificación de enfermedades en líneas promisoras y variedades de fréjol en Quevedo, Ecuador. **Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial**, v. 11, n. 1, p. 196-207, 2013.

GARCÉS-FIALLOS, F. R. & GAMARRA-YÁNEZ, H. V. Intensidade de doenças e produtividade de genótipos promissores de feijão em Quevedo, Equador. **Bioscience journal**, v. 30, n.5, p. 1291-1303, 2014.

GEPTS, P. & FERNÁNDES, F. Desarrollo de la planta de frijol comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali. Colombia, CIAT, 10 p., 1982.



GILL-LANGARICA, H. R.; MALDONADO-MORENO; PECINA-QUINTERO, V. & MAYÉK-PÉREZ, N. Reacción de germoplasma mejorado de soya [*Glycine max* (L.) Merr.] a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich y déficit hídrico. **Revista mexicana de fitopatología**, Taumalipas, 2007.

GUPTA, G. K.; SHAMA, S. K. & RAMTEKE R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 167-180, 2012.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. APS Press. Minnesota.1991.

ISHIKAWA, M.S.; RIBEIRO, N.R.; OLIVEIRA, E.C.; ALMEIDA, A. A. & BALBI-PEÑA, M.I. Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Phytopathologica**, v.43, n.4, p. 38-44, 2018.

JANA, T.; SHARMA, T. R.; PRASAD, R. D. & ARORA, D. K. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. **Microbiological Research**, v. 158, p. 249-257, 2003.

KHAN, A. N.; SHAIR, F.; MALIK, K.; HAYAT, Z. KHAN, M. A.; HAFEEZ, F. Y. & HASSAN, M. N. Molecular identification and genetic characterization of *Macrophomina phaseolina* strains causing pathogenicity on sunflower and chickpea. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 1309, 2017.

KUNWAR, I. K.; SINGH, T.; MACHADO, C. C. & SINCLAIR, J. B. Histopathology of soybean seed and seedling infection by *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v.76, n.5, p.532-535, 1986.

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**, Brasília, v.34, n.4, p.535-542, 1999.

MARTÍNEZ-HILDERS, A. & LAURENTIN, H. Caracterización fenotípica y molecular de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. proveniente de la zona de producción de ajonjolí en Venezuela. **Bioagro**, Barquisimetro, v.24, n.3, p. 187-196, 2012.

MARTÍNEZ-VILLAREAL, R.; GARZA-ROMERO, T. S.; MORENO-MEDINA, V. R.; HERNÁNDEZ-DELGADO, S. & MAYÉK-PÉREZ, N. Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico em hongos fitopatógenos: el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Revista Argentina de Microbiología**, v.48, n.4, p. 347-357, 2016.

MAYÉK-PÉREZ, N.; LÓPEZ-CASTAÑEDA, C.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; GARCIA-ESPINOSA, R.; ACOSTA-GALLEGOS, J. VEGA, O. M. de la & SIMPSON, J. Variability of mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotypes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 257-264, 2001a.

MAYÉK-PÉREZ, N.; LÓPEZ-CASTAÑEDA, C.; LÓPEZ-SALINAS, E.; CUMPIÁN-GUTIÉRREZ, J. & ACOSTA-GALLEGOS, J. A. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol común en condiciones de campo en México. **Agrociencia**, v.35, n.6, p.649-661, 2001b.

MAYÉK-PÉREZ, N.; LÓPEZ-CASTAÑEDA, C.; LÓPEZ-SALINAS, E.; CUMPIÁN-GUTIÉRREZ, J.; JOAQUÍN-TORRES, I. C.; PADILLA-RAMÍREZ, J. S. & ACOSTA-GALLEGOS, J. A. Effect of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. on grain yield of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its relationship with yield stability parameters. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v.21, p. 168–175, 2003.

MAYÉK-PÉREZ, N.; LÓPEZ-SALINAS, E.; CUMPIÁN-GUTIÉRREZ, J.; & ACOSTA-GALLEGOS, J. A. Reacción de germoplasma de frijol común a *Macrophomina phaseolina* en condiciones de riego-secano em Veracruz, México. **Agromía Mesoamericana**. v.15, n.1, p. 45-51, 2004.

MEDEIROS, A. C.; MELO, D. R. M.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; NUNES, G. H. S. & COSTA, J. M. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p. 281-286, 2015.

