

ITAMAR FERREIRA DA SILVA

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA
PARA TOLERÂNCIA À *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586m
2019

Silva, Itamar Ferreira da, 1993-

Métodos de inoculação e seleção de cultivares de soja para tolerância à *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. / Itamar Ferreira da Silva. – Viçosa, MG, 2019.

vii, 46 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Felipe Lopes da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Glycine max* - Doenças e pragas. 2. Raízes (Botânica). 3. Podridão-de-carvão-da-raiz. 4. Soja - Seleção. 5. Plantas - Melhoramento genético. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

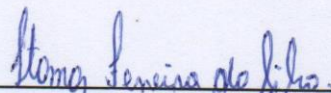
CDD 22. ed. 633.64946

ITAMAR FERREIRA DA SILVA

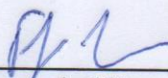
**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA
PARA TOLERÂNCIA À *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de junho de 2019.



Itamar Ferreira da Silva
Autor



Felipe Lopes da Silva
Orientador

Aos meus pais, Valdivina e Mauro
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ser meu guia e por me dar forças e graças para completar mais uma etapa de minha vida.

Aos meus pais, Valdivina e Mauro, por ser minha base. Mesmo não sendo alfabetizados, sempre me deram apoio, amor incondicional e lições de vida, por sempre vibrarem com as conquistas e superações dos desafios da vida. A meus irmãos por todo o apoio durante está caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pelo ensino de excelência, pela oportunidade de prosseguir meus estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Felipe Lopes da Silva, pela orientação, apoio, confiança e amizade, durante está importante etapa da minha vida.

A pesquisadora Dra. Neucimara Ribeiro, pelo, apoio, confiança e amizade, durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do Programa Soja UFV, pela parceria e pelas risadas que tornaram minha caminhada mais feliz e agradável.

Aos amigos, Pollyana, Maiara, Luciana, Lorena e Michel, muito obrigado.

A empresa GDM Seeds pela concessão das instalações e financiamento deste trabalho ao longo de todo o desenvolvimento do mesmo.

Os funcionários do departamento de Sanidade da empresa GDM Seeds por todo apoio e amizade durante o tempo em que executei este trabalho.

E a todos aqueles que embora não citados, sabem da sua importância nesta e nas demais conquistas ao longo da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Cultura da soja.....	1
<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.....	1
Danos causados no rendimento por <i>Macrophomina phaseolina</i>	4
Controle da Podridão de Carvão	5
REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 01: Métodos de inoculação para a seleção de genótipos de soja tolerantes a <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi.) Goid.	10
INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
Ensaio em casa de vegetação.....	13
Método do palito de madeira.....	13
Método grãos de arroz.....	14
Método da ponteira com corte da haste principal.....	14
Método da camada de micélio.....	15
Infestação das Sementes com <i>M. phaseolina</i>	15
Tempo de exposição e número de sementes por tratamento	16
Ensaio a campo	17
Análise estatística.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
Ensaio em casa de vegetação.....	20
Método do palito de madeira.....	20
Método Ponteira (Corte da haste).....	20
Método da camada de Micélio e grão de arroz	21
Infestação das sementes com <i>M. phaseolina</i>	21
Caracterização da reação de tolerância de cultivares de soja exposta a diferentes tempos ao fungo <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.	22
Número de sementes necessárias para a caracterização da reação de tolerâncias	25
Ensaio de campo	26
Comparação entre os ensaios de campo e o método infestação das sementes com <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.....	29
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS	31

CAPÍTULO 2: SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA PARA TOLERANCIA A <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.....	35
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO.....	42
REFERENCIA	43
CONCLUSÃO GERAL	45

RESUMO

SILVA, Itamar Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2019. **Métodos de inoculação e seleção de cultivares de soja para tolerância à *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.** Orientador: Felipe Lopes da Silva. Coorientadora: Neucimara Ribeiro Rodrigues.

A utilização de métodos de inoculação consiste em uma ferramenta essencial para o programa de melhoramento na seleção de variedades tolerantes a *Macrophomina phaseolina*, sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes métodos de inoculação de *M. phaseolina* em casa de vegetação e verificar sua correlação com o comportamento de variedades de soja em experimentos a campo, para posteriormente realizar seleção quanto a sua tolerância. Foram testados cinco métodos em casa de vegetação: Palito de madeira, Grãos de arroz, Ponteira (Corte da haste), Camada de Micélio e Infestação das sementes com *M. phaseolina*. Os ensaios a campo foram conduzidos em Cambé-PR e Formoso do Araguaia- TO, sendo utilizados para todos os ensaios os genótipos BMX POTÊNCIA RR, BMX ELITE IPRO, BMX TORNADO RR, V-MAX RR, BMX APOLO RR, NA5909 RR, GDM15I029 IPRO, já o ensaio de caracterização das reações foi realizado com 69 genótipos utilizando o método de infestação das sementes. Dentre os métodos, o mais eficiente foi a infestação das sementes com *M. phaseolina*, sendo realizado dois novos experimentos ajustando o tempo de exposição (12, 24, 36 e 48 horas) e tamanho da amostra (15, 30, 45 e 60 sementes). Os resultados obtidos demonstraram que o método de infestação das sementes, o tempo de 36 e 48 horas e a utilização de 30 sementes por tratamento foram os que melhor caracterizaram as reações. Os experimentos a campo demonstram alta interação entre Ambiente x Cultivar, apresentando alta relação com o método de infestação de sementes ($r_s = 0,81$), o genótipo GDM 15I029 IPRO se destacou por apresentar a menor médias de sinais visíveis em seu tecido. Na caracterização da reação 14% dos genótipos testados foram classificados com suscetível, em destaque as cultivares BMX ZEUS IPRO, BMX BÔNUS IPRO, BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR, 50% dos genótipos apresentaram a reação de tolerância, com destaque os genótipos CENTENNIAL, DM 3565, BMX GARRA IPRO, BRS 282, BRS 316 RR. Com base nos resultados obtidos, a utilização do método infestação de sementes com *Macrophomina* é indicado para estudos de seleção para tolerância, podendo utilizar as cultivares BMX ZEUS IPRO, BMX BÔNUS IPRO, S-100 como padrões de suscetibilidade.

ABSTRACT

SILVA, Itamar Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2019. **Inoculation method and selection of soybean cultivars for tolerance to *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.** Adviser: Felipe Lopes da Silva. Co-adviser: Neucimara Ribeiro Rodrigues.

The use of inoculation methods was an essential tool for the breeding program in the selection of *Macrophomina phaseolina* tolerant varieties. Therefore, the present work aimed to evaluate the influence of different *M. phaseolina* inoculation methods in a greenhouse. And to verify its correlation with the behavior of soybean varieties in field experiments, to later make selection regarding their tolerance. Five methods were tested in a greenhouse: Wooden stick, Rice grains, Tip (stem cut), Mycelium layer and *M. phaseolina* seed infestation. The field tests were conducted in Cambé-PR and Formoso do Araguaia-TO, and seven genotypes were used for all tests (BMX POTÊNCIA RR, BMX ELITE IPRO, BMX RR RR, V-MAX RR, BMX APOLO RR, NA5909 RR, GDM15I029 IPRO), the reaction characterization assay was performed with 69 genotypes using the seed infestation method. Among the methods that presented the highest efficiency was seed infestation with *M. phaseolina*. Two new experiments were performed adjusting the exposure time (12, 24, 36 and 48 hours) and sample size (15, 30, 45 and 60 seeds). The results showed that the method of seed infestation, the time of 36 and 48 hours and the use of 30 seeds per treatment were the ones that best characterized the reactions. The experiments show high interaction between Environment x Cultivar, the genotype GDM 15I029 IPRO stood out for presenting the lowest averages of visible signals in its tissue. The field experiment and the method of seed infestation had a high relationship, being $r_s = 0.81$. In the characterization of the reaction 14% of the tested genotypes were classified as susceptible, highlighting the cultivars BMX ZEUS IPRO, DM2200, BMX BONUS IPRO, S-100, BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR, 50% of the genotypes showed tolerance reaction with highlight the CENTENNIAL genotypes, DM 3565, BMX GARRA IPRO, L 93-3312, BRS 282, BRS 316 RR. Based on the results obtained, the use of the *Macrophomina* seed infestation method is indicated for tolerance selection studies, and the cultivars BMX ZEUS IPRO, DM2200, BMX BONUS IPRO, S-100 can be used as susceptibility standards.

INTRODUÇÃO GERAL

Cultura da soja

A soja pertence à família Fabaceae, subfamília Faboideae e espécie *Glycine max* (L.), e possui origem na China. No Brasil a cultura da soja foi introduzida primeiramente no estado da Bahia, por volta de 1882, através de sementes oriundas dos Estados Unidos trazidas por Gustavo D'Utra. Porém, os primeiros dados estatísticos de produção comercial da cultura da soja foram relatados em 1941 no estado do Rio Grande do Sul (COSTA, 1996).

Seu cultivo foi estabelecido inicialmente no Rio Grande do Sul devido o incentivo político de subsídio à rotação com a cultura do Trigo, porém somente a partir da década de 1960 visando à autossuficiência a soja se estabeleceu como cultura economicamente importante para o Brasil, sendo realizadas pesquisas no desenvolvimento de plantas com crescimento determinado, semelhante às utilizadas no sul dos Estados Unidos na ocasião, com altura e ciclo adequados a estas condições (KIHLE et al., 1999).

Os grãos de soja apresentam cerca de 20% de óleo, 40% de proteína, 27% de carboidratos, tornando a soja um produto destinado às indústrias químicas, agroindústrias e de alimentos (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009).

O Brasil se destaca entre os principais produtores de soja do mundo, sendo cultivada uma área de aproximadamente 35 milhões de hectares no ano agrícola 2018/2019, em que foram produzidas 114 milhões de toneladas do grão, representando produtividade média de 3.322 ton. ha⁻¹ (CONAB, 2019).

Apesar da eficiência na produção, ainda há inúmeros fatores que interferem na produtividade da soja. Entre estes fatores se destaca os danos causados pelas doenças, sendo estas de origem fúngicas, viróticas, bacterianas e por nematoides. Entre as doenças radiculares que mais causam danos econômicos à cultura, se destaca a podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (WRATHER et al. 2010).

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid.

A taxonomia do fungo *Macrophomina phaseolina* foi frequentemente revisada nos últimos 100 anos. O gênero *Macrophomina* foi estabelecido pela primeira vez por Petrak (1923) com a descrição de *M. philippinensis*. No entanto, por apresentar picnídios o fungo foi originalmente chamado *Macrophoma phaseolina* por Tassi (1901) e *Macrophoma phaseoli* por

Maublanc (1905). Halsted (1890) descreveu-a como *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler com base em seus escleródios. Finalmente, Ashby (1927) examinou e comparou criticamente os espécimes e estabeleceu as espécies binomiais *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) (ASHBY, 1927). Mais tarde, Goidanich (1947) mudou o binômio *Macrophomina phaseoli* para *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid., passando a ser amplamente aceito na literatura.

Há vários sinônimos de *Macrophomina phaseolina* na literatura, em função da variação taxonômica recebida durante os anos, sendo estes: *Sclerotium bataticola*, *Macrophoma cajani* P. Syd. e Butler, *Macrophoma Chorchori*, *Macrophoma sesami*, *Tiarosporella phaseolina* *Sclerotium bataticola*, etc. (KAUR et al. 2012).

Recentemente, no Senegal, uma espécie nova foi determinada no gênero, chamada *Macrophomina pseudofaseolina* tendo como hospedeiro *Abelmoschus esculentus*, *Arachis hypogaea*, *Hibiscus sabdarifa* e *Vigna unguiculata* (SARR et al., 2014)

Taxonomicamente, *M. phaseolina* pertence ao filo Ascomycota do reino Fungi, família Botryosphaeriaceae. Até a data, o estado sexual de *M. phaseolina* ainda não foi identificado (KAUR et al., 2012).

O patógeno sobrevive como pequenos pontos negros (microescleródios) no solo, restos culturais e semente contaminadas, servido como fonte primária de inóculo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Quando a raiz em crescimento de uma planta suscetível emite exsudatos induz a emergência dos microescleródios e estes infectam a radícula da plântula. A infecção é caracterizada pela penetração da epiderme por ação mecânica, enzimática ou aberturas naturais ficando restrita aos espaços intercelulares do córtex das raízes primárias, ocorrendo o crescimento da colonização intracelular após a desintegração da parede celular (MAYEK-PEREZ et al., 2002).

Com a evolução da doença os micélios ramificados crescem através do córtex e penetra os vasos do xilema (ABAWI e PASTOR-CORRALES, 1990). Uma vez dentro dos tecidos vasculares o fungo forma microescleródios, bloqueando os vasos condutores (KAUR et al. 2012), resultando em murchamento das folhas nas horas mais quentes do dia, clorose foliar e morte das plantas.

À medida que os restos culturais das plantas mortas vão se decompondo, os microescleródios são liberados no solo, onde sobrevive como inóculo para o próximo ciclo. (SMITH et al. 1989). (FIGURA 1)

Após a morte das plantas, a colonização ainda ocorre no hospedeiro e a formação de microescleródios ainda continua. A principal fonte de inóculo do patógeno são os

microescleródios, sendo estes liberados ao solo após a decomposição dos restos culturais. Eles ficam agrupados e localizados próximos à superfície do solo a uma profundidade de 0-20 cm (MIHAIL, 1989), podendo sobreviver de 2-15 anos, variando devido às condições ambientais e se estiverem ou não associados a tecidos do hospedeiro (BAIRD et al., 2003).

