

Macrophomina phaseolina em soja



CGPE 11310

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 346

Macrophomina phaseolina em soja

*Álvaro Manuel Rodrigues Almeida
Claudine Dinali Santos Seixas
José Renato Bouças Farias
Maria Cristina Neves de Oliveira
Julio Cezar Franchini
Henrique Debiasi
Joaquim Mariano da Costa
Celso de Almeida Gaudêncio
Autores*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta
Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000
Fax: (43) 3371 6100
www.embrapa.br/soja
cnpso.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

Presidente: *Ricardo Vilela Abdelnoor*
Secretário-Executivo: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*
Membros: *Adeney de Freitas Bueno, Adônis Moreira, Alvadi Antonio Balbinot Junior, Claudio Guilherme Portela de Carvalho, Fernando Augusto Henning, Eliseu Binneck, Liliane Márcia Mertz Henning e Norman Neumaier.*

Supervisão editorial: *Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol*
Normalização bibliográfica: *Ademir Benedito Alves de Lima*
Editoração eletrônica e capa: *Thais Cavalari Rosa*
Fotos da capa: *Álvaro Manuel Rodrigues Almeida*

1ª edição

Versão *on line*.

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Soja

Macrophomina phaseolina em soja / Alvaro Manuel Rodrigues Almeida...
[et al.] – Londrina: Embrapa Soja, 2014.
55 p. : il. color. ; 15cm x 20cm– (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n.346)

1.Soja-Doença-Fungo. 2.Doença de planta. 3.Macrophomina phaseolina. 4.Fungo.
I.Seixas, Claudine Dinali Santos. II.Farias, José Renato Bouças. III.Oliveira, Maria Cristina Neves de. IV.Franchini, Julio Cezar. V.Debiasi, Henrique. VI.Costa, Joaquim Mariano da.
VII.Gaudêncio, C. de A. VIII.Título. IX.Série.

CDD: 633.34946 (21.ed.)

© Embrapa 2014

Autores

Álvaro Manuel Rodrigues Almeida

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia,
Pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR
alvaro.almeida@embrapa.br

Celso de Almeida Gaudêncio

Engenheiro Agrônomo, M. Sc. em Fitotecnia,
Pesquisador aposentado da Embrapa Soja,
Londrina, PR
celso.gaudencio@gmail.com

Claudine Dinali Santos Seixas

Engenheira Agrônoma, Dra. em Fitopatologia,
Pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR
claudine.seixas@embrapa.br

Henrique Debiasi

Engenheiro Agrônomo, Dr. em Ciência do Solo,
Pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR
henrique.debiasi@embrapa.br

Apresentação

Joaquim Mariano Costa

Engenheiro Agrônomo, Especialista em Fertilidade de Solos, Chefe da Fazenda Experimental e Difusor de Tecnologias da Coamo Agroindustrial Cooperativa, Campo Mourão, PR
jmariano@coamo.com.br

José Renato Bouças Farias

Engenheiro Agrônomo, Dr. em Agronomia (Fitotecnia), Pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR
joserenato.farias@embrapa.br

Julio Cezar Franchini

Engenheiro Agrônomo, Dr. em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR
julio.franchini@embrapa.br

Maria Cristina Neves de Oliveira

Licenciada em Matemática, Dra. em Agronomia (Estatística e Experimentação Agronômica), Pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR
mcristina.oliveira@embrapa.br

A produtividade da soja em solos tropicais e subtropicais, principalmente no Cerrado brasileiro, naturalmente deficientes em nutrientes e que representa a maior área do país, é equivalente e muitas vezes superior à produtividade da soja de regiões temperadas, de onde essa cultura é originária.

No entanto, vários fatores podem afetar o potencial de produção da soja, entre eles a ocorrência de doenças.

A podridão de carvão, causada por *Macrophomina phaseolina*, é de ocorrência generalizada nos solos cultiváveis do Brasil. É uma enfermidade que se manifesta principalmente em solos compactados, onde as raízes não conseguem se aprofundar e estão mais sujeitas às condições de estresse hídrico. Altas temperaturas, que podem ocorrer ao longo do período de cultivo, estimulam maior evapotranspiração e, conseqüentemente, podem favorecer a ocorrência de déficits hídricos e, também, da doença.

Além disso, é importante que se considere a variabilidade genética desse patógeno, visto que em uma única raiz de soja, vários isolados de *M. phaseolina* morfológicamente semelhantes, mas diferentes geneticamente podem ser observados. A semeadura direta, prática cultural consolidada no Brasil, vem sempre associada à diversificação de culturas. No entanto, pouco se sabe sobre seu efeito na variabilidade genética desse patógeno.