MÉNDEZ-AGUILAR, R.; REYES-VALDÉS, M. H. & MAYÉK-PÉREZ, N. Avances y perspectivas sobre el mapeo genético de la resistencia a las pudriciones de la raíz en frijol común. **Phyton**, Buenos Aires, v.82, n.2, 2013.

MENGISTU, A.; BOND, J., NELSON, R.; RUPE, J.; SHANNON, G.; ARELLI, P. & WRATHER, A. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. **Plant Health Progress**, v.10, 2013.

MEYER, W. A. SINCLAIR, J. B. & KHARE, M. N. Biology of *Macrophomina phaseoli* in soil studied with selective media. **Phytopathology**, v.63, p.613-620, 1973.

MIHAIL, J. D. & ALCORN, S. M. Quantitative recovery of *Macrophomina phaseolina* sclerotia from soil. **Plant Disease**, v. 66, p. 662-663, 1982.

MUÑOZ-CABAÑAS, R. M.; HERNÁNDEZ-DELGADO, S. & MAYÉK-PÉREZ, N. Análisis patogénico y genético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes hospedantes. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v.23, p. 11-18, 2005.

NDIAYE, M.; TERMORSHUIZEN, A. J. & BRUGGEN, A. H. C. van. Effect of rotation of cowpea (*Vigna unguiculata*) with fonio (*Digitaria exilis*) and millet (*Pennisetum glaucum*) on *Macrophomina phaseolina* densities and cowpea yield. **African Journal of Agricultural Research**, v. 3, n. 1, p. 37-43, 2008.

NETO, A. A. de O. & SANTOS, C. M. R. (orgs.) **A cultura do feijão**, Brasília: CONAB, 2018.

NORONHA, M. de A.; SILVA, K. J. D. e; GONÇALVES, S. R. & LIMA, L. R. L. Avaliação da resistência de genótipos de feijão-caupi a *Macrophomina phaseolina*. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, Aracajú, Comunicado técnico 126, 2012.

ONU. Bioeconomia pode alimentar o mundo e salvar o planeta. Abril, 2018. Disponível em:<<https://nacoesunidas.org/para-fao-bioeconomia-pode-alimentar-o-mundo-e-salvar-o-planeta/>>. Acesso em: 05 de maio de 2018.

PAPAVIZAS, G. C. & KLAG, N. G. Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. **Phytopathology**, v.65, p.182-187, 1975.

PEARSON, C. A. S.; SCHWENK, F. W.; CROWE, F. J. & KELLEY, K. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v.68, n.12, p. 1086-1088, 1984.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho *Zea mays* (L.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronomia Ceres, cap.52, p.501-517, 2005.

PINTO, N. F. J. de A.; FERNANDES, F. T. & OLIVEIRA, E. de. Milho (*Zea mays* L.) Controle de Doenças. In: VALLE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, p. 821-864, 1997.

PRABHU, H. V.; ADIVER, S. S.; BHAT, R.; NARAYANA, Y. D.; JAHAGIRDAR, S. & PARAMESHWARAPPA, K. G. Genetic variability in *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid., causal agent of charcoal rot of sorghum. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 25, n.1, p.72-76, 2012.

PRATT, R. G. A direct observation technique for evaluating sclerotium germination by *Macrophomina phaseolina* and effects of biocontrol materials on survival of sclerotia in soil. **Mycopathologia**, Berkeley, v. 162, p. 121-131, 2006.

RAYATANAH, S. & DALILI, S. A. Diversity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid based on chlorate phenotypes and pathogenicity. **International Journal of Biology**, Theran, v.4, p. 54-63, 2012.

REIS, E.M.; SEGALIN, M.; MORAES, N.L. & GHISSI, V.C. Efeitos da rotação de culturas na incidência de podridões radiciais e na produtividade da soja. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p. 09-15, 2014a.

ROJAS, M. R.; GILBERTSON, R. L.; RUSSELL, D. R. & MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v.77, p. 340-347, 2003.

SALEH, A. A.; AHMED, H. U.; TODD, T. C.; TRAVERS, S. E.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. & GARRETT, K. A. Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. **Molecular Ecology**, Manhattan, p. 79-91. 2010.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.2.700, 2002.