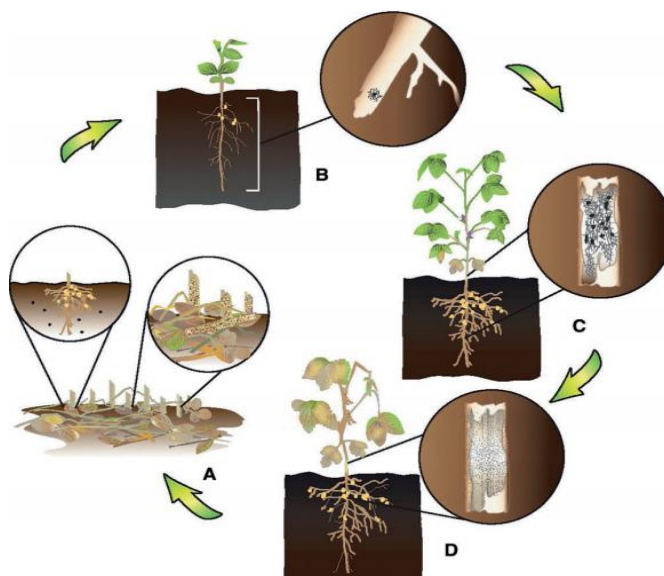


Figura 01: Ciclo de vida do fungo *Macrophomina phaseolina* causante de podridão de carvão (SMITH et al. 2014). (A) Microescleródios de *Macrophomina phaseolina* no solo e restos culturais (B) raízes infectadas após entrar em contato com Microescleródios. (C) O fungo cresce dentro do caule e da raiz rompendo o sistema vascular, formando novos Microescleródios. (D) A presença abundante de Microescleródios no tronco inferior e no tecido de raiz principal dá uma aparência de carvão (Pontos negros). O resíduo infectado se tornará fonte potencial de inóculo para a próxima cultura plantada.

Sintomas em plântulas: A infecção das mudas ocorre quando excepcionalmente a temperatura do solo fica acima de 35°C por 2 a 3 semanas. Depois da emergência, os sintomas podem ser visíveis nos cotilédones como manchas castanhas a escuras e as margens dos cotilédones podem se tornar marrom a preto. A partir do estágio unifoliar ocorre o aparecimento de lesões circulares oblongas marrom avermelhadas no hipocótilo, podendo evoluir para marrom escuro a preto. Estas lesões evoluem levando a morte, caso as condições ambientais continuem favorável ao fungo (GUPTA et al., 2012).

Sintomas em plantas adultas: Os primeiros sintomas acima do solo aparecem entre 1 e 4 semanas antes da maturação normal. O patógeno causa lesões nas raízes, caules, vagens e sementes. Do nível do solo para cima, lesões superficiais, de coloração castanha, aparecem com pouca frequência na haste. Microescleródios são formados nos tecidos vasculares e subepidérmicos, dando uma aparência acinzentada ao tecido (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; GUPTA et al., 2012)

Os sintomas foliares progridem da parte superior para inferior. As folhas das plantas infectadas ficam menores do que o normal, posteriormente tornam-se amarelas antes de

murchar (GUPTA e CHAUHAN 2005). As vagens maduras e secas são infectadas e cobertas por pontos negros (picnídios). O fungo penetra nas vagens e nos grãos, causando manchas negras difusas nas sementes e após a morte da planta, minúsculos microescleródios podendo ser vistos no tecido epidérmico das hastes e raízes (GUPTA et al., 2012).

A doença possui grande importância econômica, sendo capaz de infectar mais de 500 espécies diferentes de planta, além de ser considerado um problema de alto impacto em países tropicais e subtropicais com clima árido e semiárido na África, Ásia, Europa e América. Vegetais (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ABAWI e PASTOR-CORRALES, 1990; KAUR et al. 2012).

Danos causados no rendimento por *Macrophomina phaseolina*

Grandes variações na supressão de rendimento têm sido relatadas, de acordo com Wrather et al., (1997) as perdas no ano de 1994 nos dez países maiores produtores de soja ultrapassou 1,2 milhões de toneladas. Neste mesmo ano no Brasil, as perdas foram estimadas em aproximadamente 0,930 milhões de toneladas.

No ano de 2003 a podridão de carvão foi classificada como a segunda doença que mais causou danos a produção nos EUA (WRATHER e KOENNING, 2006). No ano de 2010 a 2013 a doença estava entre as cinco principais doenças que mais causam danos no rendimento da soja nos EUA (LUNA et al., 2017),

No Brasil, a primeira ocorrência de *M. phaseolina* foi na cultura do feijão (BITANCOURT, 1935). Na cultura da soja os primeiros relatos de perda foram no norte do Paraná no ano de 1979, com perda de até 50% na produção (FERREIRA et al., em 1979).

No ano de 2006 as perdas causadas pelo fungo foram de 0,360 milhões de toneladas, sendo classificada como a 3ª doença que mais causa danos a cultura (WRATHER et al. 2010).

Acredita-se que as perdas causadas pelo fungo *Macrophomina phaseolina* seja superior aos apresentados, pois a doença passa despercebido nas lavouras, devido esta ser geralmente encontrada na região do colo da planta e nas raízes e os sintomas surgirem no final do ciclo, se confundindo com a maturação das plantas (ALMEIDA et al., 2001).

Controle da Podridão de Carvão

A Podridão de carvão é caracterizada por ser um fungo polífago, sendo capaz de infectar mais de 500 espécies vegetais, entre elas o milho, sorgo, algodão e girassol. Sendo assim a rotação de culturas é uma alternativa sem grande eficácia (PEARSON et al., 1986).

Em solos com alta densidade aparente, ou seja, compactados, impede que as raízes se desenvolvam, consequentemente tornando-as mais suscetíveis ao fungo. Sendo assim o manejo das características químicas e físicas do solo como adubação, calagem, descompactação e a manutenção da cobertura são práticas que auxiliam no controle da doença, uma vez que permite que as raízes se desenvolvam e cresçam melhor, reduzindo predisposição da planta ao ataque do patógeno (ALVES e DEL PONTE, 2007).

O controle mais prático e econômico da doença seria através da utilização de cultivares tolerantes, porém somente há relatos de cultivares comerciais com moderada tolerância e apenas duas cultivares descritas como tolerantes por Ishikawa et al. (2018). Apesar da identificação de fontes que conferem à planta tolerância, é necessária a realização do *screening* para a caracterização de novos indivíduos com menor suscetibilidade à *Macrophomina phaseolina* (PARIS et al., 2006; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011; MENGISTU et al., 2013,).

Neste sentido, fica evidente a necessidade de pesquisas visando a caracterização e seleção de genótipos de soja tolerantes a *M. phaseolina*. Atualmente os principais métodos de avaliação da tolerância a doença em diversas culturas baseiam-se na inoculação artificial envolvendo a realização de ferimentos nas plantas, possuindo como principais vantagens a rapidez da resposta e facilidade de execução, e como principal desvantagem o fato de não simularem as condições naturais de infecção, provocando estresses excessivos nas plantas, consequentemente subestimando os níveis de tolerância dos genótipos avaliados.

Já os métodos de inoculação natural possuem como principal vantagem o fato de simularem o processo natural de infecção do patógeno, e principais desvantagens, serem mais demorados e muitas vezes apresentarem escape de infecção, dessa forma, superestimando os níveis de tolerância das plantas avaliadas.

Com base no exposto, este trabalho tem por objetivo caracterizar o método de inoculação mais eficiente, para posterior seleção de cultivares de soja com tolerância à *M. phaseolina*.

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Root rots of bean in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies**. Bogotá: Centro de Agricultura Tropical, 114p, 1990.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, v. 9 – SF. 17/18, n. 10 - Décimo levantamento | Janeiro 2019.
- DHINGRA OD AND SINCLAIR JB. **Biology and pathology of *Macrophomina*** ABAWI GS, PASTOR-CORRALES MA. **Root rot of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies and management strategies**. Cali: Centro International de Agricultura Tropical. 1990.
- ALMEIDA, A. M. R.; TORRES, E.; FARIAS, J. R. B.; BENATO, L.C.; PINTO, M.C.; MARIN, S. R. R. *Macrophomina phaseolina* em soja: sistema de semeadura, sobrevivência em restos cultura e diversidade genética. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 47 p.
- ALVES, R. C.; DEL PONTE, E. M. Requeima da batata. In: DEL PONTE, E. M. (Ed.) Fitopatologia.net - herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual/ficha>. Acesso em: 02 ago 2019.
- ASHBY SF. *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Comb. Nov. The pycnidial stage of *Rhizoctonia bataticola* (Taub.). Butl. Trans Br **Mycol Soc**, 12, 141–147-1927.
- 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.
- BITANCOURT, A. A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, v.1, n. 2, p.41, 1935.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, v. 9 – SF. 17/18, n. 10 - Décimo levantamento | Janeiro 2019.

- COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: ed. Evangraf, 1996. p. 233
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. **Monografia - Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa-MG,1978
- FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R **Doenças da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA, CNPSO, 1979. 42p. (EMBRAPA, CNPSO, Circular técnica, 1)
- GOIDANICH G. (1947). A revision of the genus *Macrophomina* Petrak. type species: M.P. (Tassi) G. Goid. n. comb. M. P. (Maubl.) Ashby. Ann. Sper. Agr. N S I, 3, 449–461.
- GUPTA GK, CHAUHAN GS. (2005) Symptoms, Identification and Management of Soybean Diseases. Technical Bulletin 10. Indore, India, National Research Centre for Soybean.
- GUPTA, G. K., SHARMA, S. K., AND 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**, 160:167-180. 2012
- KAUR S., SINGH G., KAUR S., EDWARD G., CHAND R AND BAHADUR V. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(2): 136-151.
- KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A.; SOUZA, P. I. M.; HIROMOTO, D. M.; ARANTES, N. E.; FARIAS, L. C.; MIRANDA, M. A. C.; MORCELI, A.; TAKEDA, C.; BONATO, E. R.; BERTAGNOLLI, P. F.; PRADO, E. E. **Desenvolvimento de germoplasma de soja adaptados às várias regiões ecológicas e aos vários sistemas de produção: resultados de pesquisa da Embrapa Soja** – 1999. Londrina: Embrapa Soja, 2000. p.144- 145. (Embrapa Soja. Documentos, 142).
- LUNA M.P.R, MUELLER D., MENGISTU A., SINGH A. K., HARTMAN G.L., WISE K.A.; Advancing Our Understanding of Charcoal Rot in Soybeans, **Journal of Integrated Pest Management**, Volume 8, Issue 1, 1 January 2017.

MAUBLANC A. (1905). Especies nuevas de champiñones inferiores. **Bull Soc Mycol France**, 21, p90,1950.

MAYÉK-PÉREZ, N.; GARCÍA-ESPINOSA, R.; LOPEZ-CASTANEDA, C.; ACOSTAGALLEGOS, J. A.; SIMPSON, J. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.60, p.185-195, 2002

MENGISTU, A.; ARELLI, P.; BOND, J.P.; NELSON, R.; RUPE, J.B.; SHANNON, G.J.; WRATHER, A.J. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. **Plant Management Network**, mar. 2013.

MENGISTU, A.; ARELLI, P.A.; BOND, J.P.; SHANNON, G.J.; WRATHER, A.J.; RUPE, J.B.; CHEN, P.; LITTLE, C.R.; CANADAY, C.H.; NEWMAN, M.A., PANTALONE, V.R. Evaluation of soybean genotypes for resistance to Charcoal rot. **Plant Management Network**, 26 set. 2011.

MENGISTU, A.; RAY, J.D.; SMITH, J.R.; PARIS, R.L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony forming unit index. **Crop Science**, v. 47, p. 2453-2461, 2007

MIHAIL, J. D. *Macrophomina phaseolina*: spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. **Phytopathology**, v.79, p.848-855, 1989.

PARIS, R.L.; MENGISTU, A.; TYLER, J.M.; SMITH, J.R. Registration of soybean germplasm line DT97-4290 with moderate resistance to Charcoal rot. **Crop Science**, v. 46, p. 2324, 2006.

PEARSON, C. A.; LESLIE, S.; SCWENK, F. W. Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean, and soil. **Phytopathology**, v. 76, n. 6, p. 646-649, 1986.

PETRAK F. (1923). KYKOLOGISCHE NOTIZEN VI. *Annals Mycologicit*, 21, 314–315. Sarr M., Ndiaye M., Groenewald J and Crous P. 2014. Genetic diversity in *Macrophomina*

phaseolina, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, 53(2): 250-268, 2012.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, Evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina Mecnas, 2009.

SMITH R., HODGES CS AND CORDELL CE. 1989. Charcoal root rot and black root rot: Forest nursery pest. Agriculture Handbook 680. U.S. **Departament of Agriculture, Forest Service, Washington D.C.**, USA, pp: 112-113, 1989.

Wrather JA, Anderson TR, Arsyad DM, Gai J, Ploper LD, PortaPuglia A, Ram HH, Yorinori JT. (1997) Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1994. **Plant Dis** 81:107–110,1997.

