



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARINA FARIA BRACALE

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *MACROPHOMINA*  
*PHASEOLINA* ASSOCIADOS AO ESTRESSE HÍDRICO EM  
SOJA E FUNGITOXIDADE DE PRODUTOS AO PATÓGENO**

---

Londrina  
2018

MARINA FARIA BRACALE

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *MACROPHOMINA*  
*PHASEOLINA* ASSOCIADOS AO ESTRESSE HÍDRICO EM  
SOJA E FUNGITOXIDADE DE PRODUTOS AO PATÓGENO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina – UEL como requisito para Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri

Londrina  
2018

MARINA FARIA BRACALE

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *MACROPHOMINA PHASEOLINA*  
ASSOCIADOS AO ESTRESSE HÍDRICO EM SOJA E  
FUNGITOXIDADE DE PRODUTOS AO PATÓGENO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina – UEL como requisito para Título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Ciro Hideki Sumida  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. João Pereira Torres  
Universidade Estadual do Norte do Paraná –  
UENP

Londrina, 26 de fevereiro de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Marlei e Pedro por toda fé colocada em mim e no meu trabalho, por acreditarem na minha capacidade e fazerem de tudo para que eu sempre fosse além. Obrigada por ouvirem sobre a minha dissertação dia sim e dia sempre.

Ao meu namorado Louic por me apoiar em todas as etapas, pelos sábados dedicados ao meu experimento, pelas madrugadas a fio, e por me levar para comer sushi.

Agradeço grandemente ao meu professor e orientador Marcelo Giovanetti Canteri, pela oportunidade de aprendizado e crescimento, tanto profissional quanto pessoal. Obrigada por ter me orientado até aqui.

À toda equipe do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, por todo auxílio com meus experimentos, revisão, discussão e puxada de orelha. Obrigada por todos os momentos vivenciados, aprendi demais com vocês.

Aos meus amigos do peito que sempre estiveram a postos para ouvir as reclamações dessa mestranda, e que saíram um pouco mais fitopatologistas também.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia por fornecer todo suporte para um aprendizado completo.

Agradeço também a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio na forma de bolsa de estudo, possibilitando a execução deste trabalho.

BRACALE, M. F. **Métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina* associados ao estresse hídrico em soja e fungitoxidade de produtos ao patógeno.** 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A podridão de carvão é uma doença radicular que ocorre em todas as regiões produtoras de soja do Brasil. A incidência e severidade da doença tem sido associada a condições de estresse hídrico e temperatura elevada do solo. A podridão de carvão é uma doença de difícil controle, não havendo nenhum fungicida registrado para a cultura da soja. Para explorar as condições favoráveis à doença e o controle químico de *Macrophomina phaseolina* a presente dissertação foi dividida em dois bioensaios. O primeiro bioensaio (ou bioensaio 1) objetivou avaliar métodos de inoculação do fungo. Os tratamentos foram compostos pelo método palito de dente infectado, enterro de discos de meio de cultura com crescimento micelial do patógeno, sementes infectadas e solo naturalmente infestado associado a estresse hídrico pelo período de dez dias. O estresse foi mantido através da pesagem diária dos vasos, dividido em quatro fases, com início aos 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura. As avaliações consistiram na observação da presença de sinais do patógeno, logo após o período de estresse. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do software “R”, pacote “drc”. Todos os métodos de inoculação testados foram eficientes no desenvolvimento de *M. phaseolina* em plantas de soja. O fator estresse hídrico favoreceu o aparecimento da doença, contudo não foi essencial. O segundo bioensaio objetivou testar a inibição micelial de *M. phaseolina* submetido à diferentes fungicidas. Os tratamentos consistiram na exposição do patógeno às seguintes misturas fungicidas: protioconazol + trifloxistrobina + bizafem, trifloxistrobina + ciproconazol, picoxistrobina + ciproconazol, azoxistrobina + benzovindiflupir, mancozebe, difenoconazol + ciproconazol, propiconazol + difenoconazol, epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina e carbendazim. Foram utilizadas cinco concentrações: 0,01ppm; 0,1ppm; 1,0ppm; 10,0ppm; 100,0ppm do produto formulado. A avaliação do crescimento micelial foi realizada com o auxílio de paquímetro, medindo-se o diâmetro das colônias, até o momento em que o crescimento do fungo no tratamento testemunha atingiu a borda da placa de Petri. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete repetições. Os dados foram ajustados ao modelo log-logístico. Os cálculos foram realizados com o software “R”, pacote “drc”. As misturas picoxistrobina + ciproconazol, azoxistrobina + benzovindiflupir, epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina e carbendazim foram consideradas altamente fungitóxicas ao fungo *Macrophomina phaseolina*. As demais misturas avaliadas apresentaram moderada fungitoxicidade ao patógeno.

**Palavras-chave:** Podridão de carvão. Infecção. Fungicidas. Controle.

BRACALE, M. F. **Methods of inoculation of *Macrophomina phaseolina* associated to water stress in soybean and fungitoxicity of products to the pathogen.** 70 p. Dissertation ( Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

The charcoal rot is a disease that occurs in all soybeans producing regions of Brazil. The incidence and severity of the disease has been associated with plant stress conditions due to lack of water and high soil temperature. The charcoal rot is a disease of difficult control, with no registered chemical control for soybean crop. In order to explore the favorable conditions for infection and chemical control of *Macrophomina phaseolina* the present dissertation was divided into two bioassays. The first bioassay (or bioassay 1) aimed to evaluate methods of fungus inoculation. The treatments consisted of: infected toothpick method, burial of disks of culture medium with mycelial growth of the pathogen, infected seeds and soil naturally infested. All the methods were associated with water stress for a period of ten days. Stress was maintained through daily vase weighing, divided into four phases, beginning at 27, 45, 60 and 75 days after sowing. The evaluations consisted in the observation of the presence of signs of the pathogen, soon after the period of stress. The experimental design was completely randomized, with five replications. The data were submitted to analysis of variance and the means grouped by the Scott-Knott test at 5% of probability, with the aid of software "R", package "drc". After the second period of stress, all treatments presented the signs of the pathogen, with and without water stress. All inoculation methods tested were efficient in the development of *M. phaseolina* in soybean plants. The water stress factor favored the disease, although it was not essential. The second bioassay (or bioassay 2) aimed to test the mycelial inhibition of *M. phaseolina* submitted to different fungicides. The treatments consisted in exposing the pathogen to the following fungicides mixtures: prothioconazole + trifloxystrobin + bixafen, trifloxystrobin + cyproconazole, picoxystrobin + cyproconazole, azoxystrobin + benzovindiflupyr, mancozeb, difenoconazole + cyproconazole, propiconazole + difenoconazole, epoxiconazole + fluxapyroxad + pyraclostrobin and carbendazim. Five concentrations were used: 0.01ppm; 0.1ppm; 1.0ppm; 10.0ppm; 100.0ppm of the formulated product. To represent the control, Petri dishes containing only the pathogen were used in BDA culture medium without addition of fungicide. The evaluation of the mycelial growth was performed with the aid of a pachymeter, measuring the diameter of the colonies the moment the growth of the fungus in the control treatment reached the border of the Petri dish. The experimental design was completely randomized, with seven replicates. The data were adjusted to the log-logistic model. The calculations were performed with software "R", package "drc". The mixtures picoxystrobin + cyproconazole, azoxystrobin + benzovindiflupyr, epoxiconazole + fluxapyroxad + pyraclostrobin and carbendazim were considered highly fungitoxic to the fungus *Macrophomina phaseolina*. The other mixtures evaluated showed moderate fungitoxicity to the pathogen.

**Keywords:** Water stress. Infection. Root diseases. Fungicides. Control.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Ciclo de vida de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	18
<b>Figura 3.1 -</b>	Isolamento indireto de <i>Macrophomina phaseolina</i> através de plantas de soja infectadas e manutenção do patógeno .....	30
<b>Figura 3.2 -</b>	Conteúdo relativo de água (CRA) estimado de plantas de soja em condições de capacidade de campo aos 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura (DAS) .....	38
<b>Figura 3.3 -</b>	Conteúdo relativo de água (CRA) estimado de plantas de soja em condições de estresse hídrico aos 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura (DAS).....	39
<b>Figura 3.4 -</b>	Diferença entre o conteúdo relativo de água (CRA) das plantas em capacidade de campo e das plantas mantidas sob estresse hídrico aos 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura (DAS) .....	40
<b>Figura 4.1 -</b>	Isolamento de <i>Macrophomina phaseolina</i> em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e desenvolvimento completo do patógeno .....	45
<b>Figura 4.2 -</b>	Concentração em ppm de Fox XPRO ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	50
<b>Figura 4.3 -</b>	Concentração em ppm de Sphere Max ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	52
<b>Figura 4.4 -</b>	Concentração em ppm de Approach Prima ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	53
<b>Figura 4.5 -</b>	Concentração em ppm de Elatus ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	51
<b>Figura 4.6 -</b>	Concentração em ppm de Unizeb Gold ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	52

<b>Figura 4.7 -</b>	Concentração em ppm de Cypress ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	53
<b>Figura 4.8 -</b>	Concentração em ppm de Score Flexi ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	53
<b>Figura 4.9 -</b>	Concentração em ppm de Ativum ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	53
<b>Figura 4.10 -</b>	Concentração em ppm de Carbendazim ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	54
<b>Figura 4.11 -</b>	Inibição “in vitro” de 50% do crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> na presença de diferentes concentrações de fungicidas.....	54



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Incidência de <i>Macrophomina phaseolina</i> em plantas de soja submetidas a estresse hídrico e em capacidade de campo.....	34
<b>Tabela 4.1</b> - Fungicidas avaliados quanto à fungitoxidade no controle "in vitro" de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	46
<b>Tabela 4.2</b> - Porcentagem de controle de <i>Macrophomina phaseolina</i> obtida a partir da exposição à diferentes doses de fungicidas a partir do produto formulado .....	48
<b>Tabela 4.3</b> - Concentração dos produtos formulados em relação à dose e ao volume de calda recomendados pelos fabricantes .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRA	Conteúdo Relativo de água
DAS	Dias após a semeadura

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	Importância econômica da cultura da soja .....	13
2.2.1	Doenças radiculares .....	14
2.3	Etiologia de <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	16
2.3.1	Ciclo de vida e infecção do patógeno .....	17
2.4	Métodos de inoculação para <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	21
2.5	Métodos de controle para <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	22
2.5.1	Controle Cultural.....	23
2.5.2	Controle Biológico.....	24
2.5.3	Controle Genético.....	25
2.5.4	Controle Químico.....	26
<b>3.</b>	<b>ARTIGO A: Métodos de inoculação para <i>Macrophomina phaseolina</i> em plantas de soja submetidas a estresse hídrico</b> .....	27
3.1	INTRODUÇÃO.....	27
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
3.4	CONCLUSÃO .....	41
<b>4.</b>	<b>ARTIGO B: Inibição micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> a diferentes fungicidas</b> .....	42
4.1	INTRODUÇÃO.....	45
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	45
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.4	CONCLUSÃO .....	57
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	59
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

A soja é uma cultura de grande valor na balança comercial brasileira, correspondendo a quase 50% das exportações no setor do agronegócio, e atingindo valores acima de U\$ 4 bilhões com a venda dos produtos do complexo da oleaginosa (MAPA, 2016).

A produção de soja no Brasil abrange 57% da área de grãos plantada no país, anualmente o produtor chega a perder até 20% de sua safra devido à ocorrência de doenças (HENNING, 2009; CONAB, 2018). Em torno de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram relatadas. Dentro das limitações que os produtores de soja enfrentam no Brasil, as doenças se apresentam como uma das principais ameaças à produção dessa cultura. Muitas doenças são descritas como fator limitante da produtividade, sendo que a importância econômica dada a cada uma delas difere de acordo com o ano e a região, condição climática e inóculo, variando de safra para safra (ZAMBOLIM; COSTA; VALE, 1997; MICHEREFF; PERUCH; ANDRADE, 2005; EMBRAPA, 2013).

Algumas doenças atacam o sistema radicular da cultura, visto serem patógenos habitantes do solo, tendendo a aumentar devido a expansão da soja para novas áreas de cultivo e também como consequência da monocultura.

Entre as doenças que atacam o sistema radicular e colo da cultura, destaca-se a podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Nos últimos anos tem apresentado aumento no número de relatos em todo o mundo. O fungo é considerado saprófita e sobrevive em restos culturais e no solo, através da formação de estruturas de resistência conhecidas como microescleródios (ALMEIDA et al., 2014).

O patógeno pode causar doenças em mais de 500 espécies de plantas, causando morte em pré e pós emergência, podendo ser transmitido através de sementes contaminadas. As condições que favorecem o ataque do fungo são principalmente o estresse hídrico associado a altas temperaturas, atacando o sistema radicular da planta causando a degradação dos tecidos, menos do xilema. Assim, murcha e morte da parte aérea são sintomas característicos da doença, bem como podridão de carvão das raízes e colo e tombamento de plântulas, podendo ser

observadas principalmente nos estágios finais da cultura. Contudo, a doença também pode se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento da planta.

Os métodos de controle da doença compreendem a rotação de culturas, uso de sementes saudáveis, cultivares resistentes. Na cultura da soja, não há registro de controle químico para essa doença.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram:

- Testar diferentes métodos de inoculação do patógeno *Macrophomina phaseolina* em plantas de soja associadas ao estresse hídrico, a fim de se definir a melhor metodologia para estudos.
- Avaliar a fungitoxidade de diferentes fungicidas no controle de *Macrophomina phaseolina*, utilizando o método de inibição do crescimento micelial do fungo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância econômica da cultura da soja

Nos últimos trinta anos, a produção de soja tem se consolidado com uma das atividades econômicas que mais apresentou desenvolvimento dentro dos segmentos do agronegócio mundial. Na conjunção atual, o Brasil possui grande participação na oferta e demanda de produtos do complexo soja, o qual vem contribuindo significativamente para a economia do setor primário, garantindo sua posição de alta relevância na balança comercial brasileira (FARIAS, 2010; MAPA, 2016).

Alguns fatores vêm estimulando o desenvolvimento de diversas regiões brasileiras, como a expansão do mercado externo pelo comércio de produtos do complexo soja, tal como a exploração de novas áreas de cultivo e beneficiamento ao redor do mundo, estabilização da oleaginosa como fonte de proteína para a alimentação animal, entre outros (LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

A soja (*Glycine max* L.) corresponde a 57% da área plantada em grãos no Brasil. O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e eficiência dos produtores brasileiros (CONAB, 2018; MAPA, 2016).

De acordo com a descrição da Embrapa Soja (2004) o grão de soja, em média, possui 40% de proteínas, 20% de lipídeos (óleo), 5% de minerais e 34% de carboidratos (açúcares como glicose, frutose e sacarose, fibras e os oligossacarídeos).

Dada suas qualidades nutricionais, sua facilidade de adaptação a quase todas as regiões do globo, alta produção e viabilidade de cultivo, podendo ser considerada como um dos alimentos para a população do futuro (BELLAVIER; SNIZER, 1999).

Pode ser cultivada em várias regiões do país, com características edafoclimáticas típicas. Vários fatores podem contribuir para a diminuição da produtividade dessa cultura, como as doenças de origem fúngica, bacteriana e viral (ALMEIDA et al., 2016). É uma cultura atacada por um grande número de patógenos, com levantamentos bibliográficos indicando o ataque de mais de 100 tipos de doenças, sendo que destas, 35 são consideradas economicamente importantes por provocarem perdas na produção (HARTMAN; SINCLAIR, 1999).

Dentro desse panorama, o produtor rural chega a perder entre 15 e 20% de sua safra por conta da ocorrência de doenças. Esse número tende a aumentar devido ao crescimento da soja para novas áreas de produção e também como resultado do estabelecimento da monocultura (HENNING, 2009).

No Brasil, doenças do sistema radicular são descritas em quase todas as regiões de cultivo, com intensidade alterando em razão do inóculo presente na área, das condições climáticas, de métodos de manejo do solo e do nível de resistência da cultivar (ZAMBOLIM; COSTA; VALE, 2005).

A podridão de carvão é a doença radicular mais comumente encontrada nas lavouras de soja do país (REIS; BOARETTO; DANELLI, 2014).

## 2.2 Doenças radiculares da cultura da soja

As doenças que afetam o sistema radicular das plantas se destacam nas culturas de interesse econômico como um dos principais motivos de diminuição na produtividade (HILLOCKS; WALLER, 1997).

Os patógenos de raiz em associação com as plantas, tornaram-se altamente adaptados ao ambiente, atrapalhando e até mesmo impedindo o controle das doenças radiculares (BRUEHL, 1987). Como a infecção e o desenvolvimento inicial das doenças ocorrem abaixo do nível do solo, na maioria das vezes, os patógenos radiculares somente são notados quando alcançam estados avançados de infecção. Por isso, as alternativas de controle tornam-se restritas, visto que ficam relativamente inacessíveis à ação direta do homem (WHEELER et al., 2001).

As doenças radiculares da soja, como: murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *glycines*), murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii*), podridão radicular mole (*Phytophthora megasperma* f.sp. *glycine*), podridão de carvão (*Macrophomina phaseolina*), tombamento de plântulas (*Rhizoctonia solani*; *Pythium* spp.), podridão radicular vermelha (*Fusarium solani*), podridão branca (*Sclerotinia sclerotiorum*), podridão radicular seca (*Fusarium solani* f.sp. *sojae*), normalmente são resultantes de solos com condições onde o cultivo da soja propicia seu desenvolvimento (MICHEREFF; PERUCH; ANDRADE, 2005).