SÁNCHEZ, S.; CHAMORRO, M.; HENRÍQUEZ, J. L.; GREZ, J.; DÍAS, I.; SANTOS, B. de los & GAMBARDELLA, M. Genetic and biological characterization of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causing crown and root rot of strawberry. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.77, n.4, p. 325-331, 2017.

SARKAR, S. K. & MANDAL, D. Variability of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in major jute growing areas of India. **Journal of Micopathological Research**, v.53, n.2, p.283-285, 2015.

SEAB. **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento**: Feijão – Análise da conjuntura agropecuária. Abril, 2016. Disponível em: < <http://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em 05 de maio de 2018.

SEXTON, Z. F.; HUGHES, T. J. & WISE, K. A. Analysing isolate variability of *Macrophomina phaseolina* from a regional perspective. **Crop Protection**, v.81, p.9-13, 2016.

SHOKES, F. M.; LYDA, S. D. & JORDAN, W. R. Effect of water potential on the growth and survival of *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v.67, p. 239-241, 1977.

SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D. & AMMON, V. D. Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. **Phytopathology**, v.68, p. 736-741, 1978.

SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D. & BRISTOW, P. R. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. **Phytopathology**, v.70, n.1, p. 13-17, 1980.

SILVA, R. N. O. da; MIGLIORINI, P.; JUNGES, E.; NUNES, A. de . F.& TUNES, L. V. M. de. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia bataticola* (taubi.) (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid) em sementes de feijão. **Revista Verde**, v. 11, n.4, p. 07-11, 2016.

SINGH, S. K. NENE, Y. L. & REDDY, M. V. Influence of cropping systems on *Macrophomina phaseolina* populations in soil. **Plant Disease**, v. 74, p. 812-814, 1990.

SINGH, T. & SINGH, D. Transmition of seed-borne inoculum of *Macrophomina phaseolina* from seed to plant. **Proceedings of the Indian Academy of Science**, v.91, p. 357-370, 1982.

SURINDER, K.; BAHADUR, C. V.; KAUR, B. S. & SINGH, D. G. Adaptability of *Macrophomina phaseolina* isolates from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) to different temperature and pH. **International Journal of Life Sciences**, Varanasi, v.1, p. 81-88, 2013.

TANDE, C. G.; MATHEW, F. G. K. & BYAMUKAMA, E. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on *Brassica carinata* in South Dakota. **Plant Health Progress**, v.16, n.3, p. 1094, 2015.

TONIN, R. F. B.; AVOZANI, A.; DANELLI, A. L. D.; REIS, E. M.; ZOLDAN, S. M. & GARCÉS-FIALLOS, F. R. *In vitro* mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 460-466, 2013.

USDA – United States Department of Agriculture. **USDA Agricultural Projections to 2025**. Disponível em:<<http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/>>. Acesso em: 30 de junho de 2018a.

USDA – United States Department of Agriculture. **USDA Agricultural Projections to 2025**. Disponível em:<<http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/>>. Acesso em: 30 de junho de 2018b.

VALLE, F. X. R. do; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão Comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Controle de Doenças. Doenças da parte aérea causada por fungos. In: VALLE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia, Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, p.335-450, 1997.

VIANA, F. M. P. & de SOUZA, N. L. Efeito da interação temperatura-tensão de água sobre germinação de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p. 268-272, 2002.

VITERI, D. M. & LINARES, A. M. Reaction of *Phaseolus* spp. genotypes to ashy stem blight caused by *Macrophomina phaseolina*. **Euphytica**, p. 213:199, 2017.

WATANABE, T. Pycnidium formation by fifty different isolates of *Macrophomina phaseoli* originated from soil or kidney bean seed. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.38, n.2, p.106-110, 1972.

WATANABE, T. Survivability of *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby in naturally-infested soils and longevity of the sclerotia formed *in vitro*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.33, n.3, p.333-337, 1973.

WHITE, D. G. **Compendium of Corn Diseases**. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA, 1999.

WRATHER, J. A. & KENDING, S. R. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. **Plant Disease**, v. 82, p. 247-250, 1998.

YANG, X. B. & NAVI, S. S. First report of charcoal rot epidemics caused by *Macrophomina phaseolina* in soybean in Iowa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n.5, p. 526, 2005.

YORINORI, J. T. Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Controle de Doenças. In: VALLE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. P. 953-1024.