WRATHER JA, KOENNING SR. . Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. **J Nematol**, 38, 173–180, 2006.

WRATHER, A.; SHANNON, G.; BALARDIN, R.; CARREGAL, L.; ESCOBAR, R.; GUPTA, G. K.; MA, Z.; MOREL, W.; PLOPER, D.; TENUTA, A. Diseases effects on soybean yields in the top eight soybean-producing country es in 2006. Online. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2010-0125-01-RS, 2010.

CAPÍTULO 01: Métodos de inoculação para a seleção de genótipos de soja tolerantes a *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid.

RESUMO

A podridão de carvão causada pela *Macrophomina phaseolina* (Tassi.), é uma das doenças mais importantes na cultura da soja, apresentando grande dificuldade no controle, por tratar-se de um patógeno polífago e habitante do solo. Apesar de tal importância, ainda não há descrito um método confiável de caracterização da reação de tolerância de genótipos em casa de vegetação correlacionado ao campo. Objetivou-se a caracterização de genótipos de soja tolerantes a *M. phaseolina* e sua relação com experimentos a campo. Foram testados cinco diferentes métodos de inoculação em casa de vegetação: Palito de madeira, Grãos de arroz, Ponteira (Corte da haste), camada de micélio e Infestação das semente com *M. phaseolina*. Posteriormente ajustados a metodologia de infestação das semente com *M.p*, avaliando diferentes tempos de exposição das sementes (12, 24, 36 e 48 horas) e tamanho ótimo da amostra (15, 24, 36 e 48 sementes). Os ensaios a campo foram realizados na cidade de Cambé – PR e Formoso do Araguaia- TO. Para todos os ensaios realizados foram utilizados 7 genótipos: BMX POTÊNCIA RR, BMX ELITE IPRO, BMX TORNADO RR, V-MAX RR, BMX APOLO RR, NA5909 RR, GDM15I029 IPRO. Com base nos resultados obtidos em casa de vegetação, o método de infestação das sementes com *M.p* foi o que apresentou a melhor caracterização das reações. Posteriormente em seu ajuste, o tempo de exposição para a melhor caracterização a reação de tolerância é de 36 a 48 horas, e o número ideal de sementes é 30. Os resultados obtidos a campo demonstram a interação entre Ambiente x Cultivar, onde o genótipo GDM 15I029 IPRO apresentou a menor média se distinguindo das demais cultivares testadas. A correlação entre o métodos infestação das sementes e o exerimento a campo foi de ($r= 0,81$). Com base nos resultados obtidos, é indicado a atilização do método de infestação das sementes, expondo 30 sementes por 36 a 48 horas em contado com o fungo.

Palavra-chave: sementes, soja, podridão de carvão, emergência relativa.

ABSTRACT

The charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Is one of the most important diseases in soybean crop, presenting great difficulty to control because it is a polyphagous pathogen and inhabitant of the soil. Despite such importance, a reliable method of characterization of the tolerance reaction of genotypes in a greenhouse related to the field has not yet been described. To characterize *M. phaseolina* tolerant soybean genotypes and their relationship with field experiments, five different inoculation methods were tested in a greenhouse: Wooden toothpick, Rice grains, Tip (stem cut), of mycelium and seed infestation with *M. phaseolina*. Subsequently, the seed infestation methodology with *M.p* was adjusted, evaluating different seed exposure times (12, 24, 36 and 48 hours) and optimal sample size (15, 24, 36 and 48 seeds). The field trials were carried out in Cambé - PR and Formoso do Araguaia-TO. For all assays performed, 7 genotypes were used (BMX POWER RR, BMX ELITE IPRO, BMX TORNADO RR, V-MAX RR, BMX APOLO RR, NA5909 RR, GDM15I029 IPRO). Based on the results obtained in the greenhouse, the method of seed infestation with *Mp* presented the best characterization of the reactions. After its adjustment, the exposure time for the best characterization of the tolerance reaction is 36 to 48. hours and the ideal number of seeds is 30. The results obtained in the field show the interaction between Environment x Cultivar, the GDM 15I029 IPRO genotype presented the lowest average distinguishing from the other cultivars tested, the correlation between the seed infestation methods and the field exercise was ($r = 0.81$). Based on the results obtained, the seed infestation method is indicated, exposing 30 seeds for 36 to 48 hours in contact with the fungus.

Key words: Root diseases, coal rot, *Glycine max* (L.) Merr.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a oleaginosa mais cultivada no mundo, sendo utilizado em diferentes formas, como, na alimentação animal, na composição de rações, no consumo humano, e na produção de biodiesel (YOKOMIZO et al., 2013; HADDAD et al., 2017).

O Brasil se destaca entre os principais produtores de soja do mundo, sendo cultivada uma área de aproximadamente 35 milhões de hectares no ano agrícola 2018/2019, em que foram produzidas 114 milhões de toneladas do grão, representando uma produtividade média de 3.322 ton ha⁻¹ (CONAB, 2019).

Apesar da eficiência na produção, ainda há inúmeros fatores que interferem na produtividade da soja. Entre estes fatores se destacam os danos causados pelas doenças, sendo estas de origem fúngicas, viróticas, bacterianas e por nematoides. Entre as doenças fúngicas que mais causam danos econômicos para a cultura, se destaca a podridão de carvão, doença radicular causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (WRATHER et al. 2010)

M. phaseolina ocorre de forma natural nos solos brasileiros. Os sinais característicos da doença iniciam-se com lesões irregulares na haste da planta, ligeiramente deprimidas e escuras, que posteriormente adquirem coloração cinza (microescleródios). Já os sintomas variam de acordo com a idade da planta, ocorrendo apodrecimento radicular, murcha, maturação antecipada e formação incompleta de grãos (ALMEIDA et al., 2014). O desenvolvimento da doença é favorecido por altas temperaturas (30-35°C) e déficit hídrico (LODHA, 1998).

As perdas de rendimento devido esta doença nos dez países com maior produção de soja em 1994 foram de 1.234 milhões de toneladas (WRATHER et al., 1997). Em estudos realizados por Wyllie, (1998) no estado de Missouri (EUA), houveram perdas anuais de 5%, com alguns produtores chegando a 50 %, semelhante ao observado por Ferreira et al. (1979) na região norte do Paraná, onde houveram perdas expressivas de aproximadamente 50%. Embora ocorra variação das perdas durante os anos, a doença foi classificada entre as mais importantes nos Estados Unidos ao longo dos últimos 20 anos (LUNA et al., 2017).

O controle mais prático e econômico deste patógeno seria através de cultivares tolerantes, porém há relatos de cultivares comerciais somente com moderada tolerância (PARIS et al., 2006; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011; MENGISTU et al., 2013), e apenas duas com tolerância descrita por Ishikawa et al. (2018).

As metodologias utilizadas na inoculação do patógeno visando a caracterização de tolerância possuem baixa eficiência e baixa reprodutibilidade (CLAUDINO, 2013).

Devido à grande importância da podridão de carvão na cultura da soja, o desenvolvimento de uma metodologia altamente eficiente constitui uma importante ferramenta a ser utilizada na seleção de genótipos com tolerância a *M. phaseolina*. Deste modo, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar o método de inoculação mais eficiente para a seleção de genótipos de soja tolerantes a *M. phaseolina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio em casa de vegetação

Os ensaios em ambiente controlado (25°C e 75 % de U°) foram realizados em casa de vegetação na estação experimental da empresa GDM Seeds, no município de Cambé, no estado do Paraná. Foram testados 5 métodos de inoculação: Método do palito de madeira; método grãos de arroz; método da ponteira com corte da haste; método da camada de micélio; e infestação das sementes com *M. phaseolina*.

Para todos os métodos foi utilizado o delineamento de blocos inteiramente casualizados com 4 repetições mais a testemunha sem inoculação e sete cultivares descritas por Ishikawa et al. (2018) como sendo potenciais padrões de suscetibilidade e de tolerância, sendo estes: BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR e NA 5909 RR suscetíveis; BMX POTÊNCIA RR e V-MAX RR moderadamente tolerantes; e BMX ELITE IPRO e GDM 15I029 IPRO tolerantes. O tratamento testemunha sem inoculação foi utilizado para comprovar os reais danos da doença na planta e as lesões causadas pelos métodos de inoculação. A seguir um melhor detalhamento dos métodos de inoculação.

Método do palito de madeira

O método se baseia no trabalho desenvolvido por Tesso e Ejeta (2011) em que pontas de palitos de madeira colonizados com o patógeno foram espetadas no hipocótilo das plantas.

Palitos de madeira de 4 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento foram espetados em uma folha de papel germiteste de mesmo diâmetro de placas de petri utilizadas para multiplicação do fungo.

Os discos de papel germiteste contendo os palitos foram colocados nas placas de petri e todo o conjunto foi esterilizado em autoclave por 30 minutos a 121 °C. Após a esterilização e esfriamento das placas, foi vedado o meio de cultura BDA de modo que apenas 3 a 4 mm da

extremidade afinada do palito ficasse exposto fora do meio. Após o preparo da placa com o meio de cultura, foram colocados 4 discos do inóculo do fungo com 10 dias de idade. As placas então foram vedadas e mantidas incubadas em BOD a 26°C durante 20 dias.

Foi realizada a semeadura das cultivares em casa de vegetação e utilizou-se 7 genótipos, 4 repetições o qual cada uma continha 7 plantas por vaso. Dez dias após emergência, as plantas foram inoculadas realizando a inserção do palito colonizado pelo patógeno no hipocótilo a uma altura de aproximadamente 1,5 cm do colo da planta. Para o tratamento controle (testemunha), utilizaram-se palitos esterelizados sem crescimento do fungo. Para permitir a melhor fixação do palito, a inserção do mesmo no hipocótilo da planta foi realizada em ângulo aproximado de 45 graus.

A avaliação foi realizada aos 14 dias após a inoculação, com auxílio de uma régua graduada, realizando a mensuração do tamanho da área lesionada pelo patógeno.

Método grãos de arroz

A metodologia de inoculação por meio de grãos de arroz contaminado com *M. Phaseolina* foi baseada na proposta por Claudino (2013) com algumas modificações. Em vasos com capacidade de 500 ml foi colocada uma camada de 3 cm de areia e depositada sobre a mesma 10 gramas de arroz contaminado. O vaso então foi preenchido com areia para que após a emergência as raízes das plântulas entrassem em contato com os grãos de arroz contaminado. Para o tratamento controle, foi utilizado apenas grãos de arroz autoclavado sem inóculo do fungo.

A partir de 13 dias após a semeadura o volume de água de irrigação foi reduzido visando a simulação de estresse hídrico por seca.

A avaliação ocorreu 40 dias após a inoculação, por meio de uma régua graduada medindo o comprimento das raízes e volume através de uma proveta graduada.

Método da ponteira com corte da haste principal

A metodologia foi realizada de acordo com o proposto por Twizeyimana (2012) com algumas modificações. O fungo *Macrophomina phaseolina* foi cultivado em placas de petri contendo meio BDA a 25°C por 6 dias. Para a inoculação, a colônia foi virada dentro da placa de modo que a superfície contendo os micélios permanecesse para baixo. Pipetas de 200 µL foram pressionadas com seu bocal sobre o meio de cultura. A ponteira contendo o meio mais o

fungo em seu interior, foram pressionadas na haste principal, previamente cortada com aproximadamente 2,5 cm de comprimento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizados com 4 repetições mais o controle não inoculado, onde as ponteiros contendo somente discos do meio de cultura BDA foram utilizados.

As ponteiros foram retiradas três dias após a inoculação, quando então foram iniciadas as avaliações, medindo o comprimento da lesão a partir do ápice da planta 15 dias após a inoculação, utilizando uma régua graduada em mm.

Método da camada de micélio

O teste foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Dorrance et al. (2003), adaptado para *M. phaseolina*. Placas de Petri com BDA foram inoculadas com o patógeno e incubadas por 8 dias em BOD a 26°C. Em vasos com capacidade de 500 ml foi colocado uma camada de 3 cm de areia e depositada sobre a mesma um disco do meio de cultura contendo o fungo, com os micélios e picnídios voltados para baixo. Posteriormente os vasos foram preenchidos com areia, quando então realizou-se a semeadura de 10 sementes. Utilizou-se placas com meio de cultura sem inóculo como testemunhas.

Após 15 dias de semeadura, foi reduzido o fornecimento de água, com objetivo de potencializar os danos causados pela doença e melhor caracterizar os genótipos.

A avaliação de severidade foi realizada utilizando uma régua graduada, medindo o comprimento radicular.

Infestação das Sementes com *M. phaseolina*

A metodologia foi realizada de acordo com o proposto por Rosa (2006) com, algumas modificações. O isolado foi repicado para placas de Petri de 9 mm de diâmetro, contendo o meio de cultura BDA, posteriormente incubado a 26° C por sete dias.

As sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em solução de hipoclorito a 0,05% por 60 segundos, seguida por lavagem em água corrente por 30 segundos, onde posteriormente as sementes foram depositadas sobre papel filtro esterilizado para secagem a temperatura ambiente.

Em cada placa, sobre a camada de micélio do fungo foram dispostas 30 sementes devidamente desinfestadas e secas. O controle não inoculado consistiu em sementes desinfestadas e secas.

Após a exposição das sementes com patógeno por 48 horas a 25°C, as sementes foram cuidadosamente retiradas da placa de petri e plantadas em vasos contendo areia. Os vasos com areia foram mantidos em ambiente controlado a 25°C por 7 dias.

