

Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*)

Mayra Suemy Ishikawa¹, Neucimara Rodrigues Ribeiro¹, Eli Carlos Oliveira¹,
Adriely Alves de Almeida¹, Maria Isabel Balbi-Peña¹

¹Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid/PR 445, Km 380, Campus Universitário, 86051-990, Londrina, PR, Brasil.
Autor para correspondência: Mayra Suemy Ishikawa (maishikawa@gmail.com)
Data de chegada: 17/04/2017. Aceito para publicação em: 31/07/2017.

10.1590/0100-5405/178653

RESUMO

Ishikawa, M.S.; Ribeiro, N.R.; Oliveira, E.C.; Almeida, A.A.; Balbi-Peña, M.I. Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). *Summa Phytopathologica*, v.43, n.4, p.38-44, 2018.

A seleção a campo de materiais resistentes à podridão negra da raiz, além de ter alto custo, apresenta alta variabilidade, uma vez que muitos fatores externos podem afetar o comportamento das plantas e, inclusive, do fungo, de local para local e de ano para ano. Seleção de variedades com resistência à podridão causada por *Macrophomina phaseolina* em casa de vegetação apresenta maior uniformidade e estabilidade dos resultados, uma vez que as condições são controladas. No entanto, é recomendado que os resultados obtidos em ambiente protegido, para serem adotados como protocolo de *screening*, apresentem boa correlação com resultados obtidos em campo. Assim, este trabalho teve por objetivo comparar a eficiência de métodos de *screening* em casa de vegetação e verificar suas correlações com o comportamento de variedades de soja em ensaio de campo. Os métodos de *screening* avaliados foram disco de micélio sobre haste cortada; punção da haste com palito colonizado; solo infestado por inóculo produzido em arroz (1g, 5g e 10g por kg de solo); e rega com suspensão de microscleródios (3×10^4 e 6×10^4 UFC/mL) sobre raízes de plântulas. O ensaio de campo foi montado em área com histórico de ocorrência da doença, e o solo foi infestado com sementes de sorgo colonizadas por *M. phaseolina*, no sulco de semeadura. Plantas inoculadas na haste, em casa de vegetação, foram submetidas a duas condições de umidade: câmara úmida por três dias

após a inoculação, e ausência de câmara úmida. A severidade da doença foi avaliada através do comprimento da lesão no método do disco de micélio sobre haste cortada, e, para os métodos da punção da haste com palito colonizado, suspensão de microscleródios e inoculação por infestação do solo, por escala de notas referente à lesão na raiz. Para o último, avaliou-se ainda a altura das plantas. Os métodos do corte da haste e do palito colonizado apresentaram melhores resultados para discriminar os genótipos, e a ausência de câmara úmida proporcionou maior severidade da doença. De maneira geral, BMX Apollo foi mais suscetível à doença, enquanto GDM15I029 e BMX Elite apresentaram maior resistência. Houve redução na altura das plantas inoculadas por infestação do solo, principalmente para a maior concentração do inóculo. A inoculação por suspensão de inóculo foi eficiente somente no maior nível de inóculo, e foi possível diferenciar dois genótipos quanto à severidade, sendo BMX Tornado mais suscetível que GDM15I029. Verificou-se correlação significativa com os dados de campo somente para o método do disco de micélio sobre a haste cortada, com ($r_s = 0,84$) e sem câmara úmida ($r_s = 0,80$). Os resultados sugerem que a seleção de cultivares em casa de vegetação para resistência à podridão negra da raiz realizado pelo método da haste cortada é eficiente e representativa do comportamento dos genótipos de soja em condições de campo.

Palavras-chave: *Glycine max*, métodos de inoculação, Podridão de carvão, Podridão cinzenta da raiz

ABSTRACT

Ishikawa, M.S.; Ribeiro, N.R.; Oliveira, E.C.; Almeida, A.A.; Balbi-Peña, M.I. Screening of soybean cultivars resistant to black root rot (*Macrophomina phaseolina*). *Summa Phytopathologica*, v.43, n.4, p.38-44, 2018.

The screening of genotypes resistant to black root rot in the field has high cost and high variability, since a large number of external factors can affect the behavior of plants and even of the fungus, according to the place and the year of cultivation. Screening of varieties resistant to the rot caused by *Macrophomina phaseolina* at greenhouse presents greater uniformity and stability of results once the conditions are controlled. However, it is recommended that the results obtained in a protected environment present good correlation to the results obtained in the field in order to be adopted as a screening protocol. Thus, this study aimed to compare the efficiency of screening methods at greenhouse and check their correlation with the behavior of soybean varieties in a field test. The evaluated screening methods were mycelium disc on cut stem; stem puncture with colonized toothpick; soil infested by inoculum produced in rice grains (1g, 5g and 10g per kg of soil); and irrigation with suspension of microsclerotia (3×10^4 and 6×10^4 CFU/mL) onto seedling roots. The field trial was set in an area with history of the disease occurrence, and the soil was infested with sorghum seeds colonized with *M. phaseolina* in the sowing groove. Plants inoculated on the stem, at greenhouse, were subjected to two humidity conditions: humid chamber for three days after inoculation and