### 2.2.1 Podridão de carvão da soja

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid é o causador da podridão de carvão na soja, sendo capaz de infectar raízes, hastes, folhas e frutos de diversas espécies vegetais como feijão, milho, sorgo, algodão, melão e girassol (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012; ALMEIDA et al., 2014; LINHARES et al., 2016). No Brasil, a ocorrência desse patógeno foi relatada pela primeira vez infectando raízes de feijão (BITANCOURT, 1935). Todavia, por manifestar sintomas habitualmente no final do desenvolvimento da cultura, não foi dada grande importância à doença. Os primeiros relatos de danos em soja no Estado do Paraná, no final da década de 1970, atingiram cerca de 50% da produção (FERREIRA; LEHMAN; ALMEIDA, 1979; COELHO NETO, 1994; ALMEIDA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2014).

Tem sido relatado altas variações nos níveis de danos no rendimento da cultura da soja. Quanto aos danos de rendimentos pertinentes à ocorrência da doença de podridão de carvão em soja nos dez maiores países produtores, em 1994, ultrapassou 1,2 milhões de toneladas (WRATHER et al., 1997). Nos EUA, a doença foi responsável pelos dois maiores danos na cultura, quando comparada com outras doenças do Central Mississippi e Alabama, Central Illinois e Indiana (GOMES, 2014), sendo então classificada em segundo lugar na lista de doenças que afetaram a produção de soja em 2003 nos EUA (WRATHER; KOENNING 2006). Há carência de informações atualizadas sobre as perdas e danos causados por *M. phaseolina* na cultura da soja, principalmente a nível nacional.

Assim como para outras culturas, o método mais prático e econômico para controlar a podridão de carvão seria através do uso de cultivares resistentes, no entanto, nenhum genótipo foi identificado com resistência a essa doença, apenas com moderada resistência (PARIS et al., 2006; MENGISTU et al., 2011; MENGISTU et al., 2013).

Uma alternativa de controle poderia ser através do uso de rotação de culturas. Contudo, este fungo é polífago, tendo a habilidade de infectar um grande número de espécies de plantas, além de ser capaz de sobreviver e multiplicar em restos culturais (PEARSON et al., 1984; ALMEIDA et al., 2001).

Precisamente por esta capacidade de infectar inúmeras espécies de plantas, o controle através de rotação de culturas torna-se uma prática de pouco sucesso. Poderia, contudo, ser utilizada para estimular a interferência na biologia e na sobrevivência do fungo, através de manejo do solo, propiciando um ambiente



adverso para o desenvolvimento do patógeno e/ou favorecendo organismos antagônicos (KENDIG; RUPE; SCOTT, 2000).

Em relação ao controle químico, ainda não há nenhum produto com ação fungicida ao patógeno registrado para cultura da soja (AGROFIT, 2017).

### **2.3 Etiologia de *Macrophomina phaseolina***

O fungo pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae, sendo caracterizado pela produção de picnídios e microescleródios nos tecidos dos hospedeiros, os quais são responsáveis pela capacidade de sobrevivência do patógeno na ocorrência de longos períodos sem a planta hospedeira ou em quaisquer outras condições adversas que impossibilitem seu desenvolvimento (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). O micélio do fungo é uninucleado com crescimento concêntrico de coloração acinzentada a preto com as hifas formando ramificações em ângulo reto (MACHADO; KIMATI, 1975). O fungo produz picnídios negros e globulosos, que geralmente ocorrem nos tecidos vivos, sendo que apenas alguns isolados formaram picnídios em BDA com ambiente controlado (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). *M. phaseolina* é um patógeno polífago, por essa razão não é possível garantir a especificidade de seu hospedeiro (MAIA; SILVA; MEYER, 2004).

Os exsudados liberados pelo sistema radicular da planta induzem a germinação dos microescleródios e por consequência, levam à infecção das raízes dos hospedeiros. Dessa forma, o micélio penetra na epiderme da raiz e fica limitado aos espaços intercelulares do córtex das raízes primárias, implicando no colapso das células adjacentes, podendo ocasionar a morte de plântulas. Durante a fase do florescimento, as hifas do patógeno crescem intracelularmente através do xilema e formam microescleródios bloqueando o sistema vascular do vegetal (KAUR et al., 2012).

Segundo Pearson, Leslie e Scwenk (1987) existem diferenças morfológicas entre isolados e quando cultivados em BDA alguns deles não produziram picnídios, e também podem variar quanto a virulência.

A incidência e severidade da doença tem sido associada a condições de estresse da planta por falta de água e alta temperatura do solo (PEARSON et al., 1984; SMITH; WYLLIE, 1999; WRATHER et al., 2008). Solos compactados ou com tendência à compactação podem afetar o crescimento radicular em profundidade,

tornando a planta propensa ao estresse hídrico. O baixo potencial hídrico aumenta a suscetibilidade das plantas reduzindo a atividade de agentes antagônicos à doença, caracterizando o desenvolvimento da podridão de carvão a regiões de cultivo de soja propensas à estiagem (BERGAMASCHI et al., 1999; ALMEIDA et al., 2014).

### 2.3.1 *Ciclo de vida e infecção do patógeno*

Microescleródios presentes no solo, sementes infectadas e restos de cultura servem como fonte primária de inóculo e como forma de sobrevivência do fungo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Os microescleródios são estruturas multicelulares, produzidas a partir de emaranhado de micélio, sendo resistentes a condições adversas, com pigmento de melanina que confere proteção contra os raios UV do sol, sendo facilmente encontrados sob a epiderme do sistema radicular das plantas, ou então na camada externa do córtex e na região do colo (ALMEIDA et al., 2014).

A decomposição dos tecidos vegetais ocasiona a liberação desses microescleródios no solo. Uma vez em contato com a região do colo ou da raiz da planta, germinam e infectam as raízes. Um microescleródio pode ter células germinando e infectando plantas em estádios diferentes das plantas, visto que nem todas germinam ao mesmo tempo (ALMEIDA et al., 2014).

Dessa forma, o fungo se propaga através do caule da planta tornando os tecidos vasculares marrom-avermelhados. O patógeno pode penetrar nas vagens e grãos, induzindo diversos sintomas, tais como manchas nas sementes e às vezes, forma microescleródios nas vagens e sementes (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Os microescleródios produzidos nos tecidos vasculares e na medula criam uma aparência de acinzentada a escura no caule, e a epiderme da raiz se destaca com facilidade (ALMEIDA et al., 2001).

A infecção do sistema radicular pode acontecer desde o início da germinação da semente (ALMEIDA et al., 2014) (Figura 1). Os exsudados do sistema radicular induzem a germinação dos microescleródios e leva à infecção do hospedeiro. Durante a patogênese, o micélio de *M. phaseolina* penetra na epiderme das raízes, ficando restrito aos espaços intercelulares do córtex das raízes primárias. O resultado são as células adjacentes que entram em colapso podendo ocasionar a morte de plântulas (MAYÉK-PÉREZ et al., 2002; KHAN, 2007; KAUR et al., 2012).

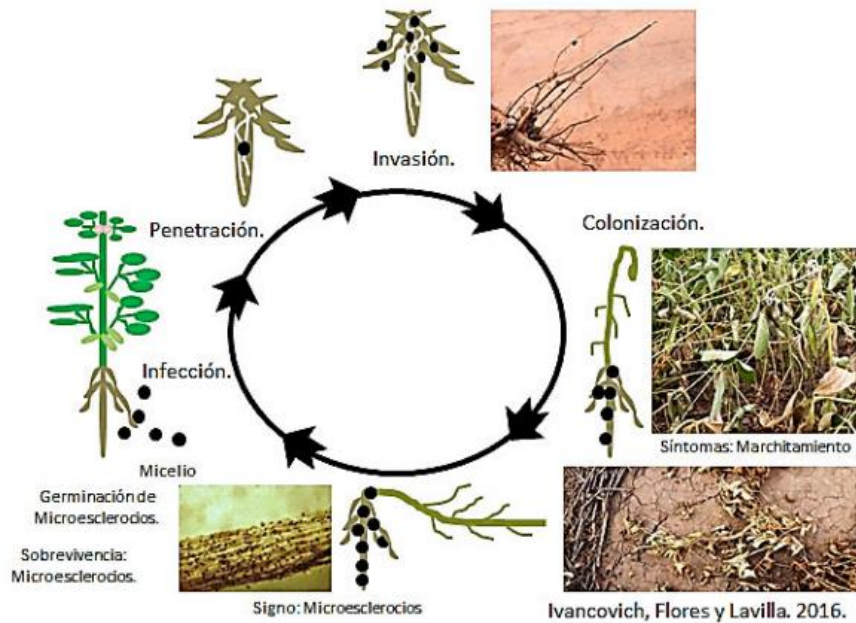


Figura 1. Ciclo de vida de *Macrophomina phaseolina*. Fonte: Ivancovich, Flores e Lavilla (2016).

Lesões no colo da planta são superficiais e geralmente possuem coloração marrom-avermelhada. Radículas infectadas exibem tecidos com escurecimento. Após o estágio de florescimento e associado ao déficit hídrico, as folhas apresentam sintomas de clorose, os quais secam adquirindo coloração marrom mantendo as folhas aderidas aos pecíolos. Esses sintomas devem-se ao desenvolvimento micelial do fungo através do xilema, que, ao formar os microescleródios, bloqueia os vasos e causa a ruptura das células do hospedeiro. Nessa etapa, as plantas exibem raízes de cor cinza, apresentando microescleródios negros nos tecidos (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990; NDIAYE, 2007).

Posteriormente à morte da planta, a colonização dos tecidos do hospedeiro e a formação de microescleródios continuam, tornando-se a principal fonte de inóculo do patógeno. Após a decomposição dos restos vegetais do hospedeiro os microescleródios são liberados no solo (MIHAIL, 1989), podendo sobreviver de 2-15 anos dependendo das condições ambientais (BAIRD; WATSON; SCRUGGS, 2003).

As plantas que sobrevivem à infecção inicial irão apresentar amarelecimento sintomático no momento de formação de vagens, parecida à maturação normal, fator que pode atrapalhar na diagnose da doença. O amarelecimento é progressivo, levando à murcha. As folhas continuam aderidas, porém apresentam-se caídas ao longo das hastas (principal característica da doença), em seguida tornam-se secas e de coloração marrom-escura (EMBRAPA, 2004; ALMEIDA et al., 2014).

#### **2.4 Métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina***

O desenvolvimento de métodos de inoculação objetivando a avaliação da resistência de doenças em diversas culturas pode ser dividido em duas categorias os chamados métodos de inoculação artificial e os métodos de inoculação natural (SIVIERO et al., 2002).

De maneira geral, os métodos artificiais de inoculação envolvem a realização de ferimentos nas plantas, possuindo como fatores vantajosos a rapidez de resposta e a facilidade de execução e, dentre as principais desvantagens, o fato de não simularem as condições naturais de infecção, provocarem estresse excessivo nas plantas e, portanto, subestimarem os níveis de resistências dos genótipos avaliados (CLAUDINO, 2013).

Dessa forma, quando se deseja determinar a resistência em condições de campo, onde a distribuição e concentração do inóculo do patógeno pode apresentar alta variabilidade, o método de inoculação escolhido precisa ser o mais fiel à realidade do patossistema no campo (CLAUDINO, 2013; MEDEIROS, 2013).

Para contornar essa desvantagem, utilizam-se métodos de inoculação natural em condições controladas, com a infestação artificial do substrato de cultivo, de forma que a distribuição e concentração do inóculo sejam uniformes e, com isso, a ocorrência de escape seja minimizada, ou mesmo eliminada (CLAUDINO, 2013).

Panizzi (1988) avaliando a reação de cultivares de feijoeiro à *M. phaseolina* através de inoculação artificial via sementes infectadas, verificou que o comportamento das plantas variou desde o resistente ao altamente suscetível.

Para inoculação de *M. phaseolina*, o método do palito tem sido o mais indicado em beterraba (MAHMOUDI; GHASHGHAIE, 2012), sorgo (KAVITHA, 2007), e melão (ITO; BRAZ; CAMARO, 2009). O método de inoculação com discos de meio

de cultura, contendo estruturas do patógeno no colo da planta foi utilizado com sucesso por Salari et al. (2012) na avaliação de cultivares ao referido fungo. Uma adaptação desse método foi feita por Twizeyimana et al. (2012) ao posicionar o disco de meio de cultura na haste de plantas de soja.

Lima et al. (2013) relatam que a infestação do solo com sementes de crotalária colonizadas com *M. phaseolina* mostrou-se eficiente em ocasionar a doença. Souza (2016) testou métodos de inoculação artificial do patógeno em plantas de feijão-fava observando que inoculação do grão de arroz infestado e disco de micélio foram eficientes na inoculação artificial de *M. phaseolina*. Pires e Beserra Junior (2017) também testaram tais métodos juntamente com o de palito de madeira infestado e obtiveram os mesmos resultados em feijão-fava.

## **2.5 Métodos de controle para *Macrophomina phaseolina***

De forma geral, os métodos de controle de doenças de plantas seguem os Princípios de Whetzel, onde podem ser direcionados ao ambiente (evasão e regulação), ao patógeno (evasão, exclusão e erradicação) e também ao hospedeiro (terapia, proteção e imunização), englobando assim os vértices do triângulo da doença (KIMATI; BERGAMIN FILHO, 2005).

Dentre tais medidas, os fungicidas (SOUZA; DUTRA, 2003) e também a utilização de genótipos resistentes são as opções mais frequentemente adotadas (LOPES; KIMATI, 1988ab; DE; KAISER, 1991; AIRES et al., 1994; MARINGONI; LAURETTI, 1999).

### **2.5.1 Controle Cultural**

Devido ao conhecimento da ação polífaga de *M. phaseolina*, fica evidente que o sistema de rotação de culturas é um método ineficaz para o controle dessa doença (SHORT; WYLLIE; BRISTOW, 1980). Contudo, alguns autores ainda indicam essa medida desde que seja adotada espécies selecionadas de gramíneas, por exemplo, outras que não milho, sorgo e trigo, além da remoção dos restos culturais, visando a redução do inóculo na área de cultivo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ARAÚJO et al., 2007). A escolha de regiões de plantio que possuam regimes

pluviais precisos ou que tenham seu suprimento de água por irrigação também é uma medida eficaz (ARAÚJO et al., 2007).

Estudos realizados por Almeida et al. (2001) em restos de cultura da cultura da soja mantidos sob ou sobre o solo, demonstraram que o fungo sobrevive e se multiplica saprofiticamente. Complementarmente, a população de microescleródios foi proporcional ao número de anos cultivados, sucessivamente, com soja e milho, ambas hospedeiras ao patógeno.

Dentre as condições ambientais que contribuem para a ocorrência da doença causada por esse patógeno pode-se citar as altas temperaturas e baixo nível de umidade do solo (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). Diante disso, a utilização de práticas culturais tais como a cobertura do solo com resíduos vegetais é bem vista, uma vez que reduzem tanto o aquecimento (RESENDE et al., 2005; COELHO et al., 2013a) quanto a perda de água do solo, preservando-o em condições de maior umidade quando comparado ao solo descoberto, portanto, destacam-se como uma possibilidade de escolha para diminuir o potencial de inóculo e a incidência da doença nas culturas (TEÓFILO et al., 2012; COELHO et al., 2013b).

Para Hasna et al. (2007), a melhor alternativa para o manejo de doenças radiculares é o uso da adubação verde, através da utilização de espécies leguminosas e até mesmo gramíneas que visem diminuir a população dos patógenos no solo.

A matéria orgânica presente no solo pode influenciar na supressividade de doenças, através do estímulo da atividade da microbiota, aumentando a viabilidade das ações dos agentes antagonistas e reduzindo o potencial de inóculo dos fitopatógenos presentes, pela ação de compostos disponibilizados durante a decomposição da matéria orgânica (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Entretanto, o uso do filme de polietileno, comumente empregado no cultivo de hortaliças para supressão de plantas daninhas, pode promover o aquecimento do solo (RESENDE et al., 2005; COELHO et al., 2013a), o que por ventura pode potencializar a ocorrência da doença. Cunha (2012) descreveu que essa prática favoreceu o aumento de danos ocasionados pelo fungo *M. phaseolina*, visto que este patógeno é beneficiado por temperaturas elevadas.

### 2.5.2 Controle Biológico

O controle de patógenos através de medidas alternativas e biológicas pode abrandar os efeitos negativos dos produtos fitossanitários no ambiente, nos alimentos e na resistência dos patógenos aos princípios ativos (THAKKAR; SARAFI, 2015).

O controle biológico fitopatógenos habitante do solo conta com o emprego de microrganismos, podendo representar um método seguro e eficiente. Diversos trabalhos têm demonstrado que alguns antagonistas podem proteger as sementes da ação de fitopatógenos, às vezes de forma tão efetiva quanto o emprego de produtos químicos (DOLEY; JITE, 2012).

Dentre os diversos agentes de controle biológico, espécies de *Trichoderma* têm sido largamente investigadas e utilizadas dada a sua capacidade de controle de fitopatógenos (VINALE et al., 2008; DOLEY; JITE, 2012; GAJERA et al., 2012). Dentre as espécies, *T. harzianum* e *T. asperellum* são as mais estudadas, além de outras como *T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii*.