As avaliações consistiram na determinação da porcentagem de emergência das sementes inoculadas em relação ao controle não inoculado (branco) de cada genótipo, denominada emergência relativa, como desmostra a equação abaixo.

$$GE\% = \frac{GEI}{GEB} \times 100$$

GE%: Emergência Relativa em %.

GEI: Emergência Real Inoculado.

GEB: Emergência Real Branco (Sem Inocular).

A escala de reação é baseada na emergência relativa, sendo: suscetível 0 a 30%, moderadamente suscetível 30 a 50%, moderadamente tolerante 50 a 80% e tolerante acima de 80%.

Tempo de exposição e número de sementes por tratamento

Primeiramente, para atender ao objetivo de identificar o melhor tempo de exposição de sementes ao fungo foram testadas sete cultivares de soja descritas anteriormente e 4 tempos de exposição (12, 24, 36 e 48 horas).

Para a instalação dos experimentos todas as sementes foram desinfectadas utilizando-se uma solução com hipoclorito a 1%. Sendo estas imergidas por 60 segundos na solução e em seguida submetidas a três lavagens em água destilada. Posteriormente as sementes foram depositadas sobre papel filtro esterilizado para secagem a temperatura ambiente.

Em cada placa, sobre o micélio do fungo foram dispostas 30 sementes de cada cultivar em camada simples. Posteriormente as placas com as sementes foram mantidas em B.O.D. a 25°C, com fotoperíodo de 12h e nos tempos predeterminados (12, 24, 36 e 48 horas).

Além disso foram utilizadas testemunhas de cada cultivar sem a exposição ao fungo, visando confirmar a ocorrência da doença nos ensaios e obter a emergência de cada cultivar sem a presença do fungo.

Após a exposição das sementes ao fungo nos diferentes tempos, a semeadura foi

realizada em vasos com capacidade de 2 litros contendo apenas areia autoclavada, mantidos em casa de vegetação por 7 dias.

Posteriormente, visando obter o número ideal de sementes por tratamento, foi implantado um ensaio contendo as mesmas cultivares já descritas e quatro diferentes números de sementes (15, 30, 45 e 60). O delineamento experimental foi inteiramente casualizados em esquema fatorial simples com quatro repetições, em que os fatores consistiram as cultivares e número de sementes.

O tempo de exposição das sementes ao fungo foi determinado baseando-se nos resultados obtidos na primeira parte do presente trabalho. Posteriormente as sementes foram semeadas em vasos de 2 litros contendo areia e mantidos por 7 dias em casa de vegetação.

Sete dias após a semeadura avaliou-se a emergência das plântulas, transformando-a em emergência relativa com base na testemunha sem inoculação, como demonstra a equação abaixo.

$$GE\% = \frac{GEI}{GEB} \times 100$$

GE %: Emergência Relativa em %.

GEI: Emergência Real Inoculado.

GEB: Emergência Real Branco (Sem Inocular).

Após a determinação da emergência relativa, a reação de tolerância de cada cultivar foi determinada, sendo: cultivares suscetíveis obtiveram emergência relativa inferior a 20%, moderadamente suscetíveis entre 20 e 50%, moderadamente tolerantes entre 50 e 80%, e tolerantes maiores que 80 %.

Ensaio a campo

Os ensaios de campo foram conduzidos nas estações experimentais da empresa GDM seeds, nos municípios de Cambé, no estado do Paraná, e Formoso do Araguaia, no estado de Tocantins, durante os meses de outubro 2017 a outubro de 2018, sob sistema de plantio direto. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições e 07 cultivares de soja (Tabela 1) semeadas em parcelas com 4 linhas espaçadas a 45 cm e 5 metros de comprimento.

Tabela 1. Cultivares de soja e respectivos grupos de maturidade relativa (GMR).

Cultivar	GMR	Cultivar	GMR	Cultivar	GMR
BMX Potência RR	6.7	BMX Elite IPRO	5.5	BMX Tornado RR	6.2
V-Max RR	6.2	BMX Apolo RR	5.5	NA5909 RR	6.0
GDM15I029 IPRO	5.8				

Com o objetivo de favorecer o ambiente adequado para o desenvolvimento da doença, os ensaios foram implantados em três épocas de semeadura no município de Cambé: 16/10/2017 (ensaio denominado Ambiente 1), 14/11/2017 (Ambiente 2) e 09/12/2017 (Ambiente 3); e duas épocas no município de Formoso do Araguaia: 14/06/2018 (Ambiente 4) e 30/06/2018 (Ambiente 5).

O isolado de *M. phaseolina* utilizado foi multiplicado em meio batata-dextrose-água (BDA) incubado a 26°C por um período de cinco dias.

Para produção do inóculo, 250 gramas de sementes de arroz foram colocadas em garrafas plásticas brancas foscas de capacidade de 1 L, onde adicionou-se 50 ml de água deionizada e posteriormente foram autoclavadas por 30 minutos a 121°C. Após o resfriamento, 10 discos de micélio retirados da borda de colônias do fungo foram inseridos em inoculados em cada garrafa.

As garrafas foram incubadas a 26 °C por um período de 40 dias. Do terceiro dia em diante foram diariamente agitadas para que ocorresse a colonização. Após o término deste período, quando os grãos estavam totalmente colonizados apresentando coloração negra/cinza, esse inóculo foi utilizado na implantação dos ensaios.

No momento da semeadura, 450 kg ha⁻¹ de inóculos produzidos foram distribuídos juntamente com as sementes de soja, no sulco de semeadura.

A avaliação da podridão negra ocorreu no estágio R6, de acordo com as escalas de notas desenvolvidas (Figuras 1 e 2). A intensidade de coloração externa (ICE) foi avaliada caracterizando a intensidade de picnídios na porção interna da raiz (Figura 1). Utilizou-se para isso uma escala de notas desenvolvida, variando de 1 a 5, ao analisar a nota média de cada cultivar foram consideradas tolerantes: Média igual ou menor que 1, moderadamente tolerantes notas acima de 1 e menor que 2; moderadamente suscetíveis acima de 2 e menor que 3 e suscetíveis notas acima de 3.



Figura 02. Escala de intensidade de coloração interna (ICE). 1: nenhum microescleródio; 2: pouco microescleródio visível na epiderme, tecido radicular não se descolorou; 3 microescleródio cobre parcialmente o tecido; 4: o tecido radicular é descolorido com numerosos microescleródio aderidos no tecido, microescleródio também são visíveis sob a epiderme interna em seções de haste e raiz; e 5: Epiderme escurecida devido ao elevado número de microescleródio.

A Intensidade da Coloração Interna (ICI) foi avaliada de acordo com a escala desenvolvida por Mengistu et al. (2007) como demonstrada na Figura 2. As médias foram obtidas e as cultivares foram classificadas utilizando os mesmos critérios para ICE, sendo estes: Tolerantes: Média igual ou menor que 1, moderadamente tolerantes notas acima de 1 e menor que 2; moderadamente suscetíveis acima de 2 e menor que 3 e suscetíveis notas acima de 3.



Figura 03. Intensidade da coloração Interna (ICI). 1: nenhum microescleródio visível; 2: pouco microescleródio visível na medula, no tecido vascular; 3: microescleródio cobre parcialmente o tecido; 4: o tecido vascular é descolorido com numerosos microescleródio aderidos no tecido, microescleródio também são visíveis sob a epiderme interna em seções de haste e raiz; e 5: tecido vascular escurecido devido ao elevado número de microescleródio tanto dentro como fora da haste e tecidos radiculares. Mengistu et al. (2007).

A porcentagem de área interna infectada (AI%) foi obtida por meio da divisão da raiz e haste em 4 partes e aplicado uma nota de 0 a 100%, referente a área infectada por pontos negros (picnídios), caracterizando as cultivares como tolerantes aquelas com média inferior a 15%, moderadamente tolerantes com média entre 16 a 30%, moderadamente suscetíveis com média entre 31 a 60% e suscetíveis com média acima de 61%.

Análise estatística

Os dados obtidos a campo foram analisados em esquema fatorial simples, sendo o

primeiro fator os cinco ambientes e o segundo fator, as cultivares. Já para os ensaios em casa de vegetação, foram realizadas individualmente as análises de variância e quando a fonte de variação (cultivares) forão significativas, realizou-se o agrupamento de médias por meio do teste de agrupamento Scott-Knott (1974).

Posteriormente foi realizada a análise de correlação entre o método de infestação das sementes com *M. phaseolina* e os dados coletados a campo, sendo demonstradas apenas as correlações acima de 0.4 devido esta apresentar maior confiabilidade na interação campo vs casa de vegetação.

Todas as análises foram efetuadas com o auxílio do software GENES (CRUZ, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio em casa de vegetação

Método do palito de madeira

Os resultados obtidos não apresentaram eficiência na caracterização de sensibilidade das cultivares a *M. phaseolina*, não apresentando variabilidade entre as cultivares. Os resultados diferem dos obtidos por Ishikawa et al. (2018) ao avaliar os mesmos genótipos, que obtiveram diferença significativa entre as cultivares, sendo a cultivar BMX ELITE IPRO como a mais tolerante.

Em trabalhos realizados por Claudino (2013) com objetivo de identificar os melhores métodos de inoculação de *M. phaseolina* em mamoneira visando à seleção de genótipos tolerantes, constatou-se que o método de inoculação por meio do palito de madeira foi o menos laborioso, apresentando menor amplitude do erro padrão da média, no entanto a lesão apresentou menor comprimento médio, sendo em média 3 vezes menor do que as lesões resultantes dos outros métodos de inoculação estudados. A autora ressalta ainda que a utilização de tal método deve ser usada com cautela para evitar a subestimação dos resultados obtidos.

Método Ponteira (Corte da haste)

As cultivares em estudo se diferenciaram quanto ao comprimento da lesão ao utilizar o método da ponteira, formando 2 grupos distintos (Tabela 2). As cultivares BMX POTÊNCIA RR e NA 5909 RR apresentaram os maiores comprimentos de lesão, dentre as avaliadas,

diferenciando dos demais genótipos. Não é possível caracterizar a reação das cultivares à doença, uma vez que os intervalos do comprimento das lesões entre os genótipos foram pequenos.

Twizeyimana et al. (2012) ao avaliar 14 genótipos de soja diferentes ao utilizado neste estudo, conseguiram caracterizar a reação de tolerância entre eles. Esses mesmos autores concluíram que esse método possui alta eficiência na caracterização da tolerância.

Costamilan (2015) utilizando a mesma técnica de inoculação, obteve maiores variações em comparação ao obtidos neste trabalho, em que as cultivares BMX POTÊNCIA RR e V-MAX RR apresentaram a menor área do tecido doente.

Tabela 2. Comprimento da lesão em hastes de soja inoculadas com *Macrophomina phaseolina* pelo método da ponteira com corte da haste principal.

Cultivar	Lesão (cm)
BMX ELITE IPRO	1,44 A
GDM 15I029 IPRO	1,48 A
BMX APOLO RR	1,72 A
V-MAX RR	1,73 A
BMX TORNADO RR	1,79 A
BMX POTÊNCIA RR	2,08 B
NA 5909 RR	2,15 B

Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Método da camada de Micélio e grão de arroz

Os métodos não apresentaram eficiência na classificação dos genótipos, não apresentando variação quanto ao tamanho da raiz. Apesar de induzir os genótipos a estresse hídrico reduzindo o volume de água aplicada, o fungo não consegue se desenvolver e causar danos visíveis ao sistema radicular. Este método é altamente eficiente na caracterização de resistência parcial de soja a *Phytophthora sojae*. A baixa eficiência deste método pode estar relacionada ao desenvolvimento e capacidade patogênica da *M. phaseolina* em plantas no estágio vegetativo inicial, não sendo possível verificar diferenças, pois ocorreu escape da doença.

Infestação das sementes com *M. phaseolina*

Os dados obtidos quando utilizado o método da infestação das sementes com *M. phaseolina* possibilitaram o agrupamento das cultivares em diferentes níveis de reação ao patógeno (Tabela 3).

Em destaque neste método os genótipos BMX POTÊNCIA RR e V-MAX por apresentar os maiores índices de emergência relativa, sendo classificados como tolerantes.

As cultivares BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR e BMX ICONE IPRO apresentaram as menores emergências relativas, sendo classificadas como suscetíveis.

Tabela 3. Porcentagem de emergência relativa de cultivares inoculadas pelo método da infestação das sementes com *Macrophomina phaseolina*.

Genótipos	Emergência Relativa (%)	Reação
BMX APOLO RR	0.00 a	Suscetível
BMX TORNADO RR	0.00 a	Suscetível
BMX ELITE IPRO	7.33 a	Suscetível
GDM 15I029 IPRO	66.66 b	Mod. Tolerante ¹
NA 5909 RR	70.00 b	Mod. Tolerante
BMX POTÊNCIA RR	85.66 d	Tolerante
V-MAX RR	90.00 d	Tolerante

Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade., Mod. Tolerante¹

Em trabalhos realizados por Rosa (2006) com guandu, ao expor as sementes escarificadas de guandu por 24 horas em contato com o patógeno, foi o suficiente para detectar diferenças na tolerância ao patógeno, porém em um segundo momento, ao testar outros períodos de exposição, indicou 32 horas de exposição, permitindo melhor diferenciação de genótipos entre si.