absence of humid chamber. The disease severity was determined based on the length of the lesion, for the method of mycelium disc on cut stem, and on a scale of notes referring to the root lesion, for the methods of stem puncture with colonized toothpick, suspension of microsclerotia and soil infested by inoculum. For the latter, the height of plants was also evaluated. The methods of stem cut and colonized toothpick were the best to discriminate genotypes, while the absence of humid chamber provided greater severity of the disease. In general, BMX Apollo was more susceptible to the disease, while GDM15I029 and BMX Elite showed more resistance. There was a reduction in the height of plants inoculated by soil infestation, especially for the higher inoculum concentration. Inoculation with inoculum suspension was efficient only at the highest inoculum level, and allowed to differentiate genotypes for severity, showing that BMX Tornado was more susceptible than GDM15I029. There was a significant correlation with the field data only for the method of mycelium disc on cut stem, with ($r_s = 0.84$) and without humid chamber ($r_s = 0.80$). The results suggest that screening for resistance to black root rot at greenhouse using the method of cut stem is efficient and representative of the behavior of soybean genotypes under field conditions.

Keywords: *Glycine max*, inoculation methods, charcoal rot, gray root rot

A podridão negra da raiz, também conhecida como podridão cinzenta da raiz ou podridão de carvão, é uma doença radicular de ocorrência generalizada em todas as regiões de cultivo da soja no mundo.

O agente causal desta doença é o fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, polífago e cosmopolita, capaz de infectar raízes, caules, folhas e vagens de diferentes espécies de plantas, afetando mais de 500 culturas de importância econômica (1, 16). Dentre as principais culturas atacadas destacam-se feijão, sorgo, milho, algodão, feijão-caupi, pinus, citrus, café, plantas medicinais e, ainda, plantas daninhas (8). No Brasil, a primeira ocorrência do patógeno foi relatada em Campinas-SP, em 1935, infectando raízes de feijão (4).

O fungo *M. phaseolina* se caracteriza por produzir microescleródios, estruturas de resistência formadas pela compactação de hifas, de coloração escura devido a presença de melanina, que formam-se em grande abundância nos tecidos radiculares infectados, conferindo aspecto encarvoado ou cinzento às raízes infectadas. Os microescleródios permitem ao fungo sobreviver no solo e constituem a principal fonte de inóculo primário da doença (3).

A infecção das raízes ocorre na fase de plântula, porém, os sintomas secundários manifestam-se nos estádios reprodutivos da soja. Plantas infectadas no estágio de primeiro trifólio apresentam estatura menor que as normais e mostram súbita perda de vigor. Em estágio mais avançado da doença, os folíolos tornam-se amarelados, murcham, ficam pardos e retidos nos pecíolos (3). A doença resulta em maturação precoce e desuniforme, além de incompleto enchimento de grãos, levando a perdas de rendimento. Após a morte da planta, a colonização por micélio e a formação de microescleródios em tecido hospedeiro continuam até que os tecidos ficam secos, momento em que os microescleródios são liberados no solo e o ciclo da doença continua (20).

O fungo *M. phaseolina* raramente ocorre isolado de outros fungos que causam podridões radiculares na soja, por isso há dificuldade em quantificar os danos que a doença pode causar (3). Yang & Navi (21) citam reduções no rendimento de grãos, de 30 a 50% nas lavouras de soja, em alguns estados dos Estados Unidos. Os danos são maiores quando as plantas próximas à maturação sofrem estresse hídrico e estão sob alta temperatura (28 a 35 °C) (3).

No Brasil, não há fungicidas registrados para esta doença (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA). Devido à ampla gama de hospedeiros do patógeno, a rotação de culturas é difícil de implementar. Redução da incidência da doença foi observada em campos de plantio direto, onde a palhada da cultura de inverno deixada na superfície do solo contribuiu para a diminuição da temperatura e aumento da umidade (1).

O método de controle ideal para esta doença seria o uso de cultivares resistentes, no entanto, nenhuma fonte de resistência genética foi encontrada (8). Almeida et al. (2) observaram variabilidade genética entre os isolados brasileiros de *M. phaseolina*, o que dificultaria a obtenção de resistência à infecção radicular das cultivares comerciais de soja no Brasil. Por outro lado, a ocorrência de variedades menos sensíveis à doença vem sendo relatada por diversos estudos, entre eles, os de Mengistu et al. (11, 12).

O desenvolvimento de materiais resistentes a patógenos de plantas exige técnicas confiáveis de avaliação da doença e seleção. A maioria dos estudos que avaliam germoplasma de soja para resistência a *M. phaseolina* o fazem em campo, infestado por inoculação artificial ou com histórico da doença. No entanto, experimentos de campo podem produzir resultados inconsistentes, uma vez que diversos fatores inerentes ao patossistema podem variar entre locais e entre safras.

Para minimizar essa variabilidade, ensaios sob condições controladas em casa de vegetação ou câmaras de crescimento, com padronização das condições ambientais e técnicas de inoculação são indicados.

Esse estudo teve por objetivo comparar a eficiência de quatro métodos de seleção para resistência de cultivares de soja à podridão negra da raiz.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio em campo

O ensaio de campo foi conduzido no município de Sertaneja-PR, 22°52'54.7»S e 50°52'50.6»W, na safra de 2015/2016, sob sistema de plantio direto sem irrigação. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições. Trinta e dois genótipos de soja foram semeados em parcelas de sete linhas espaçadas a 45 cm, e 25 metros de comprimento. Na ocasião da semeadura, 40 kg/ha de inóculo produzido em sementes de sorgo foram distribuídos juntamente com as sementes de soja, nos sulcos de semeadura.