As espécies desse gênero produzem enzimas que causam degradação das paredes celulares dos fungos que hiperparasitam, sendo a produção dessas enzimas diretamente relacionada com a eficácia no processo de hiperparasitismo (KUMAR et al., 2012). O poder competitivo e a capacidade do antagonista em se estabelecer no solo e sobreviver às condições adversas é um ponto chave para o sucesso do controle do fitopatógeno (MENEZES et al., 2004).

Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas também estão sendo avaliados quanto à eficácia no controle de fitopatógenos de solo (BETTIOL, 2012).

### 2.5.3 Controle Genético

Assim como para outras doenças, o método mais prático e econômico para se controlar *M. phaseolina* em soja seria através do uso de cultivares resistentes, porém, não há ainda cultivares comerciais resistentes a esse fungo (PARIS et al., 2006; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011; MENGISTU et al., 2013).

Para a cultura do sorgo, mesmo que tenha sido encontrada resistência a *M. phaseolina* em muitas cultivares (ROSENOW, 1978), poucas possuem tal resistência juntamente com características agronômicas desejáveis.

Sendo a resistência genética uma prática de controle ambientalmente mais eficaz para controlar a doença de podridão cinzenta do caule em feijoeiro comum (SINGH; SCHWARTZ, 2010), a identificação de genótipos com resistência que seja durável durante todo o período de cultivo auxiliaria no manejo da doença.

Em relação à cultura do caupi, os trabalhos referentes às fontes de resistência genética a *M. phaseolina* são insuficientes. Com isso, é importante evidenciar os trabalhos realizados por Rodrigues et al. (1997), bem como os de Pio-Ribeiro e Assis Filho (1997), os quais ressaltam a existência de variabilidade no comportamento de alguns genótipos à podridão de carvão, com evidente indicação de fontes de resistência ao patógeno.

Para a cultura da soja, não há ainda uma cultivar comercial que seja resistente ao ataque desse patógeno, fazendo com que pesquisadores, assistentes técnicos e produtores fiquem preocupados com a sua ocorrência e com os danos causados pela podridão de raízes de *Macrophomina* à cultura, principalmente no que se refere à baixa eficiência de controle de outras práticas (REIS; BOARETTO; DARNELLI, 2014).

Contudo, estudos descrevem a existência de genótipos de soja que apresentam menores níveis de infecção ou então que foram classificados como modernamente resistentes ao patógeno, os quais podem ser utilizados em programas de melhoramento destinados à obtenção de cultivares que resistam, mesmo seja de modo parcial, à infecção de *M. phaseolina*, diminuindo assim a possibilidade de altas perdas pela doença (ALMEIDA et al., 2014).

#### 2.5.4 Controle Químico

Assim como a maioria das doenças, os fungos habitantes do solo causam grandes perdas econômicas em diversas espécies cultivadas. Tais fungos podem ter a capacidade de produzir estruturas de resistência que favorecem a sua sobrevivência quando deparados a condições adversas ao seu desenvolvimento (MICHEREFF; PERUCH; ANDRADE, 2005).



Frequentemente, o controle químico para patógenos habitantes do solo pode ser ineficiente e dispendioso, além de ocasionar a contaminação do ambiente e a possível destruição da microbiota benéfica do solo (KUMAR et al., 2015).

De acordo com Coutinho et al. (2012), por ser um patógeno habitante do solo, o controle químico de *M. phaseolina* no campo é econômica e ambientalmente inviável, assim, recomenda-se o tratamento químico das sementes de forma a proteger a planta nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Dentre as culturas de alto valor econômico para o país, apenas o feijão apresenta registro de fungicidas para o controle da doença via tratamento de sementes, abrangendo os grupos químicos dos triazóis, dimetilditiocarbamatos e carboxanilidas (AGROFIT, 2018). Dada a importância econômica da cultura da soja, se faz necessário a avaliação de fungicidas para o controle da doença.

Há diversos estudos sobre a capacidade do uso de herbicidas em diminuir ou aumentar a intensidade de doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo. De forma geral, quando há redução da intensidade de doenças por herbicidas, o desenvolvimento micelial e a esporulação de fungos são inibidos (DUKE et al., 2007). Tem-se avaliado o efeito de um ou poucos herbicidas, sobretudo glyphosate, sobre um ou poucos fungos (SANOGO et al., 2000; MERILES et al., 2006; LARSON, 2006; DUKE et al., 2007).

No caso da cultura da soja, de acordo com os estudos de Johal e Huber (2009), a aplicação de glyphosate em lavouras resistentes ao herbicida tem aumentado, e em alguns casos reduzido, a severidade de certas doenças.

Uma substância é considerada fungitóxica quando em baixas concentrações possui ação tóxica aos fungos. Entretanto, tal capacidade não é dada somente devido ao ingrediente ativo, mas também é dependente das características fisiológicas e genéticas de cada fungo. Ademais, a toxidez de um a substância a um determinado fungo pode ser temporária em razão da manifestação de resistência por parte do patógeno em questão (REIS; REIS; CARMONA, 2010). Se um fungicida não exerce nenhuma ação de fungitoxicidade sobre o fungo, ele é considerado insensível (REIS; REIS; FORCELINI, 2007).

De acordo com a classificação de fungitoxicidade proposta por Edgington, Khew e Barron (1971), substâncias altamente fungitóxicas são aquelas que apresentam  $Cl_{50}$  menor do que  $1\text{mg. L}^{-1}$  ou 1ppm, moderadamente fungitóxicas

quando apresentam  $CI_{50}$  entre 1 e 50 mg. L<sup>-1</sup> (1 e 50ppm) e não tóxicas as substâncias que apresentam  $CI_{50}$  maior do que 50 mg. L<sup>-1</sup>.

## Métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em plantas de soja submetidas ao estresse hídrico

### RESUMO

A podridão de carvão causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* é uma das doenças radiculares mais comuns na cultura da soja, sendo favorecida por condições de estresse hídrico e elevadas temperaturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de inoculação de *M. phaseolina* na cultura da soja associados ao estresse hídrico. Os tratamentos consistiram em quatro métodos de inoculação mais uma testemunha. Os tratamentos foram: método do palito de dente infectado, sementes infectadas pelo patógeno, solo naturalmente infestado, e enterro de discos de meio de cultura com o crescimento micelial do fungo. Os tratamentos foram submetidos à estresse hídrico por falta de água durante dez dias. O estresse foi dividido em quatro fases, sendo iniciado em diferentes idades da planta: aos 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura. As avaliações consistiram na observação da presença de microescleródios nas plantas de soja. O delineamento experimental foi inteiramente causalizado com cinco repetições e teste de comparação de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do software “R”, pacote “drc”. A partir do segundo período de estresse, todos os tratamentos apresentaram desenvolvimento dos sintomas, independente da condição de estresse hídrico. Dessa forma, todos os métodos de inoculação estudados resultaram no desenvolvimento de *Macrophomina phaseolina* em plantas de soja. A condição de estresse hídrico favoreceu o aparecimento da doença, contudo não foi fator essencial em seu desenvolvimento.

**Palavras-chave:** Condição hídrica, infecção, podridão de carvão, sojicultura.

## Inoculation methods for *Macrophomina phaseolina* in soybean plants subjected to water stress

### ABSTRACT

The charcoal rot caused by the fungus *Macrophomina phaseolina* is one of the most common root diseases in soybean and other crops, being favored by water stress conditions and high temperatures. The objective of this work was to evaluate different methods of inoculation of *M. phaseolina* in the soybean crop associated to water stress. The treatments consisted of four methods of inoculation plus one control treatment. The treatments were: infected toothpick method, pathogen infected seeds, soil naturally infested, and burial of culture medium disks with mycelial fungus growth. The treatments were submitted to water stress for lack of water for ten days, which was determined and maintained by daily weighing of the vases, and confirmation by the calculation of the relative water content in the plant, where half of the vases of each treatment were submitted to the water stress, while the other half remained in field capacity. The stress was divided into four phases, starting at different plant ages: at 27, 45, 60 and 75 days after sowing. The evaluations consisted in the observation of the presence of microsclerodes in soybean plants. The experimental design was completely randomized with five replicates and a comparison test of Scott-Knott averages at 5% probability, using software "R", "drc" package. From the second stress period, all treatments presented symptoms development, regardless of the water stress condition. Thus, all the inoculation methods studied resulted in the development of *Macrophomina phaseolina* in soybean plants. The water stress condition favored the development of the disease, but it was not an essential factor.

**Key-words:** Water stress, infection, charcoal rot, soybean crop.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Dentro das limitações que os produtores de soja enfrentam no Brasil, as doenças se apresentam como uma das principais ameaças à produção dessa cultura. Os danos anuais de produção por doenças são avaliados em 15% a 20%. Inúmeras doenças são descritas como fator limitante da produtividade, sendo que a importância econômica dada a cada uma delas difere de acordo com o ano e a região, condição climática e inóculo, variando de safra para safra (ZAMBOLIM et al., 1997; MICHEREFF; PERUCH; ANDRADE, 2005; EMBRAPA, 2013).

No cultivo da soja são relatadas mais de quarenta doenças, sendo treze ocorrentes no sistema radicular da cultura, provindas de patógenos habitantes do solo. Dentre essas doenças, destaca-se a podridão de carvão da soja, ou podridão negra das raízes, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. (ALMEIDA et al., 2001).

No Brasil, foi descrita pela primeira vez infectando plantas de feijão no Estado de São Paulo por Ferreira, Lehman e Almeida (1979). Na região norte do Estado do Paraná, constatou-se que em anos secos, as cultivares de soja tardias apresentaram até 50% de perdas na produção (ALMEIDA et al, 2001).

*Macrophomina phaseolina* é um fungo endêmico de solo, cosmopolita, de ação polífaga, com alta capacidade de sobrevivência quando exposto a condições adversas ao seu desenvolvimento. É comumente encontrado em países da América do Norte e do Sul, África, Europa e Ásia (ATHAYDE SOBRINHO, 2004; GOMES et al., 2008). O patógeno é favorecido por condições ambientais de altas temperaturas e estresse hídrico por falta de água, sendo transmitido de forma eficaz pelas sementes (ANDRUS, 1938).

A doença é comumente encontrada nas raízes e colo da planta. De forma geral, seus sintomas se tornam evidentes apenas no final do ciclo da cultura, o que torna sua identificação complicada devido a se assemelharem ao estado natural de senescência das plantas. Por esta razão a doença acaba passando despercebida nas lavouras, agravando a perda do produtor (ALMEIDA et al., 2014).

Dentre as limitadas medidas de manejo dessa doença que podem ser empregadas, orienta-se a rotação de culturas com certas espécies de gramíneas e a eliminação dos restos culturais, ambas medidas objetivam a redução do inóculo na área de cultivo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ARAÚJO et al., 2007). A escolha de

regiões onde se possua regime pluvial definido ou que possuam sistema de irrigação também podem ser consideradas medidas eficazes (ARAÚJO et al., 2007).

A infecção do sistema radicular pode acontecer desde o início da germinação da semente, mas também em qualquer momento do desenvolvimento da planta. Plantas intensamente infectadas morrem precocemente em consequência da produção de toxinas do fungo e pelo bloqueio dos vasos condutores (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; NDIAYE, 2007; ISLAM et al., 2012). As plantas que sobrevivem à infecção inicial irão apresentar amarelecimento sintomático no momento de formação de vagens, parecida à maturação normal, fator que pode atrapalhar na diagnose da doença (KAUR et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014).

Devido à importância dessa doença na cultura da soja, o estabelecimento de uma metodologia adequada à inoculação do patógeno, constitui uma ferramenta a ser utilizada em diversos estudos em relação à doença e seu hospedeiro, bem como no auxílio de métodos de controle. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes métodos de inoculação do fungo *Macrophomina phaseolina* em plantas de soja submetidas a estresse hídrico.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de laboratório e casa de vegetação da Universidade Estadual de Londrina – UEL, em Londrina-PR.

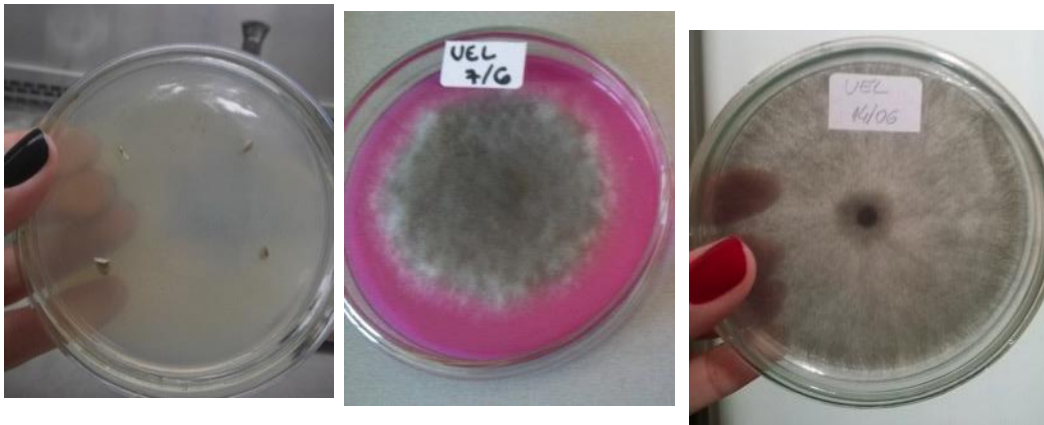
Para dar início aos testes foram coletadas hastes e raízes de plantas de soja apresentando sinais (microescleródios) do fungo *Macrophomina phaseolina*, caracterizando plantas infectadas. As amostras foram coletadas de áreas em cultivo sequencial soja-soja da Fazenda Escola da UEL (Fazesc-UEL).

Após a coleta, as amostras passaram por processo de assepsia, através da lavagem em água corrente, sendo expostas por 60 segundos em álcool (95%), em seguida por 60 segundos em solução de hipoclorito de sódio 0,06% e finalmente lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Com o auxílio de um bisturi, foram retiradas lascas de aproximadamente 1cm da região do colo das amostras de soja. Os materiais vegetais foram então transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata – dextrose - ágar) e mantidos em câmara de crescimento (BOD), no escuro, a 28° C por sete dias (Figura 3.1).

Após obter crescimento micelial, o fungo foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido do corante Rosa Bengala. Posteriormente, o patógeno foi mantido apenas em meio BDA, em câmara de crescimento tipo BOD, no escuro a 28° C (Figura 3.1).

Figura 3.1. Isolamento indireto de *Macrophomina phaseolina* através de plantas de soja infectadas e manutenção do patógeno.

Os tratamentos consistiram em quatro métodos de inoculação mais uma testemunha sem o patógeno. Os métodos utilizados foram:



- T1: testemunha;
- T2: sementes infectadas;
- T3: palito de dente infestado;
- T4: enterro de discos de meio de cultura contendo micélio do patógeno;
- T5: solo infestado.

Para o tratamento testemunha (T1) e demais tratamentos, com exceção do solo infestado, foi utilizado solo proveniente de mata nativa, sem adição artificial do patógeno.

Para o método das sementes infectadas (T2), placas de Petri contendo meio de cultura BDA foram repicadas, recebendo um disco micelial do patógeno. Após seu crescimento ter tomado a placa (7 dias em incubação em estufa a 28°C), 60 sementes de soja sem tratamento ou esterilização foram dispostas nas placas, as quais foram mantidas nas mesmas condições por 48 horas.

Posteriormente a esse período, as sementes apresentavam aderidas a si micélio escuro referente ao patógeno. Prosseguiu-se então a semeadura desse tratamento.

Para o método de inoculação utilizando o palito de dente infestado (T3), o isolado de *M. phaseolina* foi previamente repicado para meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) sendo mantido em placa de Petri em estufa tipo B.O.D. a 28°C por 7 dias até ser utilizada no preparo do inóculo. Para tal, foram utilizadas apenas as pontas de palitos de dente de madeira (medindo aproximadamente 1,5 a 2cm) as quais foram inseridas de forma vertical em um disco de papel sulfite portando o mesmo diâmetro do interior de uma placa de Petri. Os palitos foram previamente autoclavados e ao serem acondicionados com as pontas para cima nas placas, foram novamente esterilizados a 121°C em autoclave por 20 minutos.

Em seguida, verteu-se meio de cultivo BDA mantendo aproximadamente 2 mm da extremidade dos palitos em exposição. Posteriormente à solidificação do meio de cultura, foram repicados nove discos com estruturas do fungo (micélio), sendo então incubados por sete dias, em estufa tipo BOD a 28°C para a completa colonização dos palitos.

Para este tratamento apenas, a inoculação das plantas de soja ocorreu aos 20 dias após a semeadura, onde os palitos infestados foram inseridos no primeiro internódio das plantas.

Para o método de enterro do discos de meio cultura (T4), foram repicadas duas placas de Petri para cada vaso utilizado no tratamento, totalizando 80 discos. Os mesmos foram transferidos para os vasos após permanecerem durante 7 dias em estufa tipo BOD a 28°C para o completo crescimento micelial do patógeno. Após esse período, os discos foram colocados sobre uma camada de terra e areia de forma a preencher todo o diâmetro do vaso, dessa forma, o crescimento radicular da planta iria de encontro ao disco. Em seguida, os discos foram cobertos com o restante da mistura de terra e areia (2:1), para que ocorresse a semeadura.