Cruciol e Costa (2017) na avaliação de diferentes horas (48 e 72 horas) de exposição de sementes de soja das cultivares NA 7337 RR e CD 2737 RR, observaram o desenvolvimento de sintomas precoces, como redução na altura de plantas, diâmetro do colo, comprimento e largura de folhas.

Caracterização da reação de tolerância de cultivares de soja exposta a diferentes tempos ao fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram a interação entre os fatores estudados. De modo geral o acréscimo do tempo de exposição das sementes ao fungo ocasionou o decréscimo da emergência relativa. As cultivares previamente caracterizadas como moderadamente tolerantes por Ishikawa et al. (2017), BMX POTENCIA RR, demonstraram

comportamentos semelhantes indiferentemente do tempo de exposição das sementes ao fungo, no entanto a cultivar V-MAX RR se diferenciou dos resultados obtidos pelos autores, apresentando no presente estudo a reação de tolerância.

Tabela 4. Emergência relativa das sementes de soja expostas por diferentes tempos ao fungo *Macrophomina p.*

CULTIVAR	Classificação segundo Ishikawa et al. (2018)	TEMPO			
		12	24	36	48
BMX APOLO RR	Suscetível	62 Ab	5 Aa	0 Aa	0 Aa
BMX TORNADO RR	Suscetível	87 Ab	81 Bb	28 Aa	0 Aa
NA5909 RG	Suscetível	100 Bb	83 Ba	70 Ba	60 Ba
BMX POTÊNCIA RR	Mod. Tolerante ¹	80 Aa	77 Ba	80 Ba	76 Ba
V-MAX RR	Mod. Tolerante	96 Ba	90 Ba	83 Ba	80 Ca
BMX ELITE IPRO	Tolerante	100 Bc	58 Bb	16 Aa	7 Aa
GDM 15I029 IPRO	Tolerante	98 Bb	86 Bb	83 Ba	80 Ca
Média		89 D	68 C	51 B	43 A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Medias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

¹. Moderadamente tolerante.

Considerando a avaliação por tempo de exposição, verificou-se que às 12 e 24 horas não foi possível distinguir com eficiência a reação de tolerância das cultivares. Esse resultado favoreceu a recomendação da exposição das sementes ao patógeno por 36 ou 48 horas o que proporcionou uma caracterização eficiente das cultivares distinguindo-as em 2 e 3 grupos distintos, respectivamente.

Ao analisar a reação de tolerância de cada cultivar em separado em função do tempo de exposição, foi possível verificar que, às 36 e 48 horas de exposição ao patógeno, as cultivares BMX APOLO RR e BMX TORNADO RR apresentaram a mesma reação de tolerância observada por Ishikawa et al. (2018).

Independentemente do tempo de exposição ao patógeno a cultivar BMX POTÊNCIA RR apresentou a reação de moderadamente tolerante. A cultivar V-MAX RR apresentou-se como tolerante à *M. phaseolina*, contudo esse resultado não corroborou com o apresentado por Ishikawa et al. (2018), que a definiu como sendo moderadamente tolerante.

As cultivares BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR, NA 5909 RG, BMX ELITE IPRO e GDM 15I029 IPRO obtiveram acentuado decréscimo na emergência relativa ao longo do tempo de exposição das sementes ao fungo. Esse resultado reflete a sensibilidade ao fungo,

pois quanto mais tempo expostos, mais danos estes causam na semente, influenciando a emergência.

De acordo com Botelho et al. (2013) e Reis et al. (2014), que trabalharam com *Sclerotinia sclerotiorum*, a exposição direta das sementes em contato com o patógeno resultou em um maior número de sementes mortas e, consequentemente, na diminuição da porcentagem de emergência e emergência das plântulas devido aos danos causados nas sementes e principalmente à morte do embrião.

Os danos causados na semente podem estar associados à atividade das amilases produzidas pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (FERNANDES, et al. 2007), pois utiliza o amido da semente como substrato para seu crescimento, a semente produzirá a α -amilase na camada de aleurona e esta competirá pelo substrato (Amido) na conversão em açúcares, utilizados no crescimento do embrião (ARTECA, 1995; WANG e GRUSAK, 2005), como também o patógeno causa danos à integridade da membrana plasmática devido ações das enzimas de patogênicas.

A variação nas reações das diferentes cultivares de soja utilizados pode estar associado a proteínas envolvidas nos mecanismos de tolerância a patógenos. Algumas destas proteínas estão relacionadas a modificação das propriedades da matriz extracelular, inibitória de enzimas, ou apresenta atividade antimicrobianas, como tioninas, vicilinas e lectinas, quitinases, glucanases, proteínas amplamente encontradas nas sementes de soja (Carlini, 2002; Ng, 2004; Shewry e Lucas, 1997; Xavier-Filho, 1993).

O contato da *Macrophomina* com as sementes de soja pode ter induzido a produção das fitoalexina em especial a gliceolina nas sementes, sendo esta uma importante arma de defesa da planta, pois causa a inibição da ativação de enzimas fúngicas, granulação citoplasmática, desorganização do conteúdo celular, ruptura da membrana plasmática, defendendo a planta contra os ataques da *Macrophomina* (GOUVEIA et al., 2011).

Conforme apresentado na Tabela 4, verificou-se que após 36 horas de exposição das sementes ao patógeno, as cultivares estabilizaram a reação de sensibilidade ao patógeno, assim a exposição por 36 ou 48 horas é caracterizada como os melhores tempos para avaliação de tolerância a *Macrophomina*. Verificou-se que, nesses tempos, as cultivares BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR e BMX ELITE IPRO foram classificadas como suscetíveis, NA 5909 RR moderadamente suscetível, BMX POTÊNCIA RR como moderadamente tolerante e a cultivar V-MAX RR e GDM 15I029 IPRO como tolerante.

Diante do exposto, evidencia-se que a exposição das sementes à *M. phaseolina* por 36 ou 48 horas foi favorável para a caracterização das reações de tolerância. As cultivares com reações mais estáveis como BMX APOLO RR (suscetível), BMX POTÊNCIA RR (moderadamente tolerante) e V-MAX RR (tolerante) são recomendadas para serem utilizadas como padrão de tolerância em futuros trabalhos. Vale ressaltar que para estas cultivares a reação de tolerância é semelhante à apresentada por Ishikawa et al. (2018).

Número de sementes necessárias para a caracterização da reação de tolerâncias

Baseando-se nos resultados anteriores, adotou-se o tempo de 48 horas de exposição das sementes ao fungo. Os dados obtidos na caracterização do número ótimo de sementes apresentaram interação entre número de sementes e cultivar (Tabela 5).

Ao se analisar a reação das cultivares em cada tamanho de amostra, percebe-se a estabilidade dos dados. As cultivares BMX APOLO RR e BMX TORNADO RR foram classificadas no mesmo grupo sendo caracterizadas como suscetíveis, pois apresentaram emergência relativa abaixo de 20%.

Tabela 5. Emergência relativa de cultivares de soja em diferentes números de sementes expostas por 48 horas à *Macrophomina phaseolina*.

Cultivar	Classificação segundo Ishikawa et al. (2018)	Número de Sementes			
		15	30	45	60
BMX APOLO RR	Suscetível	0 Aa	0 Aa	3 Aa	0 Aa
BMX TORNADO RR	Suscetível	0 Aa	10 Bc	5 Ab	6 Aa
NA5909 RR	Suscetível	43 Ba	48 Ca	49 Ba	42 Ba
BMX POTÊNCIA RR	Mod. Tolerante	100 Ca	93 Da	94 Ca	97 Ca
V-MAX RR	Mod. Tolerante	100 Ca	100 Da	90 Ca	96 Ca
BMX ELITE IPRO	Tolerante	43 Ba	42 Ca	49 Ba	46 Ba
GDM15I029 IPRO	Tolerante	100 Ca	84 Db	87 Cb	97 Ca

Medias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferenciam entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Medias seguidas pela mesma letra Maiúscula na coluna não se diferenciam entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As cultivares NA5909 RR e BMX ELITE IPRO foram classificadas como moderadamente suscetíveis independentemente do número de sementes utilizadas. Os dados se assemelham ao observado por Ishikawa et al. (2018) para a cultivar NA5909 RR, mas se divergem quanto à reação de tolerâncias apresentada pela BMX ELITE IPRO.

Os genótipos GDM15I029 IPRO, BMX POTÊNCIA RR, V-MAX RR apresentaram a maior média, sendo estes classificados como tolerantes devido à emergência relativa maior que 80%. Resultados semelhantes foram observados por Costamilan, (2015) ao avaliar as cultivares

V-MAX RR e BMX POTÊNCIA RR, onde observou uma menor área do tecido infectado pelo fungo. A reação diverge ao encontrado por Ishikawa et al. (2018), visto que estes autores classificaram as cultivares V-MAX RR e BMX POTÊNCIA RR como moderadamente tolerantes.

No presente trabalho verificou-se que o número de 30 sementes seria o ideal para a avaliação da reação de tolerâncias das cultivares em estudo. Posteriormente, estudos envolvendo maior número de cultivares seriam válidos para a validação da metodologia apresentada, ressaltando que a qualidade fisiológica das sementes deva ser alta.

Vale ressaltar que o aumento acentuado no número de sementes poderá favorecer a redução da área de contato das sementes com o patógeno nas placas de petri e o resultado seria a classificação errônea da reação de tolerâncias devido ao escape das sementes/ plântulas à doença. Já o uso de menor número de sementes associado à baixa qualidade fisiológica das sementes poderá comprometer a classificação da reação de tolerâncias das cultivares, pois haverá a tendência da obtenção de baixos valores de emergência relativa, caracterizando a cultivar erroneamente como suscetível. Sendo recomendado a utilização de sementes com alto vigor, sem danos no tegumento para um resultado de alta qualidade.

Ensaio de campo

Houve interação entre os ambientes e as cultivares, para todas as características avaliadas, verificada nas análises de variância. Assim, o teste de agrupamento de médias foi empregado considerando a interação (Tabelas 6, 7 e 8).

Com relação à intensidade de coloração externa (ICE) (Tabela 6), as médias gerais entre ambientes apresentaram diferenças significativas. O ambiente 1 e 5 se destacam por apresentar as menores médias (3,64) e (3,86), se diferenciando dos ambientes 2, 3 e 4 por apresentarem as maiores médias (4,29; 4,20 e 4,11). Com relação a escala de reações de tolerância e suscetibilidade desenvolvida tomando como base as notas de ICE, verificou-se que todos os ambientes foram favoráveis para o desenvolvimento da doença, em que as médias foram superiores a 3,64.

Tabela 6. Notas da Intensidade da coloração externa (ICE), determinadas nas plantas de soja coletadas nos cinco ambientes (M).

CULTIVAR	M 1		M 2		M 3		M 4		M 5	
GDM 15I029 IPRO	3,00	Ab	3,12	Ab	3,67	Ab	2,00	Aa	3,20	Ab

BMX APOLO RR	3,91	Aa	4,21	Aa	3,67	Aa	4,05	Ca	4,50	Aa
BMX ELITE IPRO	4,21	Aa	4,54	Aa	4,20	Aa	4,76	Ca	3,27	Aa
NA 5909 RR	4,04	Aa	4,19	Aa	4,57	Aa	4,66	Ca	4,20	Aa
BMX POTÊNCIA RR	3,09	Aa	4,27	Aa	4,52	Aa	4,67	Ca	3,92	Aa
BMX TORNADO RR	3,78	Aa	4,72	Aa	4,43	Aa	5,00	Ca	4,20	Aa
V-MAX RR	3,45	Aa	5,00	Ab	4,40	Ab	3,66	Ba	3,75	Aa
Média M	3,64	A	4,29	B	4,20	B	4,11	B	3,86	A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

M1: Semeadura em Cambé-PR (16/10/2017).

M2: Semeadura em Cambé- PR (14/11/2017).

M3: Semeadura em Cambé - PR (09/12/2017).

M4: Semeadura em Formoso do Araguaia (14/06/2018).

M5: Semeadura em Londrina Formoso do Araguaia (30/06/2018).

O Genótipo GDM 15I029 IPRO se destacou dos demais por apresentar a menor média geral entre os ambientes. Considerando o ambiente 4 essa cultivar foi classificada como moderadamente tolerante. As demais cultivares independente do ambiente testado apresentaram comportamento suscetível.

Os resultados obtidos para a característica intensidade da coloração interna(ICI) encontram-se na Tabela 7. Verificou-se que os ambientes 1, 2, 3 e 5 não foram eficientes em discriminar as cultivares em cada ambiente, sendo todas elas classificadas como suscetíveis. Além disso, em média, os ambientes foram favoráveis para o desenvolvimento da doença, em que as notas médias foram acima de 3. Esta impossibilidade de discriminar a reação das cultivares pode estar relacionada à tolerância não ser completa das cultivares testadas, e o patógeno causar uma alta pressão devido o ambiente ser adequado para seu desenvolvimento.

No ambiente 4, utilizando a ICI, foi possível caracterizar a diferença entre cultivares, onde o genótipo GDM 15I029 IPRO apresentou a menor média, diferenciando das demais cultivares testadas. A cultivar V-MAX RR formou um agrupamento, diferenciando-se das cultivares BMX ELITE IPRO, NA 5909 RR, BMX POTÊNCIA RR BMX APOLO RR e BMX TORNADO RR. Apesar de estatisticamente o ambiente 4 formar 3 grupos distintos, apenas o genótipo GDM 15I029 IPRO foi classificado como moderadamente tolerante, sendo as demais cultivares classificadas como suscetíveis.