O isolado de *M. phaseolina* utilizado nos ensaios foi obtido de plantas sintomáticas provenientes da região do cerrado brasileiro. Para produção do inóculo, sementes de sorgo foram lavadas, colocadas até aproximadamente 2/5 do volume de garrafas plásticas brancas foscas de capacidade de 1 L e deixadas de molho, em água suficiente para cobrir as sementes. No dia seguinte, foram autoclavadas por 30 minutos a 121 °C. Após o resfriamento, seis discos de micélio da borda de colônias com cinco dias de idade do fungo cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), a 28 °C, foram inoculados em cada garrafa.

As garrafas foram mantidas em estufa incubadora a 28 °C no escuro. Do terceiro dia em diante, as garrafas foram diariamente agitadas para uniformizar a colonização e evitar formação de agregados. Após aproximadamente 20 dias, os grãos estavam totalmente colonizados, apresentando coloração negra, prontos para serem utilizados no campo.

A avaliação da podridão negra ocorreu entre os estágios R5 e R6, pela observação da incidência de plantas doentes em relação ao total de plantas da parcela. Os sintomas observados foram maturação desuniforme, murcha e retenção de folhas e enchimento deficiente dos grãos.

Métodos de seleção

Os ensaios em casa de vegetação foram realizados na estação experimental da empresa GDM *Seeds*, localizada no município de Cambé, PR. Estudaram-se quatro métodos de inoculação de *M. phaseolina*: método do disco de micélio sobre haste cortada; punção da haste com palito colonizado; solo infestado com inóculo produzido em arroz; e rega com suspensão de microescleródios.

a) Método do disco de micélio sobre haste cortada

Vasos plásticos de aproximadamente 0,75 L de capacidade foram preenchidos com mistura autoclavada de solo e areia na proporção 1:3 (v/v). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições e uma testemunha não inoculada. Foram semeadas oito sementes por vaso, e, após desbaste, foram mantidas seis plantas por vaso.

O fungo *M. phaseolina* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantido em BOD a 28 °C, com fotoperíodo de 12/12 por quatro dias. A inoculação foi realizada em plantas com seis semanas de idade. No momento da inoculação o meio de cultura

foi invertido dentro da placa com espátula. O bocal de ponteiros descartáveis de micropipeta (200 µL) foi inserido no meio de cultura, nas margens da colônia, para cortar discos de micélio. A ponteira contendo o inóculo foi colocada sobre a haste de plantas de soja previamente cortada com tesoura desinfestada a 2,5 cm acima do nó unifoliolar, segundo a metodologia descrita por Twizeyimana et al. (19). Nas plantas controle, as hastes foram cortadas da mesma maneira, e sobre elas foram colocadas ponteiros contendo somente o meio de cultura. A inoculação foi realizada seis semanas após a semeadura.

O ensaio foi realizado em duplicata, sendo que uma réplica foi submetida à câmara úmida por três dias. A câmara úmida foi realizada colocando-se os vasos em uma bandeja de aço, dentro da qual foi mantida uma lâmina de água de aproximadamente 1 cm. A bandeja foi coberta com lona plástica transparente. Três vezes ao dia, as plantas foram pulverizadas com água.

No quarto dia após a inoculação, as ponteiros foram retiradas e avaliou-se o comprimento das lesões causadas em cada haste, a intervalos de três a quatro dias, até os dezoito dias após a inoculação. A partir da medida das lesões em cada avaliação, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) pela expressão $AACPD = \sum (y_i + y_{i+1})/2 * d_{ii}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas e d_{ii} o intervalo entre avaliações (15). A AACPD foi normalizada conforme Fry (7).

b) Método da punção da haste com palito colonizado

Este método baseou-se em metodologia descrita por Hildebrand (9), com variações referidas por Medeiros et al. (10). Pontas de palitos de dente (1,5 cm) foram inseridas verticalmente em discos de papel de filtro com o mesmo diâmetro do diâmetro interno de uma placa de Petri. Placas contendo os discos com palitos com a parte afilada voltada para cima foram então autoclavadas a 121 °C por trinta minutos. Sobre os palitos foi vertido meio de cultura BDA, deixando expostas as extremidades dos palitos. Após solidificação do meio, cinco discos de micélio de *M. phaseolina* foram distribuídos equidistantemente, e as placas mantidas em estufa incubadora tipo BOD, a 28 °C por dezoito dias.

Foram semeadas oito sementes por vaso de aproximadamente 0,75 L de capacidade, contendo mistura autoclavada de solo e areia na proporção 1:3 (v/v). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições e uma testemunha não inoculada.

Seis plantas por vaso foram inoculadas doze dias após a semeadura, por meio da inserção do palito colonizado na altura do colo da planta, aproximadamente 2 cm acima do nível do solo. Por ocasião da inoculação, os palitos estavam com suas extremidades totalmente colonizadas pelo fungo, com presença de microescleródios. Palitos autoclavados e sem inóculo foram utilizados na perfuração das plantas controle. O ensaio foi realizado em duplicata, sendo que uma réplica foi submetida à câmara úmida por três dias após a inoculação.