Para o método de inoculação utilizando solo infestado (T5), foi coletado solo infestado proveniente de áreas com ocorrência da doença sob sistema de cultivo soja-soja a fim de simular o efeito da ocorrência natural em campo. Foi acrescentado areia à mistura na proporção de 2:1, e em seguida foi realizada a semeadura com sementes sadias.



A cultivar utilizada para o experimento foi a BMX Apollo RR. Os vasos consistiram da mistura de terra e areia, na proporção de 2:1, com capacidade de 4kg.

Os tratamentos foram submetidos à estresse hídrico por falta de água, de forma a favorecer o patógeno como consta na literatura (ALMEIDA et al., 2014). Para isso, foi medida a capacidade de campo dos vasos em cada período de estresse, realizando-se medições diárias para que se pudesse repor a quantidade necessária de água para se manter o estresse. O estresse, e por consequência a reposição de água, foi determinado a partir da diferença da pesagem dos vasos de um dia para o outro, sendo estabelecido que metade dos tratamentos permaneceriam a 50% da capacidade de campo, enquanto o restante retornaria à pesagem inicial. Dessa forma, cada tratamento contou com cinco repetições mantidas sob estresse, e cinco repetições mantidas em capacidade de campo.

Para garantir que as plantas de soja se mantiveram sob estresse, para cada período de estresse foi realizada uma coleta de discos foliares das plantas que se mantiveram em capacidade de campo e das plantas mantidas sob estresse hídrico. Foram coletados quatro discos foliares de cada tratamento sob as condições descritas acima, e, com isso, foi determinado o conteúdo relativo de água na planta, estabelecido pela equação:

$$CRA = \frac{(MF - MS)}{MT - MS} * 100$$

Onde, CRA é o conteúdo relativo de água expresso em porcentagem; MF é a massa fresca dos discos foliares; MS a massa seca dos discos após permanência em estufa a 60°C até peso constante, e MT sendo a massa túrgida dos discos que permaneceram submersos em água destilada por 24h.

O estresse hídrico foi dividido em quatro fases, sendo iniciado aos 27, 45, 60 e 75 dias após a emergência, sendo então estabelecidos quatro períodos de estresse com a duração de dez dias.

As avaliações consistiram na constatação da presença dos sinais do patógeno (microescleródios) nas plantas de soja, sendo realizadas ao final do período de estresse.

Todos os métodos de inoculação foram realizados no momento da semeadura, com exceção do método do palito. Este último foi realizado 20 dias após a semeadura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do software R (COREL TEAM, 2017).

### **3.3 RESULTADOS E DICUSSÃO**

A avaliação foi feita de forma visual através da presença dos sinais do patógeno (microescleródios) em cada planta por vaso, totalizando vinte plantas por tratamento (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Incidência de *Macrophomina phaseolina* em plantas de soja submetidas a estresse hídrico e em capacidade de campo.

Tratamentos	Presença de microescleródios (%)							
	Capacidade de Campo				Submetidas ao estresse hídrico			
	27*	45	60	75	27*	45	60	75
T1 testemunha	0b	45b	100a	100a	50b	75a	100a	100a
T2 semente infectada	40b	50b	100a	100a	60a	75a	100a	100a
T3 palito de madeira infestado	60a	80a	100a	100a	80a	100a	100a	100a
T4 enterro de disco de micélio	85a	100a	100a	100a	85a	100a	100a	100a
T5 solo infestado	85a	100a	100a	100a	85a	100a	100a	100a
CV (%)	50,4	43,8	0	0	38,1	18,1	0	0

\*Períodos de início de estresse hídrico: 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura.

\*Porcentagem média de plantas que apresentaram a presença de microescleródios. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados obtidos, a partir de 60 dias após a semeadura (DAS) nos tratamentos em capacidade de campo, e 45 DAS dos tratamentos submetidos a estresse hídrico, os tratamentos não diferiram entre si estatisticamente. Assim, todos os métodos de inoculação foram satisfatórios na demonstração dos sintomas do patógeno, podendo ser considerado o disco de micélio e o solo infestado os mais eficientes por terem 85% de plantas infectadas logo no primeiro período de estresse.

Segundo Andrus (1938), Dhingra e Sinclair (1978) e Santos, Athayde e Dan (1984), para quase todas as espécies hospedeiras de *Macrophomina phaseolina*, o fungo é eficientemente transmitido por sementes. Tanto o micélio quanto os microescleródios se desenvolvem dentro do tegumento (KUNWAR et al., 1986). Contudo as sementes, em geral, não apresentam sinais de infecção (ALMEIDA et al., 2014).

Sementes infectadas exercem um importante papel como fontes de inóculo primário, podendo ou não ocorrer a transmissão dos patógenos para as plântulas. Tal processo dependerá de diversos fatores como: quantidade e localização do patógeno nas sementes, características e relação do hospedeiro e patógeno, e também das condições ambientais em que se encontram (GALLI et al., 2007).

Através das sementes, microrganismos podem ser introduzidos em áreas sem ocorrências anteriores, onde podem vir a sobreviver ao longo dos anos e se disseminar na população de plantas, provocando surtos de doenças (OLIVEIRA et al., 2013). Para *M. phaseolina*, esse período no solo pode atingir até 15 anos (MEYER; SINCLAIR; KHARE, 1974; PAPAIVIZAS, 1977).

Um dos mecanismos de infecção de sementes é através do contato das sementes com o patógeno, que adere na superfície da semente, podendo ser transmitido para as plântulas, mesmo estas não estando infectadas internamente (DHINGRA, 2005; ZAMBOLIM, 2005).

Cruciol e Costa (2017) também avaliaram o método de inoculação pelo contato direto do patógeno com sementes de soja, sendo estas expostas por períodos de 48 e 72 horas. Os autores concluíram que o período estabelecido proporcionou o desenvolvimento precoce dos sintomas, sendo então um método eficiente de inoculação.

O mesmo também foi observado nos trabalhos realizados por Galli et al. (2007), com a inoculação de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja pelo método de contato em meio BDA, onde foi verificado que durante o período de 40 horas esse método ocasionou a morte das sementes e plântulas de soja.

Para Silva et al. (2016), o tempo de contato ou exposição das sementes com o patógeno em estudo é primordial para que se obtenham sementes com diferentes níveis de inóculo.

Rosa (2006) avaliou a metodologia de exposição das sementes de feijão guandu a *M. phaseolina* para seleção de genótipos de resistência através da escarificação das sementes, e constatou que sementes escarificadas em contato direto com o patógeno em exposição de 48 e 60 horas tiveram a germinação reduzida quando comparadas à semente não escarificadas, visto que o processo favoreceu a penetração do fungo e a morte das mesmas.

O presente trabalho confirma os resultados obtidos pelos autores citados ao obter incidência de microescleródio em 50% das plantas avaliadas desde os primeiros estádios de desenvolvimento, dessa forma, pode ser considerado um método eficaz de inoculação.

Medeiros et al. (2015) ao avaliarem o método do palito de dente e o disco de micélio como forma de inoculação de *Macrophomina phaseolina* e *Rizoctonia solani* em meloeiro, observaram que o método do palito foi o mais eficaz para a cultura no objetivo de identificar fontes de resistência aos patógenos. Com este método, o palito introduz o patógeno no tecido vegetal, o que facilita a infecção e a colonização dos tecidos. No presente estudo, o palito foi inserido acima do colo planta, no primeiro internódio, diferente dos estudos de Medeiros et al. (2015). Contudo, também apresentou eficácia na demonstração dos sintomas em plantas de soja.

A adoção do método do palito tem suas vantagens: uma quantidade constante de inóculo é inserida estando em contato direto com o tecido do hospedeiro, o que diminui a possibilidade de contaminação por outras espécies de patógenos, além de ser mais fácil o acompanhamento do progresso da doença (MEDEIROS, 2013).

Há também críticas quanto ao método, e a principal é quanto a sua agressividade. Alguns autores argumentam que a inserção do palito no tecido vegetal causa ruptura da parede celular, a qual pode ser um componente de resistência natural da planta à infecção (EDMUNDS; VOIGT; CARASSO, 1964).

Vale ressaltar que o método foi utilizado com sucesso em culturas como a beterraba (MAHMOUDI; GHASHGHAIE, 2012), sorgo (KAVITHA, 2007), citros (SIVIERO et al., 2002), cenoura (PRYOR; DAVIS; GILBERTSON, 2000), e feijão (LEITE JÚNIOR, 2001; TÔLEDO-SOUZA; COSTA, 2003).

Quanto aos métodos de inoculação via solo, Sousa (2016), testou a inoculação de *Macrophomina phaseolina* em plantas de feijão-fava onde observou que a inoculação via grão de arroz infestado e via disco de micélio foram eficientes na inoculação artificial do patógeno.

Pires e Beserra Junior (2017) avaliaram a patogenicidade de *M. phaseolina* também em feijão-fava utilizando os mesmos métodos de inoculação mais o método do palito de madeira infectado, e obtiveram os mesmos resultados que o autor anterior.

No trabalho apresentado, os resultados obtidos indicaram que as metodologias de inoculação via solo foram eficientes na manifestação dos sintomas em plantas de soja, com incidência de 100% da doença a partir de 50 dias de exposição ao patógeno.

Segundo Medeiros et al. (2015), as metodologias que utilizam a infestação de solo com *M. phaseolina* são menos agressivas, pois exige que o patógeno se estabeleça no solo para então realizar a infecção, dessa forma, o aparecimento de sintomas nas plantas é mais lento. Entretanto, assim como nos estudos realizados por Cruciol e Costa (2017), as metodologias de inoculação via solo testadas no presente trabalho foram eficazes no aparecimento e na rapidez de desenvolvimento dos sintomas em plantas de soja, conseqüentemente, demonstram sua aplicabilidade usando para estudos de seleção de genótipos de resistência à doença de podridão de carvão.

A elaboração de metodologias de inoculação, bem como a sua padronização e aperfeiçoamento, é essencial no estudo das relações patógeno-hospedeiro visando a identificação de fontes de resistência ou mesmo reações de suscetibilidade à doença em questão (COTA et al., 2010).

Dessa forma, metodologias de inoculação são fundamentais para o desenvolvimento de pesquisas referentes à avaliação de resistência genética e ao desenvolvimento de métodos de controle (GALLI et al., 2007; CORRÊA et al., 2008; GARCIA; JULIATTI, 2012; JUNGES et al., 2015).

Gomes (2014) relata que o fungo *M. phaseolina* pode infectar plantas de soja em vários estádios de desenvolvimento e conforme o estágio de crescimento em que a planta é infectada, vários componentes da produtividade da cultura podem ser prejudicados.

Diversos relatos vinculam o déficit hídrico à infecção por *M. phaseolina*. O baixo potencial hídrico eleva a suscetibilidade das plantas ao patógeno e reduz a atividade de microrganismos antagônicos (ALMEIDA et al., 2014). Os relatos de Wrather et al. (2008) apresentam que as diferenças na redução do rendimento na cultura soja provocada pela podridão de carvão entre os anos foi ocasionada pelas diferenças de pluviosidade.

A partir do terceiro período de estresse, que corresponde a 60 dias após a semeadura (DAS), ou seja, atingindo aproximadamente o estágio fenológico

R1 (início da floração), as plantas de todos os tratamentos apresentaram os sinais do patógeno e sintomas de murcha.

Os resultados obtidos pela tabela 3.1 também apresentam que mesmo na ausência de estresse hídrico, o patógeno foi capaz de infectar as plantas de soja e demonstrar sintomas, o que leva a crer que o patógeno independe de condições de estresse desde que haja inóculo suficiente na área.

A manifestação do estresse nas plantas foi acompanhada de forma visual, através da observação dos sintomas de murcha e através do cálculo de CRA (conteúdo relativo de água) (Figuras 3.2 e 3.3).

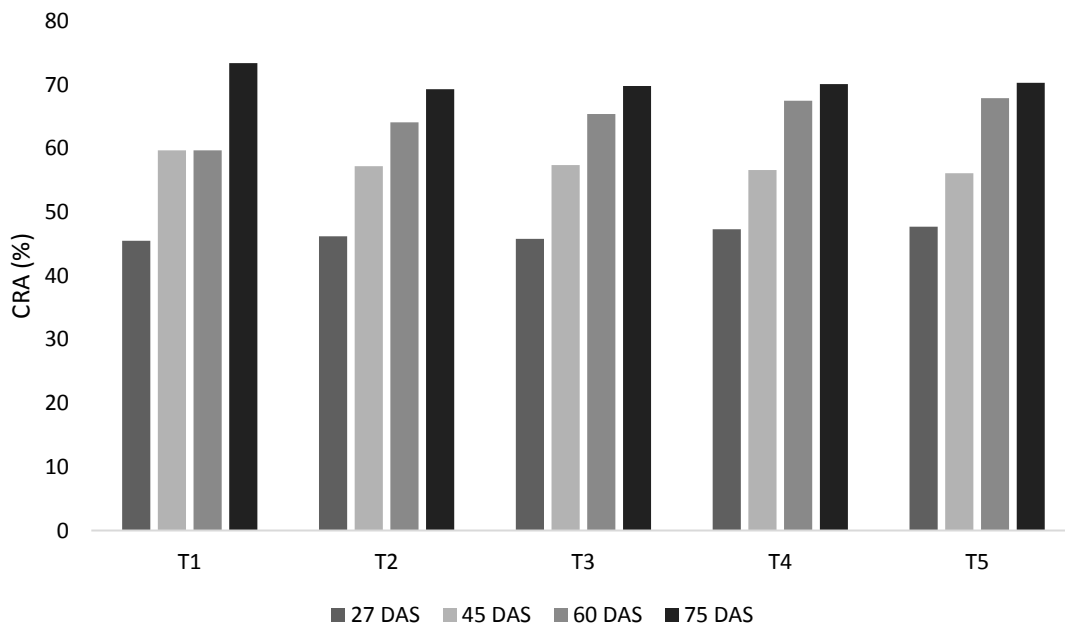


Figura 3.2. Conteúdo relativo de água (CRA) estimado de plantas de soja em condições de capacidade de campo aos 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura (DAS).

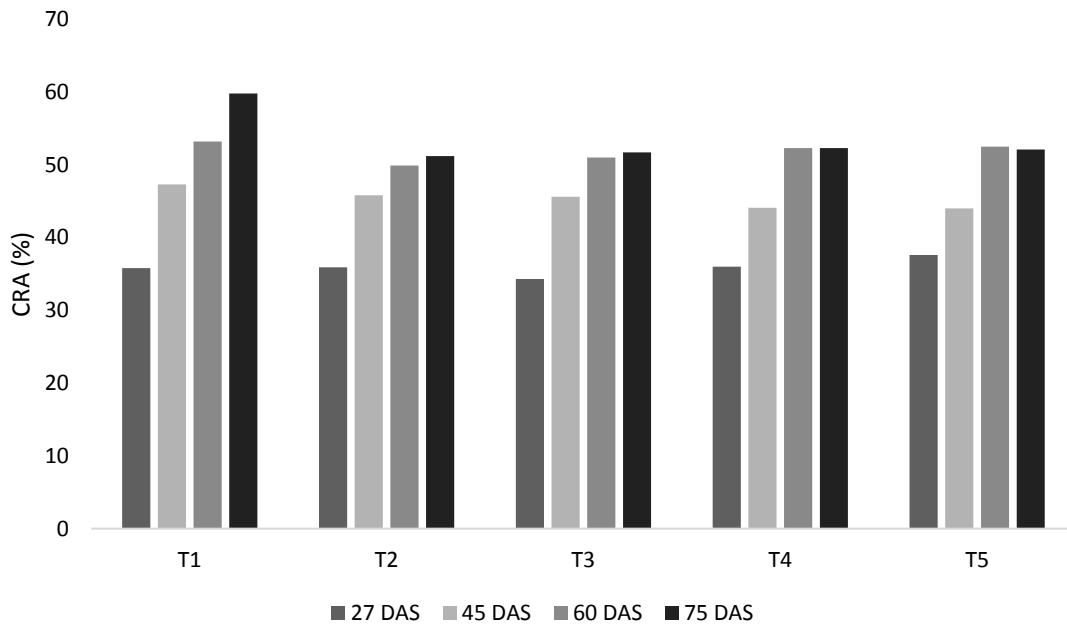


Figura 3.3. Conteúdo relativo de água (CRA) estimado de plantas de soja em condições de estresse hídrico aos 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura (DAS).

Dessa forma, diferença entre os CRAs das plantas em capacidade de campo e das plantas mantidas sob estresse comprovam que o estresse por falta de água durante desenvolvimento da cultura não foi fator condicionante para o desenvolvimento e estabelecimento da doença (Figura 3.4).