Tabela 7. Notas da intensidade da coloração interna (ICI) determinadas nas plantas de soja coletadas nos cinco ambientes (M).

CULTIVAR	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5
----------	-----	-----	-----	-----	-----

GDM 15I029 IPRO	3,75	Ab	3,67	Ab	3,80	Ab	2,00	Aa	3,13	Aa
BMX APOLO RR	4,28	Ab	4,68	Ab	3,27	Aa	4,60	Cb	4,25	Ab
BMX ELITE IPRO	4,23	Ab	4,90	Ab	3,60	Aa	4,70	Cb	3,47	Aa
NA 5909 RR	4,32	Aa	4,52	Aa	4,70	Aa	4,60	Ca	4,40	Aa
BMX POTÊNCIA RR	3,14	Aa	4,37	Aa	4,40	Aa	4,10	Ca	3,75	Aa
BMX TORNADO RR	3,75	Aa	4,57	Ab	3,87	Aa	5,00	Cb	4,00	Aa
V-MAX RR	3,84	Aa	4,95	Ab	3,90	Aa	3,70	Ba	3,67	Aa
Média M	3,90	A	4,52	B	3,93	A	4,01	A	3,81	A

Medias seguidas pela mesma letra minúscula na linha pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Medias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

M1: Semeadura em Cambé-PR (16/10/2017) - **M2:** Semeadura em Cambé- PR (14/11/2017) - **M3:** Semeadura em Cambé - PR (09/12/2017) - **M4:** Semeadura em Formoso do Araguaia (14/06/2018) - **M5:** Semeadura em Formoso do Araguaia (30/06/2018).

Os resultados obtidos para a característica porcentagem da área interna infectada estão apresentados na Tabela 8.

No ambiente 2 os genótipos GDM 15I029 IPRO e NA 5909 RR apresentaram as menores médias, se diferenciando das cultivares BMX ELITE IPRO, BMX POTÊNCIA RR, BMX TORNADO RR e V-MAX RR. Já no ambiente 4 as cultivares V-MAX RR e GDM 15I029 IPRO apresentaram as menores médias, diferenciando-se das demais cultivares. Nos demais ambientes, não houve diferença significativa.

Com relação a reação, as cultivares V-MAX RR e BMX POTÊNCIA RR no ambiente 1, GDM 15I029 IPRO nos ambientes 2, 3 e 4 apresentaram as menores médias sendo consideradas moderadamente suscetíveis.

Tabela 8. Porcentagem da área interna infectada (AI%) determinadas nas plantas de soja coletadas nos cinco ambientes (M).

CULTIVAR	M 1		M 2		M 3		M 4		M 5	
GDM 15I029 IPRO	63,8	Aa	47,2	Aa	59,0	Aa	55,7	Aa	64,0	Aa
BMX APOLO RR	71,3	Aa	68,0	Ba	57,3	Aa	73,8	Ba	76,6	Aa
BMX ELITE IPRO	68,3	Aa	68,0	Ba	68,6	Aa	80,2	Ba	61,0	Aa
NA 5909 RR	65,2	Aa	62,2	Aa	77,6	Aa	68,1	Ba	77,0	Aa
BMX POTÊNCIA RR	56,7	Aa	75,4	Ba	69,6	Aa	69,5	Ba	68,3	Aa
BMX TORNADO RR	63,5	Aa	74,2	Bb	63,0	Aa	78,1	Bb	81,0	Ab
V-MAX RR	46,5	Aa	72,0	Bb	59,3	Aa	46,6	Aa	78,3	Ab

Média M	62,1	A	65,1	A	65,0	A	67,4	A	72,19	A
----------------	-------------	----------	-------------	----------	-------------	----------	-------------	----------	--------------	----------

Medias seguidas pela mesma letra minúscula na linha pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Medias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

M1: Semeadura em Cambé-PR (16/10/2017) - **M2:** Semeadura em Cambé- PR (14/11/2017) - **M3:** Semeadura em Cambé - PR (09/12/2017) - **M4:** Semeadura em Formoso do Araguaia (14/06/2018) - **M5:** Semeadura em Formoso do Araguaia (30/06/2018).

Apesar deste trabalho ter sido realizado a campo, verificou-se a ocorrência da uniformidade na distribuição do inóculo, de temperaturas máximas diárias próximas de 35° C e de períodos de estiagem concentrados em todos os ambientes, o que favoreceu o desenvolvimento do fungo e aparecimento da doença conforme descrito anteriormente.

A reação de suscetibilidade das cultivares BMX TORNADO RR e BMX APOLO RR, neste trabalho são semelhantes aos resultados obtidos em experimento a campo realizado por Ishikawa et al., (2018). No entanto os resultados divergem em relação as cultivares BMX POTÊNCIA RR E BMX ELITE IPRO em que, segundo os autores, possuem reação de moderadamente tolerante e tolerante, respectivamente, sendo observado no presente trabalho a reação de moderadamente tolerante (BMX POTÊNCIA RR) e suscetíveis (BMX ELITE IPRO) nos diferentes ambientes testados.

Uma das explicações para tal divergência na classificação dessas cultivares está no fato de que os autores avaliaram a incidência de plantas doentes em relação ao total de plantas na parcela, analisando os sintomas: maturação desuniforme, murcha e retenção de folhas e enchimento deficiente dos grãos, podendo haver um escape de avaliação, pois não foi avaliando diretamente a doença e sim os sintomas, podendo este ser de outra origem.

Em trabalho realizado por Costamilan, (2015) em casa de vegetação, observou-se que as cultivares V-MAX RR e BMX POTÊNCIA RR apresentaram a menor área do tecido da haste doente, sendo caracterizadas como moderadamente suscetíveis. Já a cultivar BMX APOLO RR foi classificada como suscetível por apresentar maior área de tecido infectado com a doença.

Comparação entre os ensaios de campo e o método infestação das sementes com *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

A análise de correlação entre os dados obtidos a campo e os métodos utilizados em casa de vegetação foram contrastados por meio da análise de correlação de Pearson. Contudo, apenas utilizou-se os dados obtidos no ensaio com o método infestação das sementes com *Macrophomina phaseolina*, pois o mesmo apresentou a melhor caracterização entre os

genótipos testados. Na Tabela 9 foi apresentada apenas a análise de correlação superior a 0.4 pois apresenta maior confiabilidade dos dados.

Tabela 9. Coeficiente de correlação de Pearson (r), e seu respectivo p-valor para o teste t de Student, entre os dados obtidos das variáveis analisadas a campo e o método da infestação das sementes com *Macrophomina phaseolina*.

CARACTERÍSTICAS	Correlação de Pearson	
	R	p-valor
ICI_M1 x IS	0,46	43,5515 ^{ns}
ICE_M1 x IS	0,66	19,1257 ^{ns}
AI_M1 x IS	0,77	9,9849 ^{ns}
AI_M5 x IS	0,81	2,5956 [*]

ICI_M1: Intensidade da coloração interna obtida no ensaio implantado no estado do Paraná (Ambiente 1); ICE_M1: Intensidade da coloração interna obtida no ensaio implantado no estado do Paraná (Ambiente 1); AI_M1: Área interna infectada obtida no ensaio implantado no estado do Paraná (Ambiente 1); AI_M5: Área interna infectada obtida no ensaio implantado no estado do Tocantins (Ambiente 5).

IS: Infestação das sementes.

*Diferença significativa, a 5 % de probabilidade.

Os resultados obtidos na análise de correlação entre a casa de vegetação e a campo são superiores aos observados por Coser et al. (2017), onde obtiveram correlação significativa, contudo de magnitude negativa ($r = -0,12$).

A baixa correlação entre os experimentos de campo e em casa de vegetação é comumente relatada na literatura (HARTMAN et al., 2014). Fatores ambientais como a temperatura e umidade, bem como a maturação das plantas, têm um grande efeito sobre a severidade da *M. phaseolina* e devem ser considerados quando se correlacionam estudos de campo e casa de vegetação que avaliam um conjunto de indivíduos com maturação divergentes (PAWLOWSKI et al., 2015).

Divergências são comumente relatadas na literatura entre o campo e casa de vegetação ou laboratório, devido às diferenças de condições ambientais, de fisiologia da planta no momento da inoculação e avaliação, o que reflete em diferenças na expressão de genes de tolerância (COSER et al. 2017).

As plantas nos ensaios a campo são indiretamente inoculadas, colocando o inóculo com a semente durante o plantio, o conteúdo inicial do inóculo do solo geralmente não é quantificado, como também o estágio fenológico de avaliação das plantas é diferente do avaliado em casa de vegetação (COSER et al. 2017).

No trabalho realizado por Coser et al. (2017), ficou evidente a complexibilidade dos mecanismos de defesa da doença e sua interação com o ambiente. Os autores identificaram cinco locos relacionados à defesa de plantas a campo e oito locos relacionados à defesa em casa

de vegetação, sendo que não ocorreu sobreposição dos locos identificados, indicando que há diferença de mecanismos de defesa envolvidos na expressão de tolerância à *M. phaseolina* quando as plantas são inoculadas a campo e em casa de vegetação.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, no experimento a campo se destaca o genótipo GDM 15I029 IPRO, por apresentar as menores médias nos danos causados por *Macrophomina*.

O método de inoculação que apresentou a melhor caracterização foi a infestação das sementes com *Macrophomina phaseolina*, sendo o tempo de contato ideal de 36 a 48 horas, utilizando 30 sementes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M.; GAUDÊNCIO, C. A. (2014) ***Macrophomina phaseolina* em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55 p

CLAUDINO, M. R.; **Métodos de inoculação de *macrophomina phaseolina* em mamoneira visando à seleção de genótipos resistentes**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, v. 9 – SF. 17/18, n. 10 - Décimo levantamento | Janeiro 2019.

COSER SM, CHOWDA REDDY RV, ZHANG J. Genetic architecture of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance in soybean revealed using a diverse panel. **Frontiers in Plant Science**. 2017

COSTAMILAN, L. M.; PANISSON, F. T.; CLEBSCH, C. C. Seleção de isolado de *Macrophomina phaseolina* e avaliação de tolerancia em soja. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**, 7.; MERCOSOJA 2015, 2015, Florianópolis. Tecnologia e mercado global: perspectivas para soja: anais. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 174. 1 CD-ROM.

CRUCIOL, G.C.D.; COSTA, M.L.N. Influência de metodologias de inoculação de *Macrophomina phaseolina* no desempenho de cultivares de soja. *Summa Phytopathologica*, v.43, n.4, p.337-343, 2017.

DORRANCE, A.E.; McCLURE, S.A. e ST. MARTIN, S.K. Effect of partial resistance on Phytophthora stem rot incidence and yield of soybean in Ohio. *Plant Disease*, v. 87, p.308-312, 2003.

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R **Doenças da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA, CNPSO, 1979. 42p. (EMBRAPA, CNPSO, Circular técnica, 1)

HADDAD, P. E.; LEITE, L. G.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Selection of Trichoderma spp. strains for the control of sclerotiorum in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.

HARTMAN, Y., HOOFTMAN, D. A., UWIMANA, B., SCHRANZ, M. E., VAN DE WIEL, C. C., SMULDERS, M. J., et al. (2014). Abiotic stress QTL in lettuce crop-wild hybrids: comparing greenhouse and field experiments. *Ecol. Evol.* 4, 2395–2409. doi: 10.1002/ece3.1060. 2014

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v.35, n.3, p.271-276, 2013

GOUVEA, A.; ZANOTTI, J.; LUCKMANN, D.; PIZZATTO, M.; MAZARO, S. M.; POSSENTI, J. C. Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo. *Rev. Bras. de Agroecologia*, v.6, n.2, p. 70-78, 2011.

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

LUNA M.P.R, MUELLER D., MENGISTU A., SINGH A. K., HARTMAN G.L., WISE K.A.; Advancing Our Understanding of Charcoal Rot in Soybeans, **Journal of Integrated Pest Management**, Volume 8, Issue 1, 1 January 2017, 8.

LODHA, S. Effect of sources of inoculum on population dynamic of *Macrophomina phaseolina* and disease intensity in clusterbean **Indian Phytopathology**, New Delhi, v 51, n.2 p 175-179, 1998.

MENGISTU, A.; ARELLI, P.; BOND, J.P.; NELSON, R.; RUPE, J.B.; SHANNON, G.J.; WRATHER, A.J. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. **Plant Management Network**, mar. 2013.

MENGISTU, A.; ARELLI, P.A.; BOND, J.P.; SHANNON, G.J.; WRATHER, A.J.; RUPE, J.B.; CHEN, P.; LITTLE, C.R.; CANADAY, C.H.; NEWMAN, M.A., PANTALONE, V.R. Evaluation of soybean genotypes for resistance to Charcoal rot. **Plant Management Network**, v26 set. 2011.

MENGISTU, A.; RAY, J.D.; SMITH, J.R.; PARIS, R.L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony forming unit index. **Crop Science**, v. 47, p. 2453-2461, 2007

PARIS, R.L.; MENGISTU, A.; TYLER, J.M.; SMITH, J.R. Registration of soybean germplasm line DT97-4290 with moderate resistance to Charcoal rot. **Crop Science**, v. 46, p. 2324, 2006.