Vinte dias após a inoculação reduziu-se a disponibilidade de água para as plantas, de modo a causar estresse hídrico e induzir o desenvolvimento de sintomas. As plantas somente foram irrigadas quando apresentaram sintomas de murcha. A avaliação ocorreu aos trinta dias após a inoculação, pela observação de sintomas na raiz, caracterizados por escurecimento e constrição da raiz principal. A parte aérea das plantas foi cortada, e as raízes retiradas do solo e lavadas. De acordo com a severidade dos sintomas, foi atribuída uma nota de 0 a 3, baseada em escala desenvolvida pelos autores, sendo 0 = sem sintomas; 1 = lesões escurecidas na raiz principal, sem constrição da mesma; 2 = raiz principal com constrição e com lesões

enegrecidas em até 50 %; e 3 = raiz principal com constrição e com lesões enegrecidas em mais de 50 %.

c) Método do solo infestado com inóculo produzido em grãos arroz

Para produção de inóculo em arroz foi utilizada a metodologia descrita por Claudino (5). Erlenmeyers de 200 mL, contendo 100 g de arroz parboilizado e 20 mL de água destilada, foram esterilizados por autoclavagem, durante 30 minutos a 121 °C. Após agitação e resfriamento, foram depositados cinco discos de micélio de *M. phaseolina* em cada frasco. Os frascos foram mantidos em estufa incubadora a 28 °C no escuro. A fim de garantir uma colonização uniforme, a partir do terceiro dia, os frascos foram agitados diariamente. Após a completa colonização (cerca de 15 dias), os grãos foram secos a temperatura ambiente, por 24 horas em câmara de fluxo laminar. O inóculo seco foi processado em liquidificador e peneirado, visando a uniformidade na incorporação do inóculo ao solo.

Foram testados três níveis de inóculo para infestação do solo: 1g, 5g e 10g do inóculo por kg de solo. O arroz triturado foi incorporado ao solo por agitação vigorosa em sacos plásticos. Tubetes plásticos de capacidade 290 mL foram preenchidos com o solo infestado. Para cada nível de inóculo, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições mais testemunhas não inoculadas (semeadas em tubetes preenchidos somente com solo autoclavado).

Sete dias após a infestação do solo foram semeadas duas sementes por tubete. Vinte dias após a semeadura reduziu-se a disponibilidade de água para causar estresse hídrico nas plantas, irrigando-as somente quando apresentaram murcha. Neste momento foi avaliada a altura de plantas. A avaliação da severidade da podridão negra da raiz ocorreu aos 40 dias após a semeadura. A parte aérea das plantas foi cortada, as raízes retiradas dos tubetes e lavadas. Notas de 0 a 3 foram atribuídas às raízes pela observação do seu enegrecimento e constrição, conforme a escala utilizada no método de punção da haste com palito colonizado.

d) Método de rega com suspensão de microescleródios

Foi preparada uma suspensão de microescleródios a partir de culturas do fungo *M. phaseolina*. Para coleta dos microescleródios acrescentou-se água destilada nas placas contendo culturas com trinta dias de idade e procedeu-se à raspagem do micélio e filtragem em gaze, sendo determinado a concentração de microescleródios com auxílio de câmara de Peters. A concentração foi ajustada para 3×10^4 e 6×10^4 microescleródios por mL.

Sete dias após a semeadura em areia, plântulas foram retiradas e transplantadas para tubetes contendo mistura autoclavada de solo e areia na proporção 1:3 (v/v). Sobre a raiz nua, foram vertidos 5 mL da suspensão de microescleródios e, em seguida, as raízes inoculadas foram cobertas por solo. Plantas controle foram transplantadas para os tubetes sem receber inoculação.

A avaliação da severidade da doença ocorreu aos 60 dias após a inoculação. A partir dos trinta dias após a inoculação, reduziu-se a disponibilidade de água para causar estresse hídrico nas plantas, e foram irrigadas somente quando apresentaram sintomas de murcha. A parte aérea das plantas foi cortada, as raízes retiradas dos tubetes e lavadas. Notas de 0 a 3 foram atribuídas às raízes conforme escala utilizada anteriormente,

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições e uma testemunha não inoculada para cada genótipo. A unidade experimental foi constituída por um tubete contendo uma planta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos genótipos testados em campo, foram escolhidos sete com diferentes níveis de resistência para serem utilizados na avaliação dos métodos de seleção em casa de vegetação. A incidência de podridão negra da raiz nos sete materiais selecionados no ensaio de campo é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Incidência de podridão negra da raiz e nível de resistência/suscetibilidade de genótipos de soja em ensaio de campo, realizado em Sertaneja-PR, safra 2015-2016.

Genótipo	Incidência (%)		Nível de resistência
NA 5909	56,67	a	S
BMX Tornado	53,33	a	S
BMX Apolo	36,67	a	S
Vmax	20,00	b	MR
BMX Potência	16,67	b	MR
GDM15I029	10,00	c	R
BMX Elite	8,33	c	R
CV (%)	12,09		

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, para dados transformados por $\ln(x)$.

É possível separar as variedades em três grupos de acordo com a sensibilidade a *M. phaseolina*. BMX Apolo, NA5909 e BMX Tornado apresentaram-se mais suscetíveis à doença, com médias de incidência de 36,67 a 56,67%, BMX Potência e Vmax apresentaram incidência intermediária (de 16,7 a 20%) e os materiais com melhor desempenho foram BMX Elite e GDM15I029, que apresentaram incidência média de 8,3 e 10%, respectivamente.