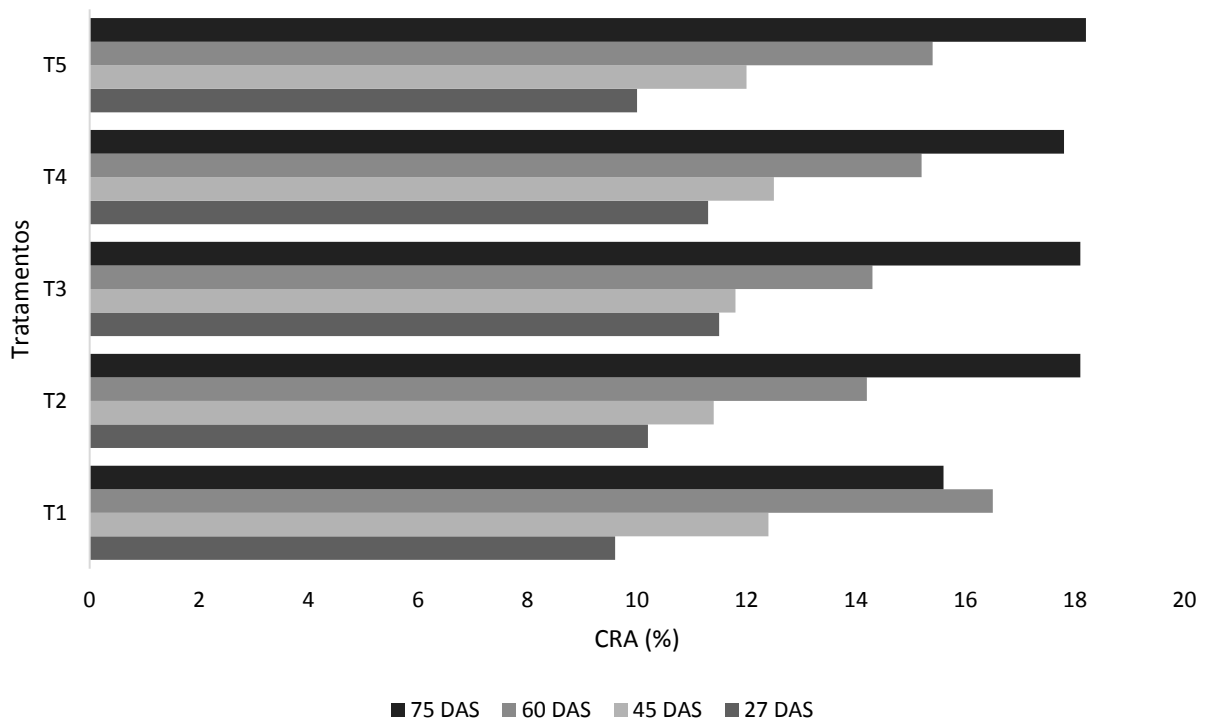




Figura 3.4. Diferença entre o conteúdo relativo de água (CRA) das plantas em capacidade de campo e das plantas mantidas sob estresse hídrico aos 27, 45, 60 e 75 dias após a semeadura (DAS).

Foi observado no presente trabalho a presença de murcha em todos os tratamentos a partir de 60 dias após a semeadura. Tais resultados podem ser correlacionados com a tabela 3.1, onde 100% das plantas de soja possuíam a presença de microescleródios a partir de 45 dias após a semeadura.

De acordo com a interpretação dos resultados, a presença de murcha mesmo nos tratamentos mantidos em capacidade de campo pode ser explicado pelo crescimento micelial do fungo que ocorre durante o florescimento intracelularmente, através do xilema, formando microescleródios, que acabam por provocar o bloqueio dos vasos condutores e a disruptura das células do hospedeiro, inviabilizando o transporte de água pela planta, o que, por sua vez, é traduzido no aparecimento dos sintomas de murcha (MAYÉK-PÉREZ et al., 2002; KHAN, 2007; KAUR et al., 2012).

A incidência e a severidade de *M. phaseolina*, normalmente, têm sido associadas a dois fatores: déficit hídrico e temperatura do solo. Relatos de HSI (1961) e Edmunds (1964), estipularam que a severidade da podridão de carvão na cultura do sorgo foi mais elevada quando as plantas foram expostas a condições de déficit hídrico. Outros exemplos são relatados com algodão (GHAFFAR; ERWIN, 1969) e girassol (BLANCO-LOPEZ; JIMENEZ-DIAZ, 1983).

A ocorrência de microescleródios na testemunha pode ser explicada pelo uso do solo de mata nativa, onde Almeida et al. (2014) relatam que mesmo sendo encontrado em baixa concentração, a presença de microescleródios demonstra que o patógeno é nativo do solo, sendo sua população aumentada após a introdução de monocultivos com espécies hospedeiras.

O mesmo é confirmado pelos relatos de Almeida et al. (2001), onde descreve que estudos realizados na Embrapa Soja, na safra de 1999, demonstraram que esse patógeno é naturalmente encontrado em solos da mata nativa ou em solos cultivados.

Os resultados obtidos por este trabalho abrem perspectivas para o estabelecimento de estratégias de manejo do patógeno.

### 3.4 CONCLUSÕES

Todos os métodos de inoculação estudados resultaram no desenvolvimento de *Macrophomina phaseolina* em plantas de soja.

O solo é fonte natural de inóculo do patógeno, e quando na presença de espécie hospedeira, pode ocorrer o desenvolvimento da doença.

A condição de estresse hídrico favoreceu a ocorrência da doença, contudo não foi fator essencial em seu desenvolvimento.

## Inibição micelial de *Macrophomina phaseolina* a diferentes fungicidas

### RESUMO

A podridão de carvão ou podridão negra das raízes, causada por *Macrophomina phaseolina*, é uma das doenças radiculares mais comuns na cultura da soja, sem produto químico registrado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a fungitoxidade de diferentes fungicidas no controle de *M. phaseolina* através da inibição micelial “in vitro”. Os tratamentos consistiram na exposição do patógeno às seguintes misturas fungicidas: protioconazol + trifloxistrobina + bixafem, trifloxistrobina + ciproconazol, picoxistrobina + ciproconazol, azoxistrobina + benzovindiflupir, mancozebe, difenoconazol + ciproconazol, propiconazol + difenoconazol, epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina e carbendazim. Foram utilizadas cinco concentrações: 0,01ppm; 0,1ppm; 1,0ppm; 10,0ppm; 100,0ppm do produto formulado. Para representar a testemunha, foram utilizadas placas de Petri contendo apenas o patógeno em meio de cultura BDA, sem adição de fungicida. A avaliação do crescimento micelial foi realizada com o auxílio de paquímetro, medindo-se o diâmetro das colônias no momento em que o crescimento do fungo no tratamento testemunha atingiu a borda da placa de Petri. O delineamento foi inteiramente casualizado, com sete repetições e os dados foram ajustados ao modelo log-logístico. Os cálculos foram realizados com o software “R”, pacote “drc”. As misturas picoxistrobina + ciproconazol, azoxistrobina + benzovindiflupir, epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina e carbendazim foram consideradas altamente fungitóxicas ao fungo *Macrophomina phaseolina*. As demais misturas avaliadas apresentaram moderada fungitoxicidade ao patógeno. Mais estudos são necessários para avaliar a eficácia de fungicidas no controle da doença de podridão de carvão na cultura da soja.

**Palavras-chave:** Concentração efetiva; Produtos fitossanitários; Controle; Podridão de carvão; *Glycine max*.

## Mycelial inhibition of *Macrophomina phaseolina* to different fungicides

### ABSTRACT

The charcoal rot or black root rot, caused by *Macrophomina phaseolina* is one of the most common root diseases in soybean, with no recorded chemical control. The objective of this work was to evaluate the fungitoxicity of different fungicides in the control of *M. phaseolina* through "in vitro" mycelial inhibition. The treatments consisted in exposing the pathogen to the following fungicial mixtures: prothioconazole + trifloxystrobin + bixafen, trifloxystrobin + cyproconazole, picoxystrobin + cyproconazole, azoxystrobin + benzovindiflupyr, mancozeb, difenoconazole + cyproconazole, propiconazole + difenoconazole, epoxiconazole + fluxapyroxad + pyraclostrobin and carbendazim. Five concentrations were used: 0.01ppm; 0.1ppm; 1.0ppm; 10.0ppm; 100.0ppm of the formulated product. To represent the control treatment, Petri dishes containing only the pathogen were used in PDA culture medium without addition of fungicide. The evaluation of the mycelial growth was performed with the aid of a pachymeter, measuring the diameter of the colonies the moment the growth of the fungus in the control treatment reached the border of the Petri dish. The experimental design was completely randomized, with seven replicates. The data were adjusted to the log-logistic model. The calculations were performed with software "R", package "drc". The mixtures picoxystrobin + ciproconazole, azoxystrobin + benzovindiflupir, epoxiconazole + fluxapiroxade + pyraclostrobin and carbendazin were considered highly fungitoxic to the fungus *Macrophomina phaseolina*. The other mixtures evaluated presented moderate fungitoxicity to the pathogen. Further studies are needed to evaluate the efficacy of fungicides in the control of charcoal rot disease in soybean.

**Key-words:** Effective concentration; Phytosanitary products; Control; Charcoal rot; *Glycine max*.

## 4.1 INTRODUÇÃO

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. é um fungo residente do solo importante economicamente devido ao amplo número de espécies de plantas que infectam e da dificuldade do seu controle (NASCIMENTO et al., 2014). O fungo pode infectar raízes, caule, folhas e vagens (SINCLAIR; BACKMAN, 1989; ALMEIDA et al., 2001). Conhecida por podridão de carvão ou podridão negra das raízes, é uma das doenças radiculares mais comuns na cultura da soja, sendo sua ocorrência favorecida por condições de estresse hídrico por falta de água e temperaturas elevadas de solo (ALMEIDA et al., 2014).

No Brasil, seu primeiro relato foi atacando raízes de plantas de feijão em Campinas, São Paulo, em 1935 (COELHO NETO, 1994). O patógeno é capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012), fazendo com que o uso da rotação de culturas se torne uma forma inviável de controle.

Assim como para outras doenças, o método mais prático e econômico para se controlar *M. phaseolina* em soja seria através do uso de cultivares resistentes, porém, não há ainda cultivares comerciais resistentes a esse fungo (PARIS et al., 2006; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011; MENGISTU et al., 2013). Os métodos culturais de controle como a rotação de culturas se mostram inviáveis devido à ação polífaga do fungo (SHORT; WYLLIE; BRISTOW, 1980). Contudo, a remoção de restos culturais na área de cultivo pode reduzir o inóculo do patógeno, bem como a rotação com culturas não hospedeiras (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ARAÚJO et al., 2007).

A escolha de regiões de plantio que possuam regimes pluviais precisos ou que tenham seu suprimento de água por irrigação também é uma medida eficaz (ARAÚJO et al., 2007).

Solos compactados podem favorecer a ocorrência da doença por delimitarem o crescimento das raízes da planta, uma vez que, ao não serem capazes de crescer em profundidade no solo, estão mais sujeitas a condições de estresse hídrico, criando um ambiente favorável à doença (ALMEIDA et al., 2014).

No quesito controle químico, o uso de fungicidas para patógenos habitantes do solo pode ser ineficiente e dispendioso (KUMAR et al., 2015). Contudo, se faz necessário avaliar a ação e a eficiência de produtos fitossanitários já

utilizados na cultura da soja para o controle das demais doenças, visto que o patógeno já está exposto a uma gama de produtos.

Ainda não existem fungicidas registrados para o controle desse fungo na cultura da soja (AGROFIT, 2018).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a fungitoxicidade de diferentes fungicidas no controle de *Macrophomina phaseolina*, utilizando o método de inibição do crescimento micelial do fungo.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, em Londrina- PR.

Para a obtenção do isolado de *M. phaseolina*, foram coletadas plantas de soja sintomáticas cultivadas no município de Londrina-PR. Após passar por processo de assepsia, o fungo foi isolado por meio indireto e mantido em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) em câmara de crescimento do tipo BOD, a 28°C no escuro, por sete dias, quando atingiu completo desenvolvimento.

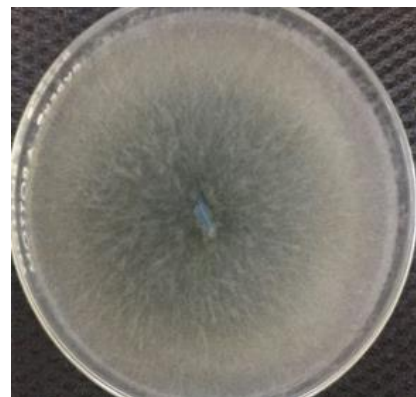


Figura 4.1.  
meio de

Isolamento de *Macrophomina phaseolina* em cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e desenvolvimento completo do patógeno.

Os fungicidas foram utilizados nas seguintes concentrações: 0,01ppm, 0,1ppm, 1ppm, 10ppm e 100ppm a partir do produto formulado (Tabela 4.1). Uma

solução estoque foi feita na concentração de 100ppm para que assim se prosseguisse com as diluições.

Tabela 4.1. Fungicidas avaliados quanto à fungitoxidade no controle "in vitro" de *Macrophomina phaseolina*.

<b>Produto Formulado</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Ingrediente Ativo</b>	<b>Concentração do ingrediente ativo*</b>
Cypress®	Syngenta	Difenoconazol + Ciproconazol	250 + 150g/L
Score Flexi®	Syngenta	Propiconazol + Difenoconazol	250 + 250g/L
Sphere Max®	Bayer	Trifloxistrobina + Ciproconazol	375 + 160g/L
Aproach® Prima	DuPont	Picoxistrobina + Ciproconazol	200 + 80g/L
Fox® Xpro	Bayer	Protioconazol + Trifloxistrobina + Bixafem	175 + 150 + 125g/L
Elatus®	Syngenta	Azoxistrobina + Benzovindiflupir	300 + 150g/kg
Unizeb Gold®	UPL	Mancozebe	750g/kg
Ativum®	Basf	Epoxiconazol + Fluxapiroxade + Piraclostrobrina	50 + 50 + 81g/L
Carbendazim®	Nortox	Carbendazim	500g/L

\*Concentrações encontradas na recomendação das respectivas bulas.

As soluções de fungicidas foram incorporadas ao meio de cultura BDA na temperatura de 50°C, aproximadamente. Para representar a testemunha, foram utilizadas placas de Petri contendo apenas o patógeno e o meio de cultura sem adição de fungicidas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez tratamento e sete repetições, sendo cada placa considerada uma repetição.

A avaliação ocorreu em uma única etapa, no momento em que a testemunha apresentou crescimento completo na placa. Para isso, foi avaliado o crescimento micelial do fungo com o auxílio de um paquímetro, medindo-se o diâmetro das colônias no momento em que o tratamento testemunha atingiu a borda da placa de Petri. A inibição do crescimento micelial foi calculada de acordo com a equação:

$$CI = \frac{DT - DP}{DT} * 100$$

Onde: DT é a média dos diâmetros de cada testemunha e DP é a média dos diâmetros de cada parcela dos tratamentos com fungicidas.

A sensibilidade de um patógeno a um determinado fungicida é medida baseado no CI<sub>50</sub>, ou seja, na concentração do fungicida que inibe 50% da germinação de esporos ou do seu crescimento micelial (REIS; REIS; CARMONA, 2010). O valor obtido pela CI<sub>50</sub> é usado para comparar o poder dos fungicidas no controle de um fungo específico, identificando o mais eficiente. Quanto menor o CI<sub>50</sub>, maior a toxicidade do produto químico (BRENT; HOLLON, 1988).

A concentração efetiva dos fungicidas para inibição de 50% do crescimento micelial do fungo *Macrophomina phaseolina* foi determinada a partir do ajuste dos dados ao modelo log-logístico. O ajuste utilizado foi o log-logístico com três parâmetros e limite inferior igual a zero. A equação é:

$$f(x) = 0 + \frac{d - 0}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

Os cálculos foram realizados através do software “R”, pacote “drc”.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar dos produtos testados não serem recomendados para tratamento de sementes para *Macrophomina phaseolina*, os mesmos são recomendados para o controle de diversas doenças que ocorrem na cultura na soja, dentre elas, a ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*. Dessa forma, o patógeno está sujeito à exposição desses produtos mesmo não sendo o alvo de sua aplicação, sendo necessária a avaliação de sua eficácia no controle da podridão de carvão.

O tratamento testemunha apresentou crescimento micelial completo com 7 dias de incubação no escuro em câmara de crescimento, com temperatura controlada a 28°C. Com isso foram realizadas duas medições perpendiculares do crescimento micelial do patógeno, e obtida a porcentagem de controle (Tabela 4.2).



Tabela 4.2. Porcentagem de controle de *Macrophomina phaseolina* obtida a partir da exposição à diferentes doses de fungicidas a partir do produto formulado.

Ingrediente Ativo (Produto Formulado)	Porcentagem de controle de acordo com a dose do produto formulado (%)				
	0,01ppm	0,1ppm	1ppm	10ppm	100ppm
Protioconazol + Trifloxistrobina + Bixafem (Fox® Xpro)	20,6c	42,9b	66,3b	79,3b	85,7c
Trifloxistrobina + Ciproconazol (Sphere Max®)	31,0a	45,1b	44,9d	62,8d	100a
Picoxistrobina + Ciproconazol (Aproach® Prima)	5,8d	35,6c	52,8c	54,0e	60,6e
Azoxistrobina + Benzovindiflupir (Elatus®)	15,3c	37,3c	51,9c	73,6c	91,6b
Mancozebe (Unizeb Gold®)	0e	0f	8,4f	63,4d	100a
Difenoconazol + Ciproconazol (Cypress®)	6,9d	20,0d	37,2e	62,3e	79,1d
Propiconazol + Difenoconazol (Score Flexi®)	0e	16,0e	42,7d	80,6b	96,2b
Epoxiconazol + Fluxapiroxade + Piraclostrobina (Ativum®)	26,7b	51,4a	73,3a	81,8b	100a
Carbendazim (Carbendazim®)	1,5e	52,2a	75,0a	100a	100a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados obtidos, a combinação de epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina e carbendazim apresentaram a melhor porcentagem de controle, proporcionando aproximadamente 50% de redução do crescimento do patógeno até 0,1ppm do produto formulado. Vale ressaltar que apenas as misturas de trifloxistrobina + ciproconazol, mancozebe, epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina e carbendazim, em alta concentração, foram capazes de inibir 100% do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*.