PAWLOWSKI, M. L., HILL, C. B., AND HARTMAN, G. L. (2015). Resistance to charcoal rot identified in ancestral soybean germplasm. **Crop Sci.** 55:1230. doi: 10.2135/cropsci2014.10.0687, 2015

RODRIGUES, G. F.. Inoculação artificial de *Fusarium oxysporum* em sementes de *Phaseolus vulgaris*. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 12, n. 7, 2016.

ROSA, J. Seleção de genótipos de guandu para tolerancia a *Macrophomina phaseolina* e esporulação do fungo. 2006. 60f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2006.

TESSO, T.; EJETA, G. Stalk strength and reaction to infection by *Macrophomina phaseolina* of brown midrib maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). **Field Crops Research**. Estados Unidos, v.120, p.271-275, 2011.

TWIZEYIMANA, M.; HILL, C. B.; PAWLOWSKI, M.; PAUL, C. A cut-stem inoculation technique to evaluate soybean for resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 8, p. 1210-1215, 2012.

WRATHER JA, ANDERSON TR, ARSYAD DM, GAI J, PLOPER LD, PORTAPUGLIA A, RAM HH, YORINORI JT. (1997) Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1994. **Plant Dis** 81:107–110, 1997

WRATHER, A., G. SHANNON, R. BALARDIN, L. CARREGAL, R. ESCOBAR, G. K. GUPTA, Z. MA, W. MOREL, D. PLOPER, AND A. TENUTA. 2010. Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries. **Plant Health Progress**, Online, 2010.

WYLLIE TD. Charcoal rot of soybean status. In:Wyllie TD, Scott DH. (eds) Soybean Diseases of the North Central Region. St. Paul. MN, USA, **APS Press**, pp 106–113. 1998

YOKOMIZO, G. K. I.; DUARTE, J. B.; VELLO, N. A.; UNFRIED, J. R. Análise AMMI da produtividade de grãos em linhagens de soja selecionadas para tolerancia à ferrugem asiática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 10, p. 1376–1384, 2013.

CAPÍTULO 2: Seleção de genótipos de soja para tolerância a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

RESUMO

Diversos são os fatores que limitam os altos rendimentos da soja, entre esses as doenças se encontram entre os mais importantes e de difícil controle. Dentre as doenças se destaca a podridão de carvão causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* responsável por perdas de milhões de toneladas. O método mais prático e econômico para controlar a podridão de carvão é por meio do uso de cultivares tolerantes, no entanto, não há relatos de cultivares de soja tolerante, somente moderadamente tolerante. Com base no exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de tolerância de diferentes cultivares de soja a *M. phaseolina*, visando selecionar os indivíduos para a introdução no programa de melhoramento. Os ensaios para caracterização dos genótipos de soja visando tolerância a *M. phaseolina* foram realizados em ambiente controlado em casa de vegetação e laboratório na estação experimental da empresa GDM seeds (Cambé-PR). A inoculação foi realizada pela infestação das sementes, utilizando 69 genótipos de soja. A avaliação ocorreu após 8 dias após a inoculação, os dados foram transformados em emergência relativa e posteriormente realizou-se a análise de variância e agrupamento por Scott-Knott. Os resultados caracterizaram eficientemente a reação a *Macrophomina phaseolina*, onde a maior porcentagem dos genótipos foi classificada como tolerante (50%), apenas 14% foi caracterizado como suscetível, 10% modernamente suscetível e 26% dos genótipos testados apresentaram moderada tolerância. Com base nos resultados, os genótipos BMX ZEUS IPRO, DM2200, BMX BONUS IPRO, S100, BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR, BMX MAGNA RR, P 95R51 RR apresentaram reação de suscetibilidade e as cultivares CENTENNIAL, DM 3565, BMX GARRA IPRO, L 93, BRS 282, BMX POTÊNCIA RR, V-MAX RR, BRS 316 RR apresentaram a maior média de emergência relativa e consequentemente foram classificadas como tolerantes, podendo ser utilizadas como padrões em futuros ensaios de fitomelhoramento.

Palavra-chave: Fitomelhoramento; podridão de carvão; *Glycine max* (L.)

ABSTRACT

Several factors limit the high yields of soybean, among which diseases are among the most important and difficult to control. Among the diseases stands out the charcoal rot caused by the fungus *Macrophomina phaseolina* responsible for losses of millions of tons. The most practical and economical method for controlling charcoal rot is through the use of tolerant cultivars, however, not reports of tolerant, only moderately tolerant soybean cultivars. Based on the above the objective of this work was to evaluate the tolerance reaction of different soybean cultivars to *M. phaseolina*, aiming to select the individuals for introduction in the breeding program. The tests for characterization of soybean genotypes for tolerance to *M. phaseolina* were carried out in a controlled environment in greenhouse and laboratory at the experimental station of GDM seeds (Cambé-PR). Inoculation was performed by seed infestation using 69 soybean genotypes. The evaluation took place 8 days after inoculation, the data were transformed into relative emergency and afterwards the analysis of variance and clustering by Scott-Knott was performed. The results efficiently characterized the reaction to *Macrophomina phaseolina*, the highest percentage of genotypes was classified as tolerant (50%), only 14% was characterized as susceptible, 10% modern susceptibility and 26% of the tested genotypes showed moderately tolerance. Based on the results the genotypes BMX ZEUS IPRO, DM2200, BMX BONUS IPRO, S100, BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR, BMX MAGNA RR, P 95R51 RR that showed Susceptibility reaction and the cultivars CENTENNIAL, DM 3565, BMX GARRA IPRO, L 93, BRS 282, BMX RR power, V-MAX RR, BRS 316 RR for presenting the highest relative emergency average and consequently classified as tolerant and can be used as standards in future phyto-improvement trials.

Keywords: Plant Breeding; charcoal rot; *Glycine max* (L.)

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das espécies de maior destaque no cenário mundial, sendo considerada o principal produto do agronegócio brasileiro, sendo esta um dos principais produtos de exportação. Atualmente são plantadas no Brasil cerca de 35 milhões de hectares de soja, com produção estimada para a safra 2018/19 de aproximadamente 114 milhões de Tonelada (CONAB, 2019).

Como em várias outras culturas, a produtividade da soja é influenciada por diversos fatores, sendo estes relacionados a estresses abióticos e bióticos. Em relação aos fatores bióticos, atenção especial tem sido dada à algumas doenças de grande importância (FRITSCHÉ-NETO e BORÉM, 2012), como por exemplo a Podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* Tass. (Goid.).

O patógeno *Macrophomina phaseolina* Tass. (Goid.) é capaz de infectar mais de 500 espécies diferentes de planta, sendo considerado um problema de alto impacto em países tropicais e subtropicais com clima árido e semiárido na África, Ásia, Europa e América (DHINGRA e SINCLAIR, 1978; ABAWI e PASTOR-CORRALES, 1990; KAUR et al. 2012)

O fungo é habitante natural do solo, possui grande variabilidade patogênica e alta capacidade de sobrevivência sob condições adversas. É favorecido por condições de alta temperatura e baixa umidade do solo, ou seja, clima quente e períodos de seca (KAUR et al. 2012). De acordo com Gupta et al., (2012), a doença pode causar perdas de 30-50% sendo considerada uma das principais doenças da cultura da soja (WRATHER et al. 2010).

O controle dessa enfermidade é difícil devido a infecção e desenvolvimento inicial ocorrerem abaixo do nível do solo, sendo notado apenas quando atingem estados avançados (WHEELER et al.,2001).

O controle mais prático e econômico seria a utilização de cultivares tolerantes, porém há apenas relatos de apenas duas cultivares tolerantes a *Macrophomina* descrita por Ishikawa et al. (2018), sendo estas a GDM 15I029 IPRO e a BMX ELITE IPRO. Apesar da identificação das fontes tolerante é necessária a realização do *screening* para a caracterização de novos indivíduos com menor suscetibilidade à *M. phaseolina*.

Dessa forma, no presente estudo objetivou-se caracterizar a reação de tolerância de diferentes genótipos de soja à *Macrophomina phaseolina*, para posterior introdução em programas de melhoramento.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio para caracterização dos genótipos de soja visando tolerância à *M. phaseolina* foram realizados em ambientes controlados em casa de vegetação e em laboratório na estação experimental da empresa GDM seeds no município de Cambé, Paraná. A inoculação foi realizada pela infestação das sementes de acordo com a metodologia descrita por Rosa (2006) com algumas modificações, conforme apresentado posteriormente, utilizando 69 genótipos (Tabela 10).

Tabela 10. Genótipos utilizados para fins de caracterização da reação de tolerância à *Macrophomina phaseolina*.

GENÓTIPOS	GENÓTIPOS	GENÓTIPOS
BMX ZEUS IPRO	TMG 132	GDM 15I029 IPRO
DM2200	MG/BR 46	CD 201
	CONQUISTA	
BMX BÔNUS IPRO	BMX ATIVA RR	M 7739
S100 (PI 548488)	DM 8372	DM 4800
BMX APOLO RR	PALMETO (PI 548480)	PI88788
BMX TORNADO RR	C.N.S	SUGÃOZAIRAI (PI 230977)
BMX MAGNA RR	ANTA 82 RR	TMG 115
P 95R51 RR	HOOD (PI 548980)	ROANOKE (PI 548485)
DM 6563 IPRO	DAVIS (PI 553039)	JACKSON (PI 548657)
BMX.VANGUARDA.IPRO	HARSOY	TRACY (PI 548983)
DM 54I52 IPRO	NA 3731	CD 208
DM 66I68 IPRO	PRICHARD (PI 612157)	DT2000 (PI635999)
NA 5909RR	CHOSKA (PI 553050)	PI 595099
NT 15	KIRBY (PI 548665)	CENTENNIAL (PI 548975)
RPS 8	HARO 16	DM 3565
BMX ELITE IPRO	BRS CELESTE	BMX GARRA IPRO
CD202	BRS VALIOSA RR	BMX POTÊNCIARR
ALTONA (PI 548504)	EPPS (PI 548977)	BRS 282
BMX DESAFIO IPRO	HILL (PI 548654)	L 93 3312
M 8001	TORCACITA 58	BRS 316 RR
DM 3810	M 6410 IPRO	V-MAX RR
M 6210 IPRO	NA 4413 RG	
BMX PONTA IPRO	BMX TURBO RR	
TMG 7062 IPRO	BMX VALENTE IPRO	

O isolado de *M. phaseolina* utilizado nos ensaios pertence ao Laboratório de Fitopatologia da empresa GDM seeds, sendo o mesmo utilizado no trabalho de Ishikawa et al. (2017). O isolado foi multiplicado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) incubado a 26°C por um período de cinco dias.

Para a instalação do experimento todas as sementes foram desinfetadas utilizando-se

uma solução com hipoclorito a 1%. As sementes foram imergidas por 60 segundos na solução e em seguida submetidas à três lavagens em água destilada. Posteriormente as sementes foram depositadas sobre papel filtro esterilizado para secagem à temperatura ambiente.

Em cada placa, sobre o micélio do fungo foram dispostas 30 sementes de cada cultivar, em camada simples. Posteriormente as placas com as sementes foram mantidas em B.O.D. a 25°C, com fotoperíodo de 12h por 48 horas.

Além disso foram utilizadas testemunhas de cada cultivar sem a exposição ao fungo, visando confirmar a ocorrência da doença nos ensaios e obter a emergência de cada cultivar sem a presença do fungo.

Após a exposição ao fungo, as sementes foram depositadas em vasos de 2 litros contendo areia autoclavada e mantidas em casa de vegetação, com temperatura controlada variando de 28 a 30 °C, por um período de oito dias até que ocorresse a avaliação da característica.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado composto por 69 cultivares com três repetições. Oito dias após a semeadura, as cultivares foram caracterizadas quanto à porcentagem de emergência em relação à emergência das testemunhas (cultivares não inoculadas), sendo denominada de emergência relativa (ER). Posteriormente, baseado na ER, classificou-se os genótipos quanto à reação de tolerância em: Suscetível, $ER \leq 20\%$; Moderadamente Suscetível $20\% < ER \leq 50\%$; Moderadamente Tolerante, $50\% < ER \leq 80\%$; e, Tolerante, $ER > 80\%$.

Os dados foram submetidos à análise de variância, as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013). Para a classificação quanto à reação de tolerância, as médias foram submetidas à uma análise descritiva com base nas notas de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias obtidas apresentaram diferença significativa (Tabela 11), classificando os genótipos em 5 grupos distintos.

O primeiro grupo formado é representado pelos genótipos que apresentaram a menor média, sendo estas as cultivares BMX ZEUS IPRO, DM2200, BMX BÔNUS IPRO, S100, BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR, BMX MAGNA RR, P 95R51 RR que apresentaram reação de suscetibilidade e as cultivares DM 54i52 IPRO, BMX ALVO IPRO, que apresentaram moderada suscetibilidade.

No grupo 5 se destacam as cultivares CENTENNIAL, DM 3565, BMX GARRA IPRO, L 93, BRS 282, BMX POTENCIA RR, V-MAX RR, BRS 316 RR que apresentaram a maior média de emergência relativa e consequentemente foram classificadas com a reação de tolerância (Tabela 11).

Tabela 11. Emergência relativa (GR%) e reação dos genótipos de soja a *macrophomina phaseolina*.