A maioria dos trabalhos para avaliar resistência à podridão negra da raiz é realizado em campos com histórico da doença. Grande parte destes trabalhos encontra diferenças entre os genótipos, como mostraram Smith & Carvil (18) e Mengistu et al. (11, 12). Um dos problemas dos trabalhos realizados em campos naturalmente infestados é a falta de uniformidade na distribuição espacial do inóculo. Neste estudo, apesar da área ter histórico da doença, foi aplicado inóculo na linha de semeadura, buscando maior uniformidade de infecção e, portanto, maior confiabilidade nos resultados.

Pastor-Corrales & Abawi (13) observaram maior severidade de podridão da raiz causada por *M. phaseolina* em plantas de feijão em condições de campo artificialmente inoculado com 4g de grãos de arroz colonizado por metro de linha, em comparação com campo naturalmente infestado.

A região de localização do ensaio de campo do presente trabalho caracteriza-se por apresentar altas temperaturas, com a máxima média chegando aos 34 °C. Aliado a este fato, na safra em estudo, o local passou por uma estiagem, causando estresse hídrico nas plantas, durante os primeiros estágios de enchimento de grão, o que proporcionou o desenvolvimento de sintomas severos de podridão negra da raiz nas variedades mais suscetíveis.

Na tabela 2 são apresentados os dados da AACPDN, obtidos pelo método de inoculação do disco de micélio sobre haste cortada. Houve interação significativa entre condição de umidade e genótipo, o que revela comportamento distinto dos genótipos em função da condição de umidade a que foram submetidas as plantas. Foi possível observar

diferenças de severidade entre os genótipos sob as duas condições de umidade. Com câmara úmida, os genótipos foram divididos em dois grupos, sendo o grupo mais resistente representado por BMX Elite e GDM15I029. Sem câmara úmida, foi possível dividi-los em três grupos, sendo o mais resistente composto por BMX Elite, GDM15I029 e BMX Potência; o grupo intermediário por Vmax, NA 5909 e BMX Tornado; e o mais suscetível representado por BMX Apolo. O comportamento das cultivares com este método de inoculação condiz com o comportamento observado no campo.

Tabela 2. Área abaixo da curva de progresso da podridão negra da raiz normalizada (AACPDN) em plantas de soja inoculadas pelo método do disco de micélio de *Macrophomina phaseolina* sobre a haste cortada.

Genótipo	AACPDN			
	Sem câmara úmida		Com câmara úmida	
BMX Apolo	5,91	aA ¹	1,48	aB
NA5909	2,31	bA	1,63	aA
BMX Tornado	2,19	bA	1,33	aB
Vmax	1,79	bA	1,06	aA
BMX Potência	1,18	cA	1,09	aA
BMX Elite	1,02	cA	0,78	bA
GDM15I029	0,86	cA	0,55	bA

CV (%) = 15.79

¹Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, para dados transformados por $(\log(x) + (x+0,5))$.

Em trabalho para avaliação deste método de inoculação, sem utilização de câmara úmida, Twizeyimana et al. (19) observaram diferenças de resistência entre nove genótipos de soja, que corresponderam com a resistência previamente avaliada em campo.

Para a maior parte dos genótipos, não houve diferença de severidade nas distintas condições de umidade (com e sem câmara úmida). Somente BMX Apolo e BMX Tornado apresentaram maior severidade sem câmara úmida.

Em relação à inoculação pelo método da punção da haste com palito colonizado (Figura 1), houve diferença significativa entre os genótipos para os postos médios de notas para severidade da doença, sendo um método eficiente para discriminar os genótipos quanto à tolerância à podridão de carvão. BMX Apolo, BMX Tornado e BMX Potência foram os mais suscetíveis, enquanto BMX Elite mostrou-se mais resistente. Novamente, a ausência de câmara úmida favoreceu a severidade da doença para a maioria das variedades.

Com o mesmo objetivo, Medeiros et al. (10) também confirmaram a eficiência do método do palito, capaz de diferenciar genótipos de meloeiro resistentes e suscetíveis em função da virulência dos isolados de *M. phaseolina*. Resultados semelhantes foram encontrados por Diourte et al. (6) em sorgo e Silva Filho (17) em feijão caupi.

O método de inoculação por infestação do solo também permitiu separar as variedades em três grupos distintos (Figura 2), porém, o *ranking* dos genótipos não foi o mesmo que o obtido anteriormente, apontando BMX Tornado como a mais resistente, e BMX Potência como a mais suscetível. GDM15I029 e BMX Elite, que apresentaram o melhor desempenho nos outros métodos estudados, tiveram comportamento intermediário.