Não há registro de produto formulado ou molécula química que seja recomendada para doença na soja. Contudo, há o registro de substâncias do grupo dos triazois, fenilpirrois, dimetilditiocarbamatos e carboxanilidas utilizadas no tratamento de sementes na cultura do feijão (AGROFIT, 2018).

O monitoramento da sensibilidade de um fungo a fungicidas é importante para maximizar sua eficiência de controle. O  $CI_{50}$  é específico e constante para um agente químico específico e para um patógeno em particular. A substância é fungicida em baixa concentração, e um valor de  $CI_{50}$  baixo representa alta ação fungicida ou alto poder fungicida (REIS; REIS; FORCELINI, 2007).

Uma substância é considerada fungitóxica quando em baixas concentrações possui ação tóxica aos fungos. Entretanto, tal capacidade não é dada somente devido ao ingrediente ativo, mas também é dependente das características fisiológicas e genéticas de cada fungo. Ademais, a toxidez de um a substância a um determinado fungo pode ser temporária em razão da manifestação de resistência por parte do patógeno em questão (REIS; REIS; CARMONA, 2010). Se um fungicida não exerce nenhuma ação de fungitoxicidade sobre o fungo, ele é considerado insensível (REIS; REIS; FORCELINI, 2007).

De acordo com a classificação de fungitoxicidade proposta por Edgington, Khew e Barron (1971), substâncias altamente fungitóxicas são aquelas que apresentam  $CI_{50}$  menor do que  $1\text{ mg. L}^{-1}$  ou 1ppm, moderadamente fungitóxicas quando apresentam  $CI_{50}$  entre 1 e  $50\text{ mg. L}^{-1}$  (1 e 50ppm) e não tóxicas as substâncias que apresentam  $CI_{50}$  maior do que  $50\text{ mg. L}^{-1}$ .

Dessa forma, conforme os resultados obtidos por este trabalho, as misturas picoxistrobina + ciproconazol, azoxistrobina + benzovindiflupir, epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina e carbendazim foram consideradas altamente fungitóxicas ao fungo *Macrophomina phaseolina*, atingindo a  $CI_{50}$  na concentração de 0,7ppm, 0,89ppm, 0,14ppm e 0,12ppm, respectivamente. Enquanto as demais misturas podem ser classificadas como moderadamente fungitóxicas por apresentarem inibição de 50% do crescimento micelial do patógeno entre as concentrações de 1 e 50ppm (Figuras 4.2 a 4.11).

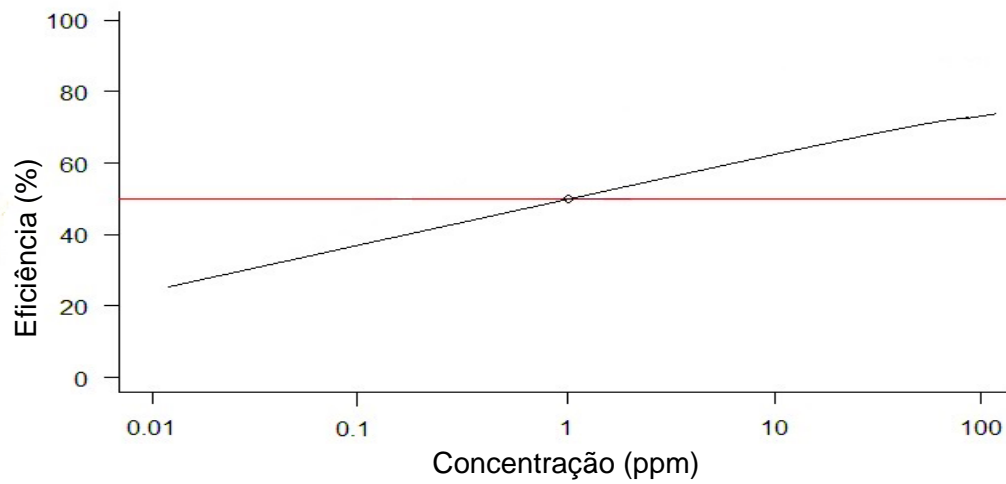


Figura 4.2. Concentração em ppm de Fox® XPRO ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

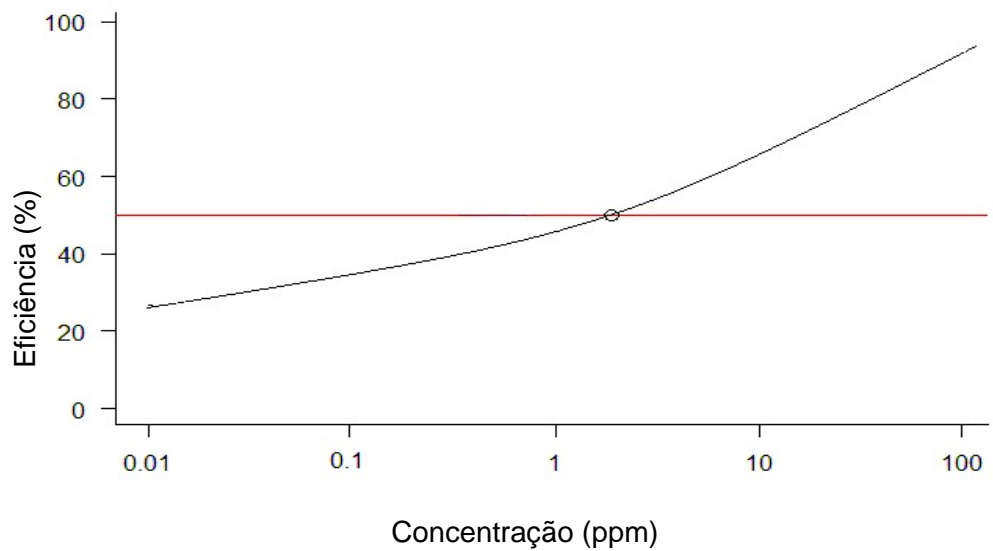


Figura 4.3. Concentração em ppm de Sphere Max® ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

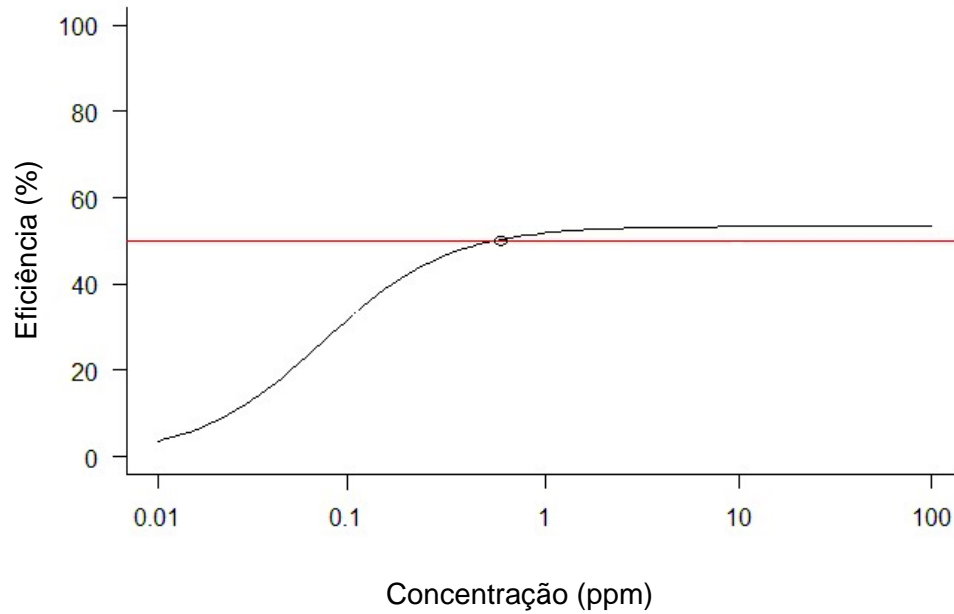


Figura 4.4. Concentração em ppm de Aproach® Prima ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

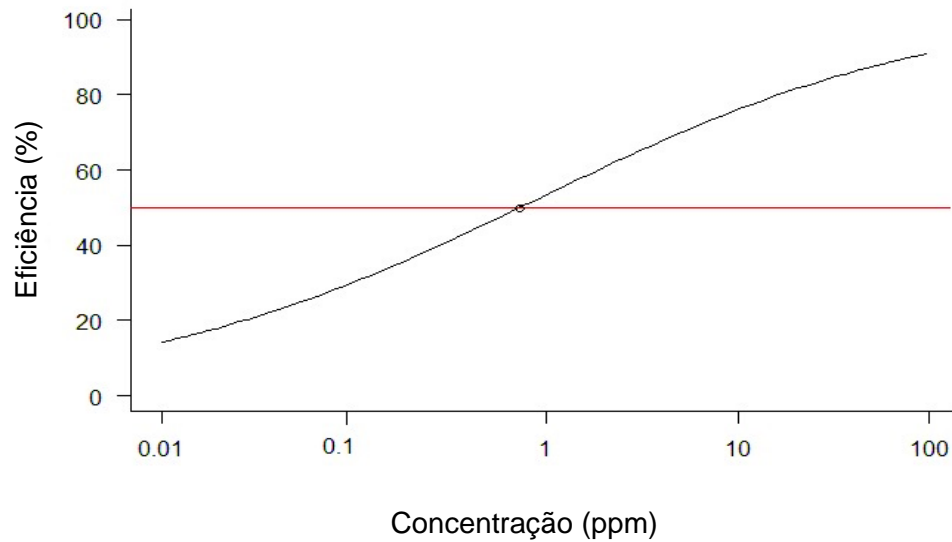


Figura 4.5. Concentração em ppm de Elatus® ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

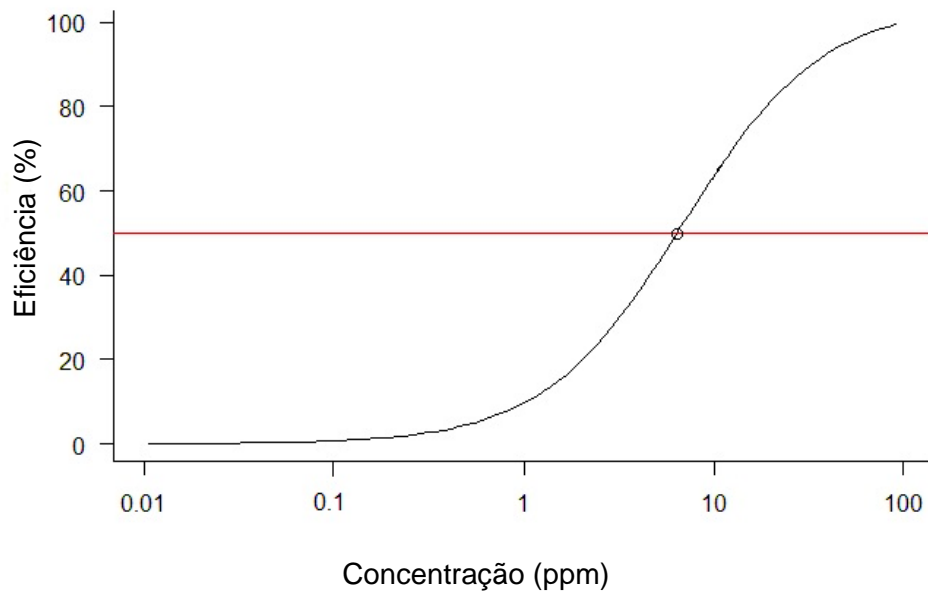


Figura 4.6. Concentração em ppm de Unizeb Gold® ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

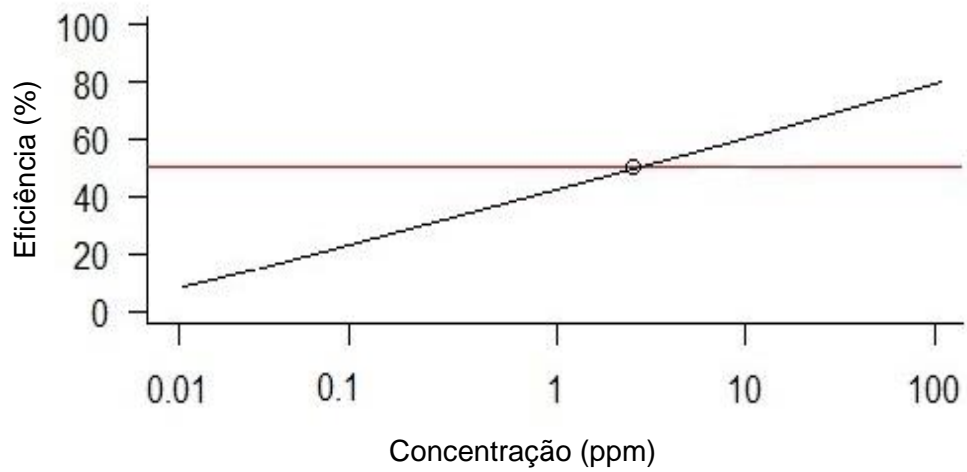


Figura 4.7. Concentração em ppm de Cypress® ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

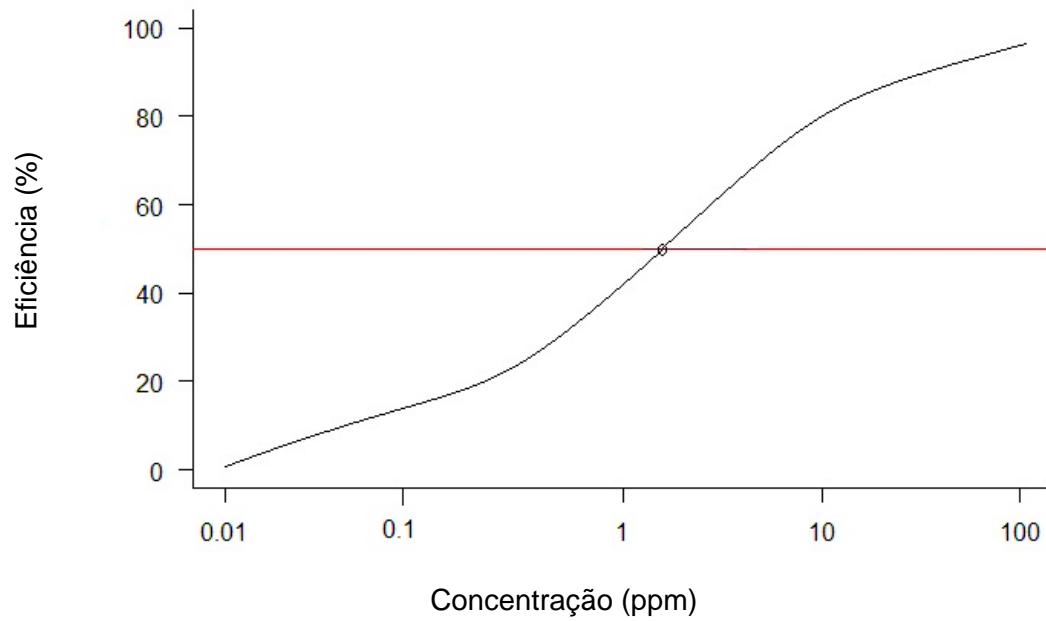


Figura 4.8. Concentração em ppm de Score Flexi® ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

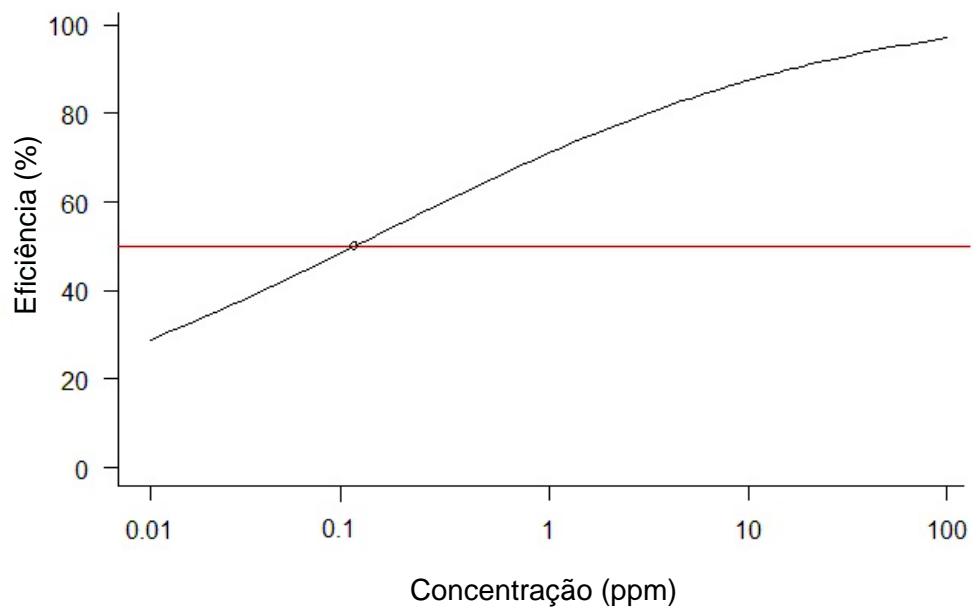


Figura 4.9. Concentração em ppm de Ativum® ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

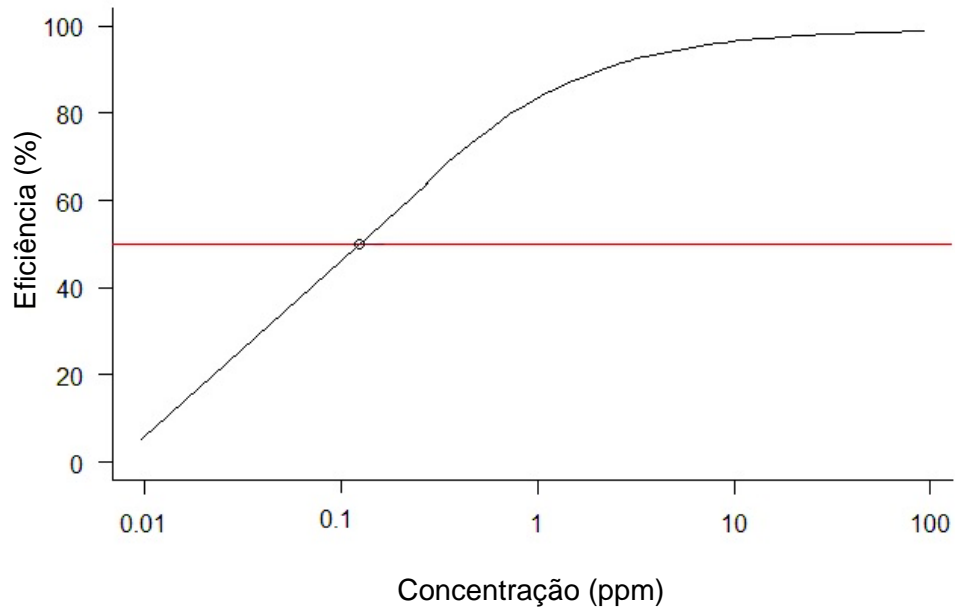


Figura 4.10. Concentração em ppm de Carbenidazim® ao atingir a concentração inibitória de 50% do crescimento micelial “in vitro” de *Macrophomina phaseolina*.