GENÓTIPO	E %	SK	R	GENÓTIPO	E %	SK	R
BMX ZEUS IPRO	0	A	S	PRICHARD (PI 612157)	83	E	T
DM2200	0	A	S	CHOSKA	83	E	T
BMX BONUS IPTO	2	A	S	KIRBY (PI 548665)	83	E	T
S100 (PI 548488)	5	A	S	HARO 16	86	E	T
BMX APOLO RR	6	A	S	BRS CELESTE	87	E	T
BMX TORNADO RR	12	A	S	BRS.VALIOSA.RR	88	E	T
BMX MAGNA RR	13	A	S	EPPS (PI 548977)	88	E	T
P 95R51 RR	18	B	S	HILL	88	E	T
DM 6563 IPRO	19	B	S	TORCACITA	88	E	T
BMX.VANGUARDA.IPRO	20	B	S	M 6410 IPRO	89	E	T
ROANOKE (PI 548485)	24	B	MS	NA 4413 RG	89	E	T
DM 66I68 IPRO	42	C	MS	BMX TURBO RR	90	E	T
NA 5909RR	42	C	MS	BMX VALENTE IPRO	90	E	T
NT 15	47	C	MS	GDM 15I029 IPRO	90	E	T
RPS 8	48	C	MS	CD 201	91	E	T
BMX ELITE IPRO	52	C	MT	M 7739	91	E	T
CD202	54	D	MT	DM 4800	92	E	T
ALTONA (PI 548504)	58	D	MT	PI88788	92	E	T
BMX DESAFIO IPRO	58	D	MT	SUGÃOZAIRAI (PI 230977)	92	E	T
M 8001	59	D	MT	TMG 115	92	E	T
DM 3810	60	D	MT	JACKSON (PI 548657)	94	E	T
M 6210 IPRO	60	D	MT	TRACY (PI548983)	94	E	T
BMX PONTA IPRO	61	D	MT	CD 208	95	E	T
TMG 7062 IPRO	65	D	MT	DT2000 (PI635999)	95	E	T
TMG 132	67	D	MT	PI 595099	95	E	T
MG/BR 46 CONQUISTA	68	D	MT	CENTENNIAL (PI 548975)	96	E	T
BMX ATIVA RR	69	D	MT	DM 3565	96	E	T
DM 8372	69	D	MT	BMX GARRA IPRO	97	E	T
PALMETO (PI 548480)	69	D	MT	BMX POTENCIARR	97	E	T
CNS	69	D	MT	BRS 282	97	E	T
ANTA 82 RR	73	D	MT	L 93 3312	97	E	T
HOOD (PI 548980)	75	D	MT	BRS 316 RR	98	E	T
DAVIS (PI 553039)	78	D	MT	V-MAX RR	98	E	T
HARSOY	82	E	T				
NA 3731	82	E	T				

SK: Medias seguidas pela mesma letra minúscula não diferenciam entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

R¹: Reação a Doença, E%: Emergência Relativa %, SK: Scott-Knott.

Os resultados obtidos por Bizari (2018) ao testar diferentes métodos de inoculação, demonstraram que as cultivares V-MAX RR e BMX Potência RR foram classificadas como suscetíveis, portanto, divergentes em relação aos obtidos no presente trabalho.

Ishikawa et al. (2018) avaliaram a reação de tolerância quanto à *M. phaseolina* para sete cultivares de soja, apresentando similaridade com alguns resultados obtidos no presente trabalho. Os autores demonstraram que ao utilizar outros métodos de avaliação da reação de tolerância, as cultivares BMX APOLO IPRO e BMX TORNADO RR apresentam suscetibilidade. Para as demais cultivares, os resultados apresentados foram divergentes quanto à reação de tolerância.

Verifica-se que 26% dos genótipos foram classificados como moderadamente tolerantes, 10% como moderadamente suscetíveis, 14% como suscetíveis e 50% como tolerantes. Vinholes (2014) ao avaliar 169 cultivares de soja quanto à tolerância à *M. phaseolina*, obteve a formação de quatro grupos, sendo que o grupo com o maior número de cultivares (aproximadamente 63% das cultivares) foi caracterizado por apresentar a menor mortalidade de plantas e consequentemente maior tolerância em comparação aos demais grupos. Os resultados se assemelham aos obtidos neste trabalho, com a média dos tolerantes superior a de suscetíveis.

A caracterização da reação de tolerância é importante para os programas de melhoramento na obtenção de novas cultivares tolerantes a *Macrophomina phaseolina*, na utilização em ensaios de fitomelhoramento, sendo estes padrões de tolerância. Na busca de novas fontes de tolerância para *M. phaseolina*, foram estudadas por Paris et al., 2006; Mengistu et al., 2011 e Mengistu et al., 2013 realizando *screening* em genótipos de soja e não obtiveram resultados satisfatórios, devido à obtenção somente de genótipos classificados como moderadamente tolerantes.

Ishikawa et al. (2018) em estudos em casa de vegetação e a campo conseguiu descrever duas cultivares com reação de tolerância, sendo estas GDM 15I029 IPRO e BMX ELITE IPRO.

Os resultados obtidos por Noronha et. al. (2012), ao avaliar a reação de 35 genótipos de feijão caupi à *M. phaseolina*, demonstraram que apenas a cultivar BRS Pajeú foi considerada tolerante, evidenciando a dificuldade na obtenção de fontes genéticas com tolerância a este patógeno. Lima et al. (2012) avaliaram a reação à *M. phaseolina* de 20 genótipos de feijão-caupi, semeados em vasos contendo solo infestado com sementes de crotalária colonizada pelo fungo. Esses autores observaram diferença significativa quanto à reação de tolerância entre os genótipos, contudo, apenas um genótipo foi considerado tolerante.

No presente estudo 50% dos genótipos foram classificados como tolerantes, estes resultados podem estar relacionados ao grande número de Pi'S utilizadas na caracterização, pois as mesmas apresentam maior rusticidade do que as cultivares presentes no mercado,

podendo assim ser utilizadas para estudos posteriores de identificação de genes de tolerância à *M. phaseolina*. Uma vez que a herança da tolerância à *M. phaseolina* em soja é poligênica é controlada por cinco genes (BIZARI, 2018).

Ao se analisar as reações dos genótipos utilizados nesta caracterização a outras doenças, nota-se que os genótipos BMX ZEUS IPRO, BMX BÔNUS IPRO, S-100 (PI 548488), P95R51RR apresentaram suscetibilidade a *Macrophomina*, como também são reconhecidas por sua suscetibilidade as nematoides de galha (*Meloidogyne Incógnita* e *Javanica*) e cisto (*Heterodera glycines*). Já os genótipos PI 595099, Centennial (PI 548975), BRS 282, BRS 316 RR apresentaram a reação de tolerância a *Macrophomina*, sendo estas reconhecidas na literatura como tolerantes aos nematoides (*Meloidogyne Incógnita* e *Javanica*) e cisto (*Heterodera glycines*).

Pode haver uma relação entre a tolerância de *Macrophomina phaseolina* e a tolerância aos nematoides *Meloidogyne Incógnita* e *Javanica*, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus brachyurus*, pois em estudos realizados por WYSMIERSKI, (2010) ao avaliar a contribuição genética dos ancestrais da soja às cultivares brasileiras, obteve resultados que justifica tal hipótese, sendo os genótipos CNS, S-100, Roanoke responsável por 45,7% da base genética da soja no Brasil, sendo esta suscetível aos nematoides. A utilização das PI's resistentes aos nematoides começou a ser maciçamente incorporada nas hibridações a partir dos anos 2000, com o aumento crescente dos danos ao causados por estes.

Vale salientar que o autor excluiu das análises as cultivares originárias de programas de melhoramento estrangeiro introduzidas no Brasil, podendo estas a ser fonte de alelos que conferem a tolerância a *Macrophomina phaseolina*.

Os resultados de tolerância obtidos no presente trabalho podem estar relacionados com a mudança desta base genética, pois houve a introdução de novas cultivares oriundas da Argentina, Paraguai, Chile, Colômbia, sendo assim, novos alelos introduzidos.

Vale ressaltar que a metodologia adotada no presente estudo provavelmente favoreceu a expressão dos genes de tolerância presentes nas cultivares classificadas como tolerantes, visto que a metodologia favorece o desenvolvimento de maior severidade da doença. BOTELHO et al. (2013) e REIS et al. (2014), relataram que, ao expor as sementes em contato direto com o fungo, se favorece a maior mortalidade das mesmas e, conseqüentemente, a maior redução na porcentagem de germinação e emergência das plântulas, devido a danos diretos no embrião.

CONCLUSÃO

As cultivares utilizadas, por meio da metodologia de inoculação imposta foram classificadas em diferentes reações de tolerância à *Macrophomina phaseolina*.

Os genótipos L 93-3312, BRS 282, M 6410 IPRO, BRS 316 RR, V-MAX RR e BMX POTÊNCIA RR foram classificados como tolerantes podendo ser utilizados em estudos posteriores de identificação de genes de tolerância à *M. phaseolina*, como também na utilização como testemunhas tolerantes em testes fitopatológicos.

REFERÊNCIA

ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Seed transmission and effect of fungicide treatments against *Macrophomina phaseolina* in dry edible beans. **Turrialba**, v.40, p.334-339, 1990.

BIZARI, E.H. **Estudo de herança genética da tolerancia à *Macrophomina phaseolina* na cultura da soja**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

BOTELHO, L. S. et al. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of seed Science**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 153-160, 2013. doi: 10.1590/S2317-15372013000200003.

CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, v. 6 Safra 2018/19 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-126 Janeiro 2019.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. 1978. 166 f. Monografia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de Estresses Bióticos**. 2012. 240 p.

GUPTA, G. K.; SHARMA, 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.

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

KAUR, S.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VALLAD, G. E.; CHAND, R.; CHAUHAN, V. B.; Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Mycobiology**, v.38, p.136-151, 2012

LIMA, L.R.L.; SOUSA, C.M.B.; PIRES, C.J.; SOUSA, M.B.; NORONHA, M.A.; LOPES, A.C.A.; SILVA, K.J.D.; ROCHA, M.M. Avaliação de germoplasma de feijão-caupi de porte ereto e semi-ereto para Resistencia à *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**, 2., 2012, Belém. Resumos. Belém: CBRG, 2012

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

MENGISTU, A.; ARELLI, P.A.; BOND, J.P.; SHANNON, G.J.; WRATHER, A.J.; RUPE, J.B.; CHEN, P.; LITTLE, C.R.; CANADAY, C.H.; NEWMAN, M.A., PANTALONE, V.R. Evaluation of soybean genotypes for resistance to Charcoal rot. **Plant Management Network**, 26 set. 2011.

MENGISTU, A.; RAY, J.D.; SMITH, J.R.; PARIS, R.L. Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony forming unit index. **Crop Science**, v. 47, p. 2453-2461, 2007

NORONHA, M.A.; SILVA, K.J.D.; GONÇALVES, S.R.; LIMA, L.R.L. Avaliação da Resistencia de genótipos de feijão-caupi a *Macrophomina phaseolina*. (**Comunicado técnico, 126**), Aracaju: Embrapa, 2012.

PARIS, R.L.; MENGISTU, A.; TYLER, J.M.; SMITH, J.R. Registration of soybean germplasm line DT97-4290 with moderate resistance to Charcoal rot. **Crop Science**, v. 46, p. 2324, 2006

REIS, G. F. et al. Viabilidade de armazenamento de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em meio com restrição hídrica. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 40, n. 2, p. 168-173, 2014.

ROSA, J. **Seleção de genótipos de guandu para Resistencia a *Macrophomina phaseolina* e esporulação do fungo**. 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2006.

VINHOLES, P. S. **Associação genômica para Resistencia da soja a *Meloidogyne javanica* e *Macrophomina phaseolina***. 2014. 115f. Tese (doutorado em fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa

WHEELER, T. et al. (Eds.) **Soiborne diseases Encyclopedia of Plant Pathology**, Vol.2, Wily, New York, p.935-947,2001.

WRATHER, A.; SHANNON, G.; BALARDIN, R.; CARREGAL, L.; ESCOBAR, R.; GUPTA, G. K.; MA, Z.; MOREL, W.; PLOPER, D.; TENUTA, A. Effect of Diseases on Soybean Yield in the Top Eight Producing Countries in 2006. **Plant Health Progress**, v. 10, p. 1-7, 2010.

CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados pode-se concluir:

- O método que apresenta a melhor eficiência na caracterização é a Infestação de sementes com *Macrophomina phaseolina*.
- A cultivar GDM 15i029 IPRO se destaca por apresentar os menores danos a campo. Em casa de vegetação se destaca as cultivares BMX POTENCIA RR e V-MAX RR por apresentarem a maior emergência relativa.
- O tempo de exposição indicado para a melhor caracterização de resistência é de 36 e 48 horas, e 32 sementes por repetição.

- Se destacam as cultivares BMX ZEUS IPRO, BMX BONUS IPRO, BMX APOLO RR, BMX TORNADO RR, BMX MAGNA RR, P 95R51 por apresentarem a menor média de emergência relativa.
- As cultivares CENTENIAL, DM 3565, BMX GARRA IPRO, L 93, BRS 282, BMX POTENCIA RR, V-MAX RR, BRS 316 RR se destacam por apresentarem a maior média referente a emergência relativa.