Medeiros et al. (10) não conseguiram diferenciar variedades de

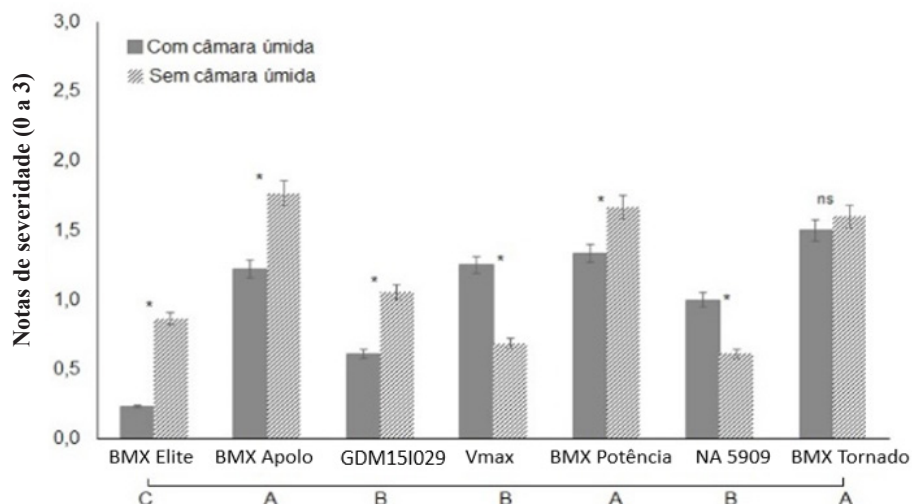


Figura 1. Severidade de podridão negra da raiz em plantas de soja inoculadas pelo método da punção da haste com palito colonizado pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. * significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis

^{ns} não significativo

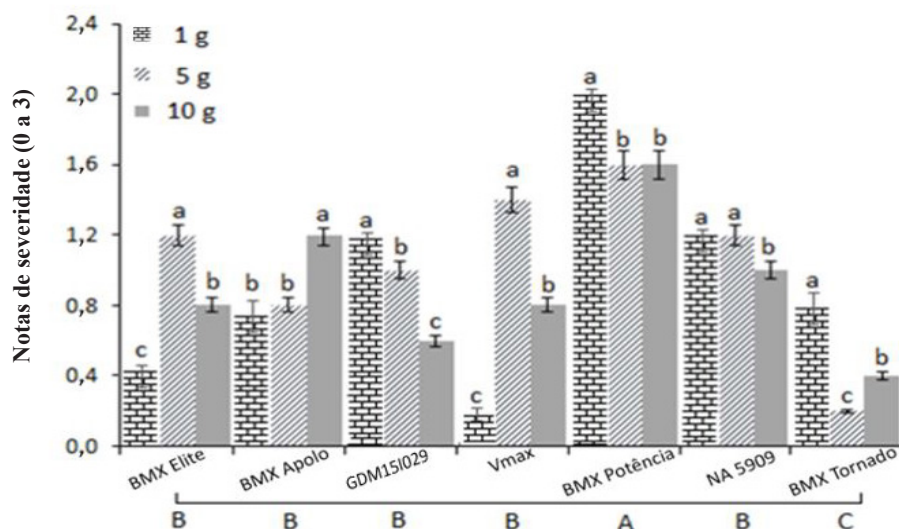


Figura 2. Severidade de podridão negra da raiz em plantas de sete genótipos de soja inoculadas com *Macrophomina phaseolina* pelo método do solo infestado com 1g, 5g e 10g do inóculo produzido em grãos de arroz. *Letras iguais (maiúsculas entre as cultivares, e minúsculas entre os níveis de inóculo para cada cultivar) não diferenciam entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

meloeiro segundo sua resistência frente a *M. phaseolina*, usando o método de inoculação por infestação de substrato areno-orgânico mesmo trabalhando com níveis de inóculo superiores. Os autores ainda destacaram como desvantagens do método a exigência de maior período de tempo para o aparecimento dos sintomas e a dificuldade de avaliação considerando a necessidade da retirada do solo das raízes e a lavagem cuidadosa para observação dos sintomas.

Pastor-Corrales e Abawi (13), quando avaliaram o mesmo método em feijão, na concentração de 2 g de microescleródios por kg de solo, observaram diferenças entre os genótipos, e verificaram que os mais tolerantes no campo apresentaram também maior nível de resistência em casa de vegetação. Os autores relataram ainda que as variedades mais suscetíveis apresentaram menor germinação de sementes e maior incidência de morte de plântulas, o que não ocorreu no presente trabalho.

Pode-se ainda observar que os materiais não se comportaram de

forma constante entre os níveis de inóculo utilizados, o que não permite indicar uma melhor concentração de inóculo dentre as utilizadas. A divergência de resultados obtidos com este método pode ter sido causada pela falta de uniformidade na distribuição do inóculo no solo. A agregação, concentração e textura do inóculo, provavelmente dificultaram sua incorporação homogênea no solo. Para levantar essa limitante, o inóculo deveria ser calculado e depositado individualmente nos tubetes.

Durante o ensaio de inoculação com infestação de solo foi observada variação de altura de plantas entre as plantas inoculadas e as não inoculadas, principalmente no nível de infestação de 10 g/kg de solo (Tabela 3).

A altura de plantas, sendo uma característica inerente a cada material, varia entre os genótipos dentro de cada nível de inóculo. Quando aumentou-se a concentração de 1g para 5g ou 10g de inóculo/kg

solo, houve redução da altura dos genótipos avaliados. Em plântulas de mamona, Claudino (5) também observou redução no porte das plantas inoculadas via substrato com *M. phaseolina*, conforme aumentou-se a concentração do inóculo, determinando uma correlação negativa de 90%.

A presença do patógeno no solo reduziu a altura das plantas (exceto a cultivar BMX Elite) quando comparadas às plantas não inoculadas, principalmente no nível de inóculo 10 g/kg de solo. Nos níveis de 1g e 5 g/kg de solo, somente Vmax, BMX Potência e NA5909 mostraram esse comportamento.