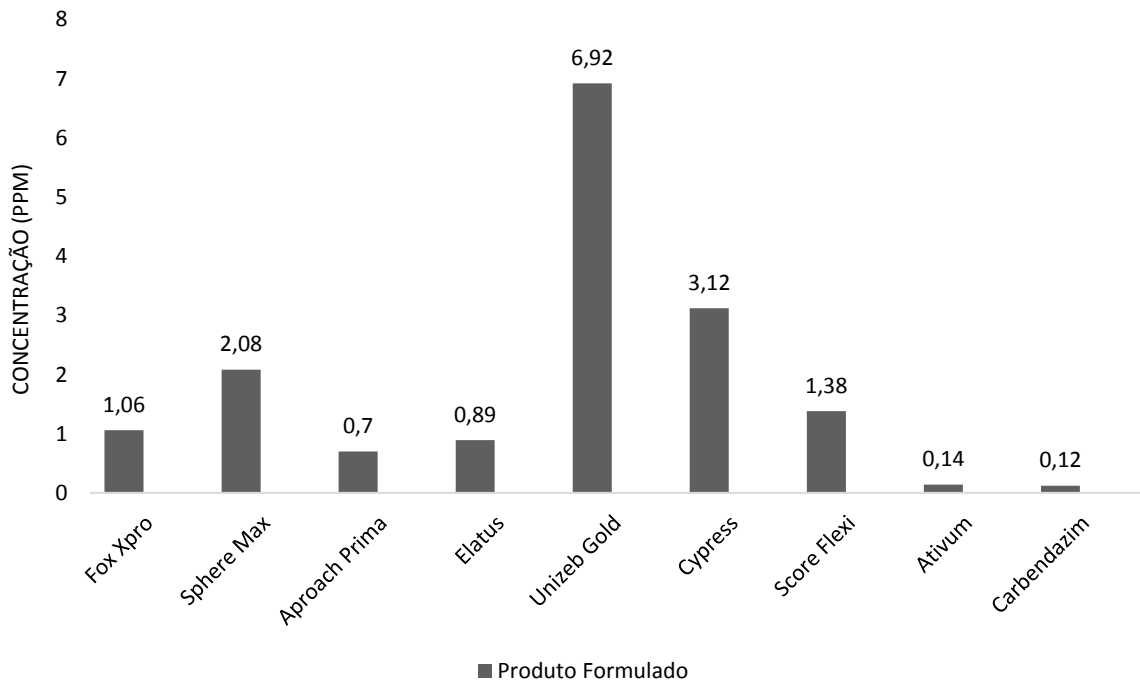


Figura 4.11. Inibição “in vitro” de 50% do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* na presença de diferentes concentrações de fungicidas.

Ao correlacionar as porcentagens de controle dos produtos formulados com a concentração encontrada em suas respectivas bulas, pôde-se analisar qual recomendação atual seria suficiente para controlar a doença causada por *M. phaseolina* na cultura da soja (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Concentração dos produtos formulados em relação à dose e ao volume de calda recomendados pelos fabricantes.

Produto Formulado	Concentração na menor		Concentração na maior		Concentração necessária encontrada <sup>4</sup>
	dose recomendada <sup>1</sup>		dose recomendada		
	(ppm)		(ppm)		
	<VC <sup>2</sup>	>VC <sup>3</sup>	<VC	>VC	
FOX <sup>®</sup> Xpro	5714	2667	7142	3333	1,06
Sphere Max <sup>®</sup>	750		1000		2,08
Aproach <sup>®</sup> Prima	3000	1500			0,7
Elatus <sup>®</sup>	750		1500		0,89
Unizeb Gold <sup>®</sup>	7500	5000	1500	1000	6,92
Cypress <sup>®</sup>	1000		1500		3,12
Score Flexi <sup>®</sup>	1000	500			1,38
Ativum <sup>®</sup>	8000	4000	10000	5000	0,14
Carbendazim <sup>®</sup>	5000	2500			0,12

<sup>1</sup> Concentração de dose recomendada a partir da bula do produto formulado.

<sup>2</sup> <VC: menor volume de calda indicado na bula do produto formulado.

<sup>3</sup> >VC: maior volume de calda indicado na bula do produto formulado.

<sup>4</sup> Agindo diretamente sobre o alvo.

A tabela 4.3 traz uma estimativa da concentração dos produtos formulados aplicadas em campo de acordo com o recomendado pela bula, relacionando maior e menor dose recomendada nos maiores e menores volumes de calda.

O que se observa é que a concentração de uma aplicação baseada na recomendação do produto é muitas vezes maior que o necessário para controlar a doença segundo os dados de concentração encontrados por este trabalho. Contudo, vários são os fatores que podem influenciar a chegada do produto até o alvo.



Considerando que o presente trabalho resultou em novas possibilidades de produtos químicos para controle de *M. phaseolina*, há a necessidade de se definir a melhor estratégia de aplicação.

Estudos realizados por Román et al. (2009), Nascimento et al. (2013) e Zôrzo (2015) ao analisarem os fatores que influenciam a aplicação de fungicidas via pulverização terrestre, descreveram porcentagens de cobertura vegetal de 8, 17 e 2%, respectivamente. Dessa forma, o que se aplica no campo, de acordo com a recomendação do produto formulado, não é o que chega até o alvo.

Cunha, Juliatti e Reis (2014) afirmam que a uniformidade de distribuição de um volume calda é baixa quando avaliada ao longo do dossel da planta de soja e que se faz necessária a busca por estratégias que visem a otimização da deposição de fungicidas. É preciso buscar estratégias que incrementem a deposição, principalmente na parte inferior da cultura.

Villalba et al. (2009), estudando a deposição em cultivares de soja no estágio R1 para controle da ferrugem asiática da soja, encontraram depósitos na região apical quase três vezes superiores aos da região basal.

De acordo com tais relatos, e pelo fato de *M. phaseolina* se tratar de um fungo de solo com estruturas de resistência, cujos sintomas se manifestam primariamente em raízes e no colo da planta, a quantidade de fungicida que chega até as partes mais baixas da planta não é o suficiente para expressar controle.

Dessa forma, o tratamento de sementes é supostamente o método mais eficiente para controlar este patógeno no campo. O mesmo é relatado por Coutinho et al. (2012) com a ocorrência de *M. phaseolina* em mamoneira, onde descreve que o tratamento químico das sementes protegeria a planta nos estágios iniciais de seu desenvolvimento.

Com os resultados obtidos, há a possibilidade de se empregar os produtos testados no tratamento de sementes de soja para avaliação de eficiência de controle.

Nos estudos de Navi, Rajasab e Yang (2016), ao avaliarem fungicidas comerciais no controle de diversos patógenos residentes no solo que atacam a cultura da soja, a molécula fungicida picoxistrobina foi utilizada como possível agente de controle a *M. phaseolina*, contudo sem sucesso. No presente estudo, picoxistrobina esteve presente na mistura com ciproconazol, atingindo porém, resposta satisfatória ao se obter a concentração de 0,7ppm para inibir 50% do

crescimento micelial do patógeno, sendo então classificada como altamente fungitóxica.

Segundo Panizzi (1988), o fungicida mais eficiente é o benomyl, que possui a capacidade de controlar *M. phaseolina* tanto externa como internamente nas sementes. Benomyl é um composto do grupo dos benzimidazois, do qual também pertence o carbendazim (BRAGA et al., 2003).

Nos estudos in vitro de Tonin et al. (2013), o uso de carbendazim na concentração de 0,23ppm foi suficiente para inibir 50% do crescimento micelial de *M. phaseolina*, se apresentando como uma alternativa viável no controle de doenças radiculares. O presente trabalho traz como resultado para o carbendazim a concentração de 0,12ppm, sendo então condizente com o encontrado pelos autores acima citados.

Poucos estudos relatam a sensibilidade desse fungo a fungicidas.

#### 4.4 CONCLUSÕES

As misturas picoxistrobina + ciproconazol, azoxistrobina + benzovindiflupir, epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina e carbendazim foram consideradas altamente fungitóxicas ao fungo *Macrophomina phaseolina*.

As demais misturas avaliadas apresentaram moderada fungitoxicidade ao patógeno.

Mais estudos são necessários para avaliar a eficácia de fungicidas no controle da doença de podridão de carvão na cultura da soja.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as doenças radiculares que atacam a cultura da soja, a podridão de carvão causada por *Macrophomina phaseolina* merece destaque devido à sua ampla gama de hospedeiros, sobrevivência no solo e dificuldade de controle. O fungo ainda possui diversos aspectos a serem esclarecidos e estudados. Por ser polífago e habitante de solo dificulta a reprodução exata de ensaios científicos, bem como a definição de um método de controle eficiente.

A presente pesquisa aponta que para estudos em casa de vegetação os métodos de inoculação que envolvam a infestação do solo são os mais eficazes na reprodutibilidade de sintomas. Informações atualizadas e precisas auxiliam na definição de estratégias de controle ou mesmo redução do inóculo na área de cultivo, além de serem ferramentas essenciais em testes de seleção de genótipos para resistência genética ao patógeno.

São poucas as culturas que contam com o registro de produtos químicos para o controle da podridão de carvão, se fazendo necessário futuras avaliações de sensibilidade às moléculas fungicidas encontradas no cenário agrícola.

Para a cultura da soja em si, a avaliação dos fungicidas recomendados e aplicados no controle de outras doenças, como por exemplo da ferrugem asiática da soja, há a possibilidade de controle devido à exposição do patógeno à essas moléculas. Dito isto, o estudo realizado demonstra que os princípios ativos em misturas ou isolados picoxistrobina + ciproconazol, azoxistrobina + benzovindiflupir, epoxiconazol + fluxapirroxade + piraclostrobin e carbendazim são classificados como altamente tóxicos ao patógeno, o que traz viabilidade num possível manejo químico para *M. phaseolina* na cultura.

Poucos trabalhos relatam a sensibilidade desse fungo aos fungicidas, portanto, mais estudos ainda são necessários.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Roots rots bean in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies.** Bogotá: Centro de Agricultura Tropical, 1990. 114p.
- AIRES, S. S. B; DEL PELOSO, M. J.; CARDOSO, J. E. Avaliação de genótipos de feijão a dezenove isolados de *Macrophomina phaseolina* em condições de casa de vegetação. In: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Arroz e Feijão. **Relatório técnico 1990/992.** Goiânia, 1994. P.150-151.
- ALMEIDA, A. M.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** São Paulo: Ceres, 2016. v. 5, p. 642-664.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. **Macrophomina phaseolina em soja: sistemas de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética.** Londrina: Embrapa Soja, 2001.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. **Macrophomina phaseolina em soja.** Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n.346). Londrina: Embrapa Soja, 2014.
- ANDRUS, C. F. Seed transmission of *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, v. 28, p. 620-643, 1938.
- ARAÚJO, A. E. de.; SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Doenças e seu Manejo. In: AZEVEDO, D. M. P. de.; BELTRÃO, E. de M. (Ed). **O Agronegócio da Mamona no Brasil.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, 2 ed. rev. e ampl. 2007. p.283-301.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. **Patossistema caupi x Macrophomina phaseolina: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno.** 2004. 147p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- BAIRD, R. E., C. WATSON, and M. SCRUGGS. 2003. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. **Plant Dis.** 87:563-566.
- BANCO DE INFORMAÇÕES SOBRE OS PRODUTOS AGROTÓXICOS (Agrofit). **Sistema de agrotóxicos e fitossanitários.** Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acesso em: 01 fev. 2018.
- BELLAVER, C.; SNIZER, J. P. N. **Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding.** Anais do Congresso Brasileiro de Soja. p.183-199, 1999.
- BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M.A.; MATZENAUER, R.; FONTANA, D.C.; CUNHA, G.R.; SANTOS, M.L.V.; FARIAS, J.R.B.; BARNI, N.A. **Agrometeorologia aplicada à irrigação.** 2.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999. 125 p.

BETTIOL, W. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Wagner Bettiol... [et. al.]. – Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p. — (Documentos/Embrapa Meio Ambiente; 88). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/66628/1/Doc-88-1.pdf>> Acesso em: 25 ago. 2016.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. In: BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. **Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo**. Jaguariúna. Embrapa Meio-Ambiente, 2009. v.1, cap.12, p. 187-208.

BITANCOURT, A.A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, v. 1, n. 2, p. 41, fev, 1935.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. AM. (Ed). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. V1. p.375-399.

BLANCO-LOPÉZ, M. A.; JIMENES-DIAZ, M. A. Effect of irrigation on susceptibility of sunflower to *Macrophomina phaseoli*. **Plant Disease**, Saint-Paul, v. 67, n. 11, p. 1214- 1216, 1983.

BRAGA, N. A.; GOMES PESSOA, M. N.; TEÓFILO, E. M. Tratamento químico e biológico de sementes de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., visando o controle de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, n. 2, p. 193-199, 2003.

BRENT, K. J.; HOLLOWAY, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. Brussels: 1988. (FRAC Monograph, 2).

BRUEHL, G. W. **Soilborne Plant Pathogens**. New York. MacMillan. 1987. 368p.

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.

COELHO NETO, R. A. **Metodologia e avaliação da resistência de feijoeiro à podridão cinzenta do caule, em laboratório e casa-de-vegetação**. 1994. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

COELHO, M. E. H.; FREITAS, F. C. L.; CUNHA, J. L. X. L.; SILVA, K. S.; GRANGEIRO, L. C.; OLIVEIRA, J. B. Coberturas do solo sobre a amplitude térmica e a produtividade de pimentão. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 369-378, 2013a.

COELHO, M. E. H. FREITAS, F. C. L.; CUNHA, J. L. X. L.; MEDEIROS, J. F.; SILVA, M. G. O. Production and efficiency of water usage in capsicum crops under no-tillage and conventional planting systems. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 4, p. 741-749, 2013b.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento): **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. v.5 Safra 2017/2018 – Quinto levantamento. Brasília, p. 1-140, Fevereiro, 2018.

COREL TEAM. **The R Foundation for Statistical Computing**. R version 3.2.5 (2016-04-14), 2017.

CORREA, B. O.; MOURA, A. B.; DENARDIN, N. D.; SOARES, V. N.; SCHÄFER, J. T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum Lindemuthianum* (Saac e Magn). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 156-163, 2008

COTA, L.V.; COSTA, R.V. da; GUIMARÃES, P.E.; GUIMARÃES, L.J.M.; PARENTONI, S.N.; PACHECO, C.A.P.; SILVA, D.D.da; PARREIRA, D. F. **Métodos de inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 137).

COUTINHO, W. M.; ALMEIDA, R. P.; DANTAS, F. V.; SOARES, D. J.; ARAÚJO, A. E. de.; MILANI, M. **Eficácia de misturas de fungicidas químicos na micobiota e na qualidade fisiológica de sementes de mamoneira**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2012. 22p. (EMBRAPA, CNPA. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 91).

CUNHA, J. L. X. L. **Sistemas de plantio no manejo de plantas daninhas e na comunidade microbiana do solo na cultura do pimentão**. 2012. 106 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró.

CUNHA, J. P. A. R.; JULIATTI, F. C. REIS, E. F. TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO DE FUNGICIDA NO CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA: RESULTADOS DE OITO ANOS DE ESTUDOS EM MINAS GERAIS E GOIÁS. **Biosci. J.**, Uberlandia, v. 30, n. 4, p. 950-957, July/Aug. 2014.

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.

DE, D. K.; KAISER, S. A. K. M. Genetic analysis of resistance to stem rot pathogen (*Macrophomina phaseolina*) infecting jute. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26. p.1017-1022, 1991.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa; 1978.