Sumário

Objetivando buscar soluções que possam eliminar ou reduzir as perdas causadas por esse patógeno, foram reunidas, na presente publicação, informações sobre *M. phaseolina* e gerados pela Embrapa Soja em parceria com a Estação Experimental da COAMO, desde o ano de 1985. As informações aqui apresentadas permitirão aos técnicos e produtores estabelecer estratégias de manejo da doença, visando a sustentabilidade da produção de soja.

Ricardo Vilela Abdelnoor
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja

<i>Macrophomina phaseolina</i> em soja	9
Introdução	9
1. Características do Fungo	11
2. Sintomas	18
3. Fatores Predisponentes à Infecção	20
4. Variabilidade Genética	24
5. Rotação de Culturas e Manejo do Solo	30
6. Resistência Genética	42
Conclusão	44
Agradecimentos	44
Referências	45

Macrophomina phaseolina em soja

Álvaro Manuel Rodrigues Almeida, Claudine Dinali Santos Seixas, José Renato Bouças Farias, Maria Cristina Neves de Oliveira, Julio Cezar Franchini, Henrique Debiasi, Joaquim Mariano da Costa e Celso de Almeida Gaudêncio

Introdução

A podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., afeta raízes e caule de soja.

Macrophomina phaseolina é capaz de infectar centenas de espécies vegetais, tais como, milho, sorgo, amendoim, algodão e girassol, entre outras espécies botânicas (FIGUEIREDO et al., 1969; GHAFAR; ZENTMYER, 1968; MENDES et al., 1971; WYLLIE, 1988).

A ocorrência desse patógeno foi relatada, pela primeira vez, no Brasil infectando raízes de feijão (BITANCOURT, 1935). Na cultura da soja, essa doença teve sua importância negligenciada por diversos anos, por aparecer normalmente nos estádios finais de desenvolvimento da cultura. Lehman et al. (1976) realizaram um levantamento de doenças de soja na safra de 1973/1974 e constataram que em 104 lavouras localizadas nos Estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, avaliadas quanto à incidência e à severidade das doenças, 5% das plantas apresentavam infecção radicular causada por *M. phaseolina*.

O primeiro relato que apontou essa doença, como causadora de expressivos danos à cultura da soja no Brasil, foi feito por Ferreira et al.

(1979). Esses autores constataram que em anos secos e quentes, na região Norte do Estado do Paraná, as perdas em soja das cultivares tardias, Viçoja e Santa Rosa, chegaram a atingir 50%.

Os prejuízos no Brasil, na safra 1996/97, foram estimados em 900 mil toneladas de grãos, conforme relato de Wrather et al. (1997). Nos Estados Unidos (EUA) os relatos informados por Sinclair e Gray (1972) e Wyllie (1974) já indicavam perdas de até 20%. Wrather e Koenig (2006) relataram que as perdas variaram com os anos, sendo a maior delas em 2003, com perdas de aproximadamente dois milhões de toneladas.

À semelhança de outras enfermidades, o método mais prático e econômico para controlar a podridão de carvão seria através do uso de cultivares resistentes. No entanto, não há cultivares comerciais resistentes a esse fungo, embora tenham sido identificados genótipos moderadamente resistentes (MENGISTU et al., 2013; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011; PARIS et al., 2006) que poderiam ser utilizados em programas de melhoramento.

Sabe-se que a incidência e a severidade dessa doença aumentam quando as plantas estão estressadas por falta de água (PEARSON et al., 1984; SMITH et al., 1999; WRATHER et al., 2008) e por excessivo calor.

Uma alternativa para o manejo da doença poderia ser através do uso de rotação de culturas. Entretanto, como esse fungo é polífago, além de ser capaz de sobreviver e de se multiplicar em restos de cultura (PEARSON et al., 1984) é questionável o uso de rotação de culturas para essa finalidade. Mas poderia ser empregada para promover a interferência na biologia e na sobrevivência do patógeno, através de manejo do solo, resultando em ambiente inadequado para o desenvolvimento do fungo (KENDIG et al., 2000) e/ou favorecendo organismos antagonistas (PAL et al., 2001; VILICH, 1993).