Visando uma inoculação mais localizada na raiz da planta, foram testados dois níveis de suspensão de microescleródios aplicados diretamente sobre as raízes de plântulas (Figura 3). O método de inoculação por rega com suspensão de microescleródios conseguiu diferenciar os genótipos somente quando utilizada a maior concentração (6×10^4 microescleródios/mL). Ainda assim, somente duas variedades puderam ser separadas entre si, GDM151029 como a mais resistente, e BMX Tornado como a mais suscetível. O nível de 3×10^4 microescleródios/mL não foi suficiente para expressão dos sintomas a ponto de diferenciar resistência entre variedades (dados não mostrados).

Sánchez et al. (14) inocularam plantas de morango com suspensão de microescleródios de *M. phaseolina* na concentração de 5×10^5 /mL e, ao avaliarem a mortalidade de plantas a partir da primeira semana de inoculação, encontraram diferenças de resistência em oito variedades estudadas, separando-as em dois grupos.

As correlações de Spearman realizadas entre os dados de campo e cada método de inoculação foram significativas somente para o método do disco de micélio sobre a haste cortada, tanto com câmara úmida ($r_s = 0,84$) quanto sem câmara úmida ($r_s = 0,80$), representadas na Figura 4.

As correlações observadas indicam que este método apresenta maior

capacidade de presumir o comportamento no campo de variedades testadas na casa de vegetação, o que não foi observado para os outros métodos avaliados no presente trabalho.

A rega com suspensão de 6×10^4 microescleródios/mL sobre as raízes de plântulas não apresentou correlação significativa com os resultados observados no campo, provavelmente pela reunião da maioria das variedades em um grupo não diferente da mais suscetível nem da mais resistente. No entanto, por mostrar-se eficiente para segregar os materiais mais suscetíveis dos mais resistentes, é considerado passível de uso, por exemplo, em etapas iniciais de um programa de melhoramento, principalmente pelo modo de avaliação, feito em uma única etapa, posto que o método do disco de micélio sobre

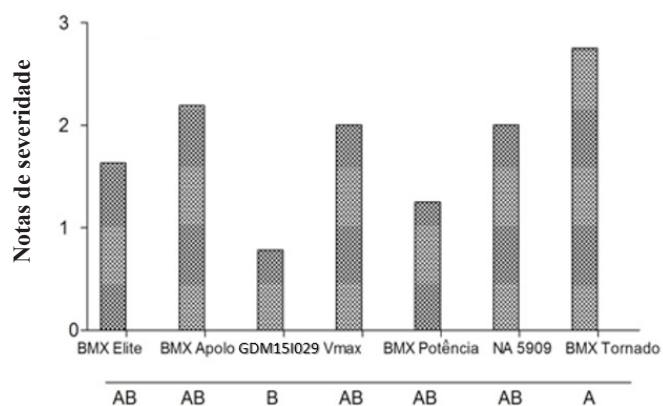


Figura 3. Severidade de podridão negra da raiz em genótipos de soja inoculados pelo método de rega com suspensão de inóculo de *Macrophomina phaseolina* (6×10^4 UFC/mL) em plântulas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Altura (cm) de plantas de sete genótipos de soja inoculadas e não inoculadas com o fungo *Macrophomina phaseolina* pelo método de infestação do solo com 1g, 5g e 10g do inóculo triturado/kg de solo.

Genótipo	Inoculação	Altura de planta (cm)		
		1g	5g	10g
BMX Elite	Inoculado	15,75cA ^{1ns}	9,86bB ^{ns}	9,90bB ^{ns}
	Não inoculado	13,8	10,15	12,53
BMX Apolo	Inoculado	14,16cA ^{ns}	9,96bB ^{ns}	9,55bB ^{**}
	Não inoculado	15	11,23	15,1
GDM151029	Inoculado	13,17cA ^{ns}	9,70bB ^{ns}	11,04bB [*]
	Não inoculado	13,88	10,85	14,33
Vmax	Inoculado	21,30aA [*]	12,73aB ^{ns}	13,05aB ^{**}
	Não inoculado	25,43	18,88	21,85
BMX Potência	Inoculado	17,88bA ^{ns}	10,74bB [*]	11,00bB [*]
	Não inoculação	16	15,15	17,8
NA5909	Inoculado	22,97aA ^{ns}	12,94aB ^{ns}	15,01aB ^{**}
	Não inoculado	27,15	18,33	21,5
BMX Tornado	Inoculado	13,94cA ^{ns}	7,31cB ^{ns}	7,26cB [*]
	Não inoculado	13,7	12,18	15,8

¹ médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna (somente para os tratamentos inoculados), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Análise feita sobre dados transformados por log (x)

^{ns} diferença não significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, pelo teste T

^{*} diferença significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, pelo teste T, a 5% de probabilidade

^{**} diferença significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, pelo teste T, a 1% de probabilidade