DHINGRA, O. D. **Teoria da transmissão de patógenos fungicos por sementes**. In.: Zambolim, L. Sementes: Qualidade fitossanitária. Viçosa, p. 75-104, 2005.

DOLEY, K.; JITE, P. K. *In vitro* Efficacy of *Trichoderma viride* Against *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 4, n. 4, p. 39-44, 2012.

DUKE, S. O. et al. Interactions of synthetic herbicides with plant disease and microbial herbicides. In: VURRO M.; GRESSEL, J. (Ed.). **Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management**. London: Springer, 2007. p. 277-296.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARROW, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

EDMUNDS, L. K.; VOIGT, R. L.; CARASSO, F. M. Use of Arizona climate to induce charcoal rot in grain sorghum. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 48, p. 300-302, 1964.

EDMUNDS, L. K. Combined relation of plant maturity, temperature and soil moisture to charcoal stalk-rot development in grain sorghum. **Phytopathology**, v. 54, n. 5, p. 514-517, 1964.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja: Região Central do Brasil**. (Embrapa Soja, Sistemas de Produção nº 1). Londrina, 2004.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de Produção de Soja** - Região Central do Brasil 2014. Londrina/PR. Sistema de Produção 16, 2013. 265p

FARIAS, J. R. B. Apresentação. In: LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro**. Embrapa Soja Londrina, (Documentos 319), 47p. 2010.

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).

GHAFFAR, A.; ERWIN, D. C. Effect of soil water stress on root rot of cotton caused by *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 59, p. 795-797, 1969.

GAJERA, H. P.; BAMBHAROLIA, R. P.; PATEL, S. V.; KHATRANI, T. J.; GOALKIYA, B. A. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: Evaluation of Coiling and Cell Wall Degrading Enzymatic Activities. **Journal Plant Pathology Microbiology**, v. 3, n. 7 p. 149, 2012.

GALLI, J. A.; PANIZZI, C. de.; VIEIRA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 163-165, 2007.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.

GOMES, D. P.; SILVA, G. C.; KRONKA, A. Z.; TORRES, S. B.; SOUZA, J. R. **Qualidade fisiológica e incidência de fungos em sementes de feijão-caupi produzidas do Estado do Ceará**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Revista Caatinga, vol. 21, n. 2, p. 165-171, 2008.

GOMES, C. J. A. ***Macrophomina phaseolina* em soja, padrão de ocorrência, danos e aspectos físicos, químicos e biológicos do solo relacionados à doença**. 2014. 39f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes.

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.

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. *Soybean diseases*. In: **Compendium of soybean diseases**. 4.ed. HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. p.3-4, 1999.

HASNA, M. K.; MARTENSSON, A.; PERSSON, P.; RÄMERT, B. Use of compost to manage corky root disease in organic tomato production. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 151, n. 3, p. 381-390, 2007.

HENNING, A. A. Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill). **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.19, n.3, p.9-12, 2009.



HILLOCKS, R. J.; WALLER, J. M. Soilborne diseases and their importance in tropical agriculture. In: Hillocks, R.J.; Waller, J.M. (Eds.) Soilborne diseases of tropical crops. Wallingford: **CAB International**, p. 3-16, 1997.

HSI, C. H. An effective technique for screening sorghum for diseases resistance to Charcoal rot. **Phytopathology**, v. 51, n. 5, p. 340-341, 1961.

ISLAM. S.; HAQUE, S.; ISLAM M. M.; EMDAD, E. M.; HALIM, A.; HOSSEN, Q. M.; HOSSAIN, Z.; AHMED, B.; RAHIM, S.; RAHMAN, S.; ALAM, M.; HOU, S.; WAN, X.; SAITO, J. A.; ALAM, M.; Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, v.13, p.493-509, 2012

JOHAL, G. S., HUBER, D. M., 2009. Glyphosate effects on diseases of plants. **Eur. J. Agron.**31, 144e152.

JONES, H. G.; Plants and Microclimate. A quantitative Approach to Environmental plant physiology, Ed. 2. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1992.

JUNGES, E.; MUNIZ, M. F. B.; BASTOS, B. O.; ORUOSKI, P. Biopriming in bean seeds. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Section B – Soil & Plant Science, Copenhagen v. 66, p. 207-214, 2015.

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 Microbiology**, v.38, p.136-151, 2012.

KAVITHA, T. R. **Morphological and genetic variability and host resistance response of sorghum recombinant inbred lines (riIs) to a virulent isolate of *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid.** 2007. 62p. Thesis (Master of Science – Plant Pathology) - University of Agricultural Sciences, Dharwad, 2007.

KENDIG, S. R.; RUPE, J. C.; SCOTT, H. D. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. **Plant Disease**, v. 84, p. 895-900, 2000.

KHAN, S. N. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. **Mycopathology**, Nova York, v. 5, n. 2, p. 111-118, 2007.

KIMATI, Y.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, Y. AMORIM, L. (Ed). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Ceres, 2005. V1. P.692-709.

KUMAR, K.; AMARESAN, N.; BHAGA, S.; MADHUR, K.; SRIVASTAVA, R. C. Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 137-144, 2012.

KUNWAR, I. K; SINGH, T.; MACHADO, C. C.; SINCLAIR, J. B. 1986. Histopathology of soybean seed and seedling infection by *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology** 76:532–535.

ITO, L. A.; BRAZ, L. T.; CAMARO, M. Comparação entre métodos de inoculação de *Didymella bryoniae* para seleção de porta-enxertos de melão rendilhado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, 2009.

IVANCOVICH, A.; FLORES, C.; LAVILLA, M. **Podredumbre carbonosa de la soja, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., um fungo oportunista muy dependiente del estrés hídrico y térmico.** Argentina. Mayo, 2016.

LARSON, R. L. Influence of glyphosate on *Rhizoctonia* and *Fusarium* root rot in sugar beet. **Pest Manag. Sci.**, v. 62, n. 12, p. 1182-1192, 2006.

LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja, p. 46, (Embrapa Soja. Documentos, 319), 2010.

LEITE JÚNIOR, R. P. et al. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* em feijão no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, 169 p. 303-304, 2001.

LINHARES C. M. S., FREITAS F. C. L., AMBRÓSIO M. M. Q., CRUZ, B. L. S., DANTAS, A. M. M. Efeito de coberturas do solo sobre a sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* no feijão-caupi. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.2, p.155-159, 2016.

LOPES, E. B. M; KIMATI, H. Efeito da concentração de inóculo de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. na reação de cinco genótipos de girassol (*Helianthus annuus*). **Summa Phytopathologica**, v.14, p.196-200, 1988a.

LOPES, E. B. M; KIMATI, H. Avaliação da reação de girassol (*Helianthus annuus*) a *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. no estágio adulto em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, v.14, p.201-209, 1988b.

MACHADO, C. C.; KIMATI, H. Effect of light on pycnidia formation by *Macrophomina phaseolina* in culture media. **Summa Phytopathologica**, v. 1, p. 65-66, 1975.

MAHMOUDI, S. B.; GHASHGHAIE, S. Reaction of sugar beet S1 lines and cultivars to different isolates of *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* AG-2-2IIIB. **Euphytica**, Holanda, v. 175, n. 11, p. 10-16, 2012.

MAPA. **Soja.** Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> Acesso em: 13 jul. 2016.

MAIA, G. L.; SILVA, J. C.; MEYER, M. C. **Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* isolates from soybean.** VII World Soybean Research Conference Documentos 228, EMBRAPA, Brazil, 2004. 83p.

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

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.

MEDEIROS, A. C. **Reação de acessos de meloeiro a *Macrophomina phaseolina* utilizando diferentes métodos de inoculação.** 2013. 47p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

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

MENEZES, M; MACHADO, A. L. M; SILVEIRA, M. C. V.; SILVA, R. L. X. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. **Anais...** Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, v.1, p.133-140, 2004.

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**, Madison, v. 47, n.6, p. 2453-2461, 2007.

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.; 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.

MERILES, J. M., VARGAS GIL, S., HARO, R. J., MARCH, G. J., GUZMÁN, C. A., 2006. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut ecorne soybean rotations. **J. Phytopathol.** 154, 309e316.

MEYER, W. A.; SINCLAIR, J. B.; KHARE, M. N. Factors affecting Charcoal rot of soybean seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p. 845-849, 1974.

MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A. M.; ANDRADE, D. E. G. T. **Manejo integrado de doenças radiculares**. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.) Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 2005. p. 367-388.

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.

MUELLER, D. S.; DORRANCE, A. E.; DERKSEN, R.; OZKAN, E.; GRAU, C. R.; GASKA, J. M.; KURLE, J. E.; HARTMAN, G. L.; BRADLEY, C. A.; PEDERSEN, W. L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential control of Sclerotinia stem rot on soybean. **Plant Disease**, v.86, p.26-31, 2002

NASCIMENTO, J. M.; GAVASSONI, W. L.; SOUZA, C. M. A.; BACCHI, L. M. A.; SERRA, A. P.; ZACCARON, M. L. Pontas de pulverização e horários de aplicação no controle químico de ferrugem asiática da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2037-2048, 2013.

NASCIMENTO, S. R. C.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SILVA, F. H. A.; GUIMARÃES, L. M. S. Meios de cultura semi-seletivos para *Macrophomina phaseolina*. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.4, p.334-337, 2014.

NDIAYE, M. **Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel**. 2007. 114f. PhD Thesis Wageningen University, the Netherlands, 2007.

NAVI, S. S., RAJASAB, A. H.; YANG X. B. (2016). Invitro evaluation of commercial fungicides against some of the major soil borne pathogens of soybean. **Journal of Plant Pathology and Microbiology** 7(3): (<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000340>).

OLIVEIRA, V. A.; MARTINS, L. P.; GONÇALVES, R. C.; BENÍCIO, L. P. F.; COSTA, D. L.; LUDWIG, J. Use of seed treatment with fungicide in control of *Colletotrichum truncatum* and physiological quality of soybean seeds *Glycine max*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n.2, p. 98-106, 2013.

PANIZZI, R. C. **Cultivares resistentes e tratamento químico de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Piracicaba. 1988. 151. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

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.

PAPAVIZAS, G. C. Some factors affecting survival of sclerotia of *Macrophomina* in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.9, p.337-341, 1977.

PEARSON, C. A. S. et al. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, n. 12, p. 1086-1088, 1984.

PEARSON, C. A.; LESLIE, S.; SCWENK, F. W. Host preference correlated with chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 71, n. 9, p. 828-831, 1987.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3ed. São Paulo: Ceres, 1997. V.2, p.233-244.

PIRES, L. L.; BESERRA JUNIOR, J. E. A. **Patogenicidade de *Macrophomina phaseolina* em feijão-fava**. Universidade Federal do Piauí. Departamento de fitotecnia. 4 p. Disponível em: [http://sis.ufpi.br/25sic/documentos/resumos/modalidade/exatas/Lorena\\_Leal\\_Pires.pdf](http://sis.ufpi.br/25sic/documentos/resumos/modalidade/exatas/Lorena_Leal_Pires.pdf). Acesso em: 14 de agosto de 2017.

PRYOR, B. M.; DAVIS, R. M.; GILBERTSON, R. L. A. Toothpick Inoculation Method for Evaluating Carrot Cultivars for Resistance to *Alternaria radicina*. **HortScience**, Alexandria. v. 35, n. 6, p. 1099-1102, 2000.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; FORCELINI, A. C. **Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. 5. ed., rev. e ampl. Universidade de Passo Fundo: Passo Fundo, 2007.

REIS, E. M.; BOARETTO, C.; DANELLI, A. L. D. *Macrophomina phaseolina*: density and longevity of microsclerotia in soybean root tissues and free on the soil, and competitive saprophytic ability. **Summa Phytopathologica** v.40:128-133, 2014.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. Fungitoxidade e sensibilidade. in: **Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. 6.ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2010, p. 26-29.

RESENDE, F. V.; SOUZA, L. S.; OLIVEIRA, P. S. R.; GUALBERTO, R. Uso de cobertura morta vegetal no controle da umidade e temperatura do solo, na incidência de plantas invasoras e na produção da cenoura em cultivo de verão. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, n.1, p.100-105, 2005.

RODRIGUES, V. J. L. B.; MENEZES, M.; COELHO, R. S. B.; MIRANDA, P. Identificação de fontes de resistência em genótipos de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walpers.) a *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid., em condições de casa-devegetação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 170-172, 1997.

ROMÁN, R. A. A.; CORTEZ, J. W.; FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, J. R. G. Cobertura da cultura da soja pela calda fungicida em função de pontas de pulverização e volumes de aplicação. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.3, p.223-232, May/June 2009.

ROSENOW, D. T. 1978. Stalk rot resistance breeding in Texas. In **Sorghum Diseases: A World Review**. Eds. R. J. WILLIAMS; R. A. FREDERIKSEN; L. K. MUGHOGHO. P 306-314. Intern. Crops Research Inst. for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India.

SALARI, M.; PANJEHKEH, N.; NASIRPOO R, Z.; ABKHOO, J. Reaction of melon (*Cucumis melo* L.) cultivars to soil-borne plant pathogenic fungi in Iran. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi: Academic Journals, v.11, n.87, p.15324-15329, 2012.

SANOGO, S. et al. Effects on *Fusarium solani* f. sp. *Glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate tolerant soybean. **Phytopathology**, v. 90, n. 1, p. 57-66, 2000.

SANTOS, A. F.; ATHAYDE, J. T.; DAN, E. L. Microflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 379, 1984.

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

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

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean diseases**. 3 ed. Saint Paul: The American Phytopathology Society, 1989. 106p.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. (2010) Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Sci** 50:2199–2223.

SIVIERO, E. L. A.; FURTUNADO, L. P. B.; BARBASSO, D. V.; MACHADO, M. A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citrus. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.27, n.6, p.574-580, nov-dez. 2002.

SMART, R. E.; BINGHAM, G. E.; Rapid Estimates of Relative Water Content. **Plant Physiol.** Vol. 53, 258-260, 1974.

SMITH, G. S.; WYLLIE, T. D. Charcoal rot. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 4.ed. **American Phytopathological Society**: St. Paul, MN. 1999. p. 29-31.

SOUZA, P. E.; DUTRA, M. R. **Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas**. Lavras: Editora UFLA, 2003. 174p.

SOUZA, N. S. **Macrophomina phaseolina, Fusarium falciforme e representantes do complexo Colletotrichum gloeosporioides: novos agentes etiológicos em feijão-fava**. Dissertação (mestrado) Programa de pós graduação em agronomia, produção vegetal. Universidade Estadual do Piauí. Terezina. 2016.

THAKKAR, A.; SARAF, M. Development of microbial consortia as a biocontrol agents for effective management of fungal disease in *Glycine max* L. **Archives of Phytopathology and Protection**, v. 48, n. 6, p. 459- 474, 2015.

TEÓFILO, T. M. S.; FREITAS, F. C. L.; MEDEIROS, J. F.; FERNANDES, D.; GRANGEIRO, L. C.; TOMAZ, H. V. Q.; RODRIGUES, A. P. M. S. Eficiência da Água e Interferência de Plantas daninhas no meloeiro cultivado nos Sistemas de Plantio Direto e convencional. **Planta daninha**, Viçosa, v 30, n.3, p.547-556, 2012.

TOLÊDO-SOUZA, E. D.; COSTA, E. J. L. S. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 2, n. 33, p. 57-63, 2003.

TONIN, R. F. B.; AVOZANI, A.; DANELLI, A. L. D.; REIS, E. M.; ZOLDAN, S. M.; GARCÉS-FIALHOS, F. R. Invitro mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 460-466, Oct./Dec. 2013.

TWIZEYIMANA, M.; HILL, C. B.; PAWLOWSKI, M.; PAUL, C.; HARTMAN, G. L. (2012). A cut-stem inoculation technique to evaluate soybean for resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Dis** 96:1210–1215.

VILLALBA, J. F.; DAGOBERTO, M.; COSTA, N. V.; DOMINGOS, V. D. Deposição da calda de pulverização em cultivares de soja no estádio R1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1738-1744, 2009.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

WHEELER, T.; RUSH, C. M.; MALOY, O. C.; MURRAY, T. D. (Eds.), **Soil borne diseases**. Encyclopedia of Plant Pathology, vol. 2, New York (2001), p. 935–947.

WRATHER, J. A.; ANDERSON, T. R.; ARSYAD, D. M.; GAI, J.; PLOPER, D. L.; PORTA-PUGLIA, A.; RAM, H. H.; YORINORI, J. T. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 107-110, 1997.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. Estimates of diseases effects on soybean yields in the United States 2003-2005. **Journal of Nematology**, v. 38, p. 173-180, 2006.

WRATHER, J. A.; SHANNON, J. G.; CARTER, T. E., BOND, J. P.; RUPE, J. C.; ALMEIDA, A. M. R. Reaction of drought-tolerant soybean genotypes to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Management Network**, 18 jun. 2008.

ZAMBOLIM, L. et al. Feijão comum: podridão, tombamento, e murcha causados por fungos de solo. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV. Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. V2. P.375-204.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F. X. R. **Nutrição mineral e patógenos radiculares** in: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.) *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 2005. p. 367-388.

ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitopatologia, 2005. 502 p.

ZÔRZO, F. **Volumes de calda para aplicação de fungicida na soja**. (Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Agronomia) Universidade Federal da Fronteira Sul. Cerro Largo, 2015.