No Brasil, o manejo do solo tem sido caracterizado, principalmente, pela mudança do sistema de preparo do solo, migrando do uso de técnicas convencionais para o sistema de semeadura direta, especial-

mente em áreas para produção de grãos, existindo atualmente mais de 31 milhões de hectares em semeadura direta, segundo a Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha (FEBRAPDP, 2013). Caracterizada pela manutenção de restos de cultura sobre a superfície do solo, essa prática, além de reduzir a erosão, interfere nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

A contínua produção de soja (monocultura) em campos de semeadura direta pode resultar no acúmulo de palha, que é citada como agente favorecedor de enfermidades e como um problema para o sistema de semeadura direta. Trabalho conduzido por Saraiva e Torres (2000) demonstrou que 50% dos restos de cultura de soja são encontrados sobre o solo, cerca de seis meses após a colheita.

Muito pouco é conhecido sobre o efeito da utilização do sistema de semeadura direta, ou convencional, em regiões de clima tropical ou subtropical, na sobrevivência e/ou na multiplicação de *M. phaseolina*.

1. Características do Fungo

A denominação desse patógeno foi determinada por Goidanish (1947) após revisar a taxonomia do gênero *Macrophomina*, constituído por apenas uma espécie, *Macrophomina phaseolina*. Esse fungo pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae (MYCOBANK, 2013).

O fungo tem micélio uninucleado, embora células das extremidades do micélio, região de crescimento, sejam usualmente multinucleadas (KNOX-DAVIES, 1967). Produz picnídios marrom-escuros, solitários ou agregados, imersos, tornando-se irrompentes com 100-200 µm de diâmetro, abrindo-se por ostíolo apical (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970). A variação no tamanho dos picnídios parece estar associada ao substrato sobre o qual o fungo se desenvolve (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

Picnídios são produzidos em tecido vivo e também em partes de plantas esterilizadas (LUTRELL, 1946; MACHADO; KIMATI, 1975). No entanto, nem todos os isolados produzem picnídios. Segundo Sutton

(1980) em meio de cultura apenas os esclerócios são produzidos. No entanto, Machado (1987) observou que entre doze isolados estudados, metade produziu picnídios, quando cultivados em meio de BDA.

Os conídios são hialinos, elipsoides a ovoides, medindo 14-30 μm x 5-10 μm (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970).

Diferenças culturais entre isolados têm sido descritas por Pearson et al. (1987a). No Brasil, pelo menos dois tipos distintos de colônia têm sido observados (Figura 1).

Os microesclerócios são negros e lisos, medem em torno de 100 μm de diâmetro (em cultura 50-300 μm) (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970).

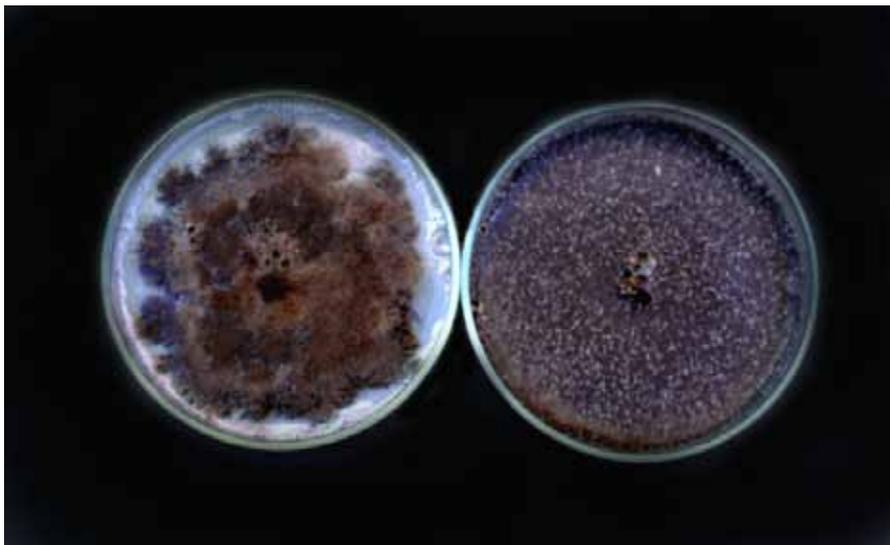


Foto: Alvaro Almeida

Figura 1. Isolados de *Macrophomina phaseolina* com diferenças culturais, obtidos de soja e cultivados em meio de batata-dextrose-ágar.