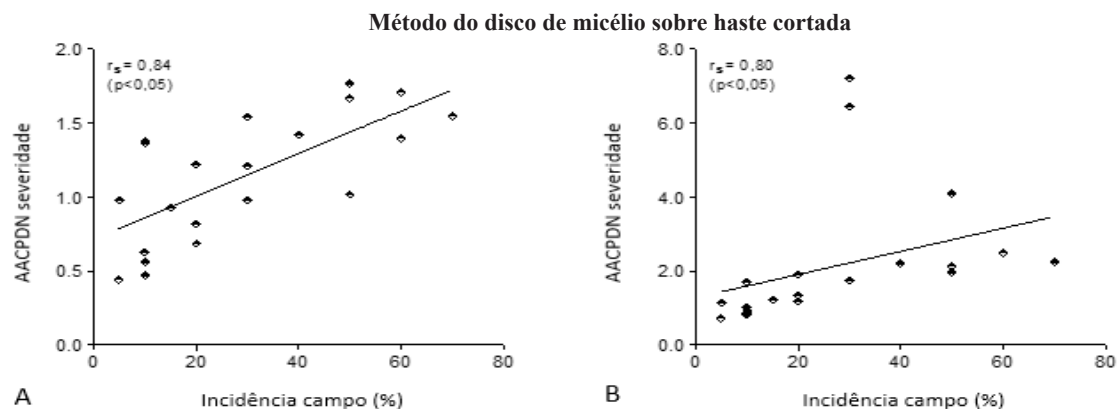


Figura 4. Correlação entre dados de severidade de podridão negra da raiz obtidos em ensaio de campo e em casa de vegetação pelo método de inoculação do disco de micélio sobre haste cortada com (A) e sem câmara úmida (B)

a haste cortada demanda a medição periódica das lesões. O método da rega com suspensão de 6×10^4 microescleródios/mL apresenta como vantagem a necessidade de produzir grande quantidade de inóculo (placas com microescleródios de *M. phaseolina*), bem como maior tempo de crescimento das colônias a fim de formar os microescleródios.

Assim, com base nos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que:

1) O método do disco de micélio sobre a haste cortada é o mais indicado para seleção de genótipos de soja para resistência à podridão negra de raiz, em casa de vegetação, apresentando resultados compatíveis com o comportamento a campo;

2) A câmara úmida é desnecessária quando utilizados métodos de inoculação do fungo *M. phaseolina* na haste.

3) Solo infestado com *M. phaseolina* afeta o desenvolvimento de plantas de soja determinando plantas de menor altura.

REFERÊNCIAS

- 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 de cultura e diversidade genética. Londrina-PR: Embrapa Soja, 2001, 47p.
- Almeida, A.M.R.; Abdelnoor, R.V.; Arrabal Arias, C.A.; Carvalho, V.P.; Jacoud Filho, D.S.; Marin, S.R.R.; Benato, L.C.; Pinto, M.C.; Carvalho, C.G.P. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 3, p.279-285, 2003.
- Boaretto, C.; Danelli, A.L.D. Podridão cinzenta da raiz. In: Reis, E. M.; Casa, R. T. *Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado*. Passo Fundo: Berthier, 2012. p. 281-296.
- Coelho Neto, R. A. *Metodologia e avaliação da resistência de feijoeiro à podridão cinzenta do caule, em laboratório e casa-de-vegetação*. 1994. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Claudino, M. R. *Métodos de inoculação de Macrophomina phaseolina em mamoneira visando à seleção de genótipos resistentes*. 2013. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba.
- Diourte, M.; Starr, J. L.; Jeger, M. J.; Stack, J. P.; Rosenow, D.T. Charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance and the effects of water stress on disease development in sorghum. *Plant Pathology*, Oxford, v. 44, n.1, p. 196-202, 1995.
- Fry, W. E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 68, n. 11, p. 1650-1655, 1978.
- 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, n.4, p.167-180, 2012.
- Hildebrand, A. A. An elaboration of toothpick method of inoculating plants. *Canadian Journal of Agricultural Science*, Ottawa, v. 33, n.4, p. 596-598, 1953.
- Medeiros, A. C.; Ambrósio, M. M. Q.; Nunes, G. H. S.; Costa, J. M. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015.
- 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. Online. *Plant Health Progress*, Saint Paul, 2011. Online. doi:10.1094/PHP-2010-0926-01-RS.
- Mengistu, A.; Arelli, P.; Bond, J.; Nelson, R.; Rupe, J.; Shannon, G.; Wrather, A. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. Online. *Plant Health Progress*, Saint Paul, 2013. Online. doi:10.1094/PHP-2013-0318-01-RS
- Pastor-Corrales, M. A.; Abawi, G. S. Reactions of selected beans accessions to infection by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 39-41, 1988.
- Sánchez, S.; Henríquez, J. L.; Urcola, L. A.; Scott, A.; Gambardella, M. Susceptibility of strawberry cultivars to root and crown rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Berry Research*, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 345-354, 2016.
- Shaner, G.; Finney, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.
- Sinclair, J. B.; Backman, P. A. *Compendium of soybean diseases*. 3. ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1989.
- Silva Filho, A. J. R. Reação de acessos de feijão caupi a *Macrophomina phaseolina* por meio da inoculação no colo da planta. In: III CONAC – Congresso nacional de feijão caupi. Recife-PE, 2013. Anais. Recife: Embrapa Meio Norte, 2013.
- Smith, G. S.; Carvil, O. N. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 81, n. 4, p. 363-368, 1997.
- 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.
- Vinholes, P. S. *Associação genômica para resistência da soja a Meloidogyne javanica e Macrophomina phaseolina*. 2014. 115f. Tese (doutorado em fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Yang, X. B.; Navi, S. S. First report of charcoal rot epidemics caused by *Macrophomina phaseolina* in soybean in Iowa. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 89, n. 5, p. 526, 2005.