Em tecidos infectados, o fungo produz microesclerócios em grande quantidade, os quais constituem em uma das formas de sobrevivência do fungo, bem como a principal fonte de inóculo desse patógeno. Microesclerócios são produzidos a partir do micélio, consistindo de estrutura multicelular, dura e resistente a condições adversas, e são fa-

cilmente encontrados sob a epiderme das raízes ou na camada externa do córtex e na região do colo. Com a decomposição desses tecidos, os microesclerócios são liberados no solo. Em contato com a região do colo ou da raiz da planta, germinam e infectam as raízes. Nem todas as células germinam na mesma época. Assim, um microesclerócio pode ter células germinando e infectando plantas em estádios diferentes.

De acordo com Cook et al. (1973), a longevidade dos microesclerócios tende a diminuir com o tempo. Meyer et al. (1974) afirmam que os microesclerócios são capazes de sobreviver no solo por dois a quinze anos. Estudos realizados por Dhingra e Sinclair (1975) mostraram que os microesclerócios de *M. phaseolina* tiveram a germinação reduzida em solo mantido a 30 °C, e sob alta capacidade de retenção de água no solo (>60%). Nenhuma redução foi observada quando o solo estava seco e até 40%-50% de redução de germinação de microesclerócios ocorreu, quando o solo foi mantido com 20%-40% da capacidade de retenção de água. Entretanto, os autores afirmaram que esse estudo foi de apenas sete semanas.

Alta umidade do solo, baixa relação C:N, baixa densidade do solo e concentração de oxigênio menor que 16% reduzem a viabilidade de microesclerócios no campo (DHINGRA; SINCLAIR, 1975; GANGOPADHYAY et al., 1982, TODD et al., 1987). Dhingra e Sinclair (1978) relatam também que a longevidade em condições adversas pode chegar a três anos.

No Brasil, o que tem sido visto é que os solos com alta densidade (mais compactados) e sob elevada temperatura (acima de 50 °C, na superfície, nas horas mais quentes do dia), apresentam condições que favorecem a infecção por esse fungo. Entretanto, não se pode generalizar comparativamente entre as condições de um país subtropical com um país de clima temperado.

Macrophomina phaseolina é capaz de infectar mais de 500 espécies vegetais (GUPTA et al, 2012), sendo feijão, caupi, milho, amendoim, girassol, soja, sorgo e crotalária, as espécies suscetíveis mais comuns no Brasil.

Estudos feitos na Embrapa Soja, na safra de 1999, mostraram que esse fungo é naturalmente encontrado em solos da mata nativa ou em solos cultivados (ALMEIDA et al., 2001). No caso de solos de mata nativa, a concentração encontrada foi de 4,21 microesclerócios por grama de solo seco (média de três anos), demonstrando que o solo sob mata nativa já estava infestado com *M. phaseolina*. No entanto, em áreas vizinhas, cultivadas com soja ou milho, por mais de cinco anos, a concentração variou de 15 a 111 microesclerócios por grama de solo seco.

Outra forma de sobrevivência do fungo é nos restos de cultura. Por isso, uma questão constante feita pela assistência técnica e pelos produtores é com relação à sobrevivência desse fungo em sistemas de semeadura direta e convencional. Um estudo foi então estabelecido com o propósito de responder essa questão.

Após a colheita da cultivar Embrapa 37, coletaram-se cem gramas de resíduos de vagens, de hastes e de raízes de soja. Cada um desses tipos de tecidos foi acondicionado em sacos de tela de náilon (mesh 4 mm), os quais foram colocados sobre o solo e também a 10 cm de profundidade.

Imediatamente após a colheita e a intervalos de 30 dias, durante o período de entressafra (março a setembro), retiraram-se cinco gramas dos tecidos que foram cortados em fragmentos de 0,5 cm de comprimento e lavados em água corrente e secos. A seguir, efetuou-se lavagem em álcool 95%, por 30 segundos. Os fragmentos foram depois desinfestados em hipoclorito de sódio a 0,06%, lavados em água estéril e transferidos para placas de Petri com BDA, contendo sulfato de estreptomicina (10 mg L⁻¹). Cada tratamento tinha sete placas com três fragmentos por placa. As placas foram incubadas a 26 °C, por oito dias. Contou-se o número de colônias de fungo desenvolvidas sobre cada fragmento e determinou-se a porcentagem de colônias de *M. phaseolina*.

Os patógenos mais frequentemente identificados foram *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* sp., *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. Com relação a *M. phaseolina*, consta-

tu-se que a recuperação do fungo, a partir dos fragmentos analisados de vagens e hastes, aumentou com o período de enterrio, enquanto que com os fragmentos mantidos sobre o solo houve sempre diminuição de sobrevivência com o passar do tempo (Figuras 2 e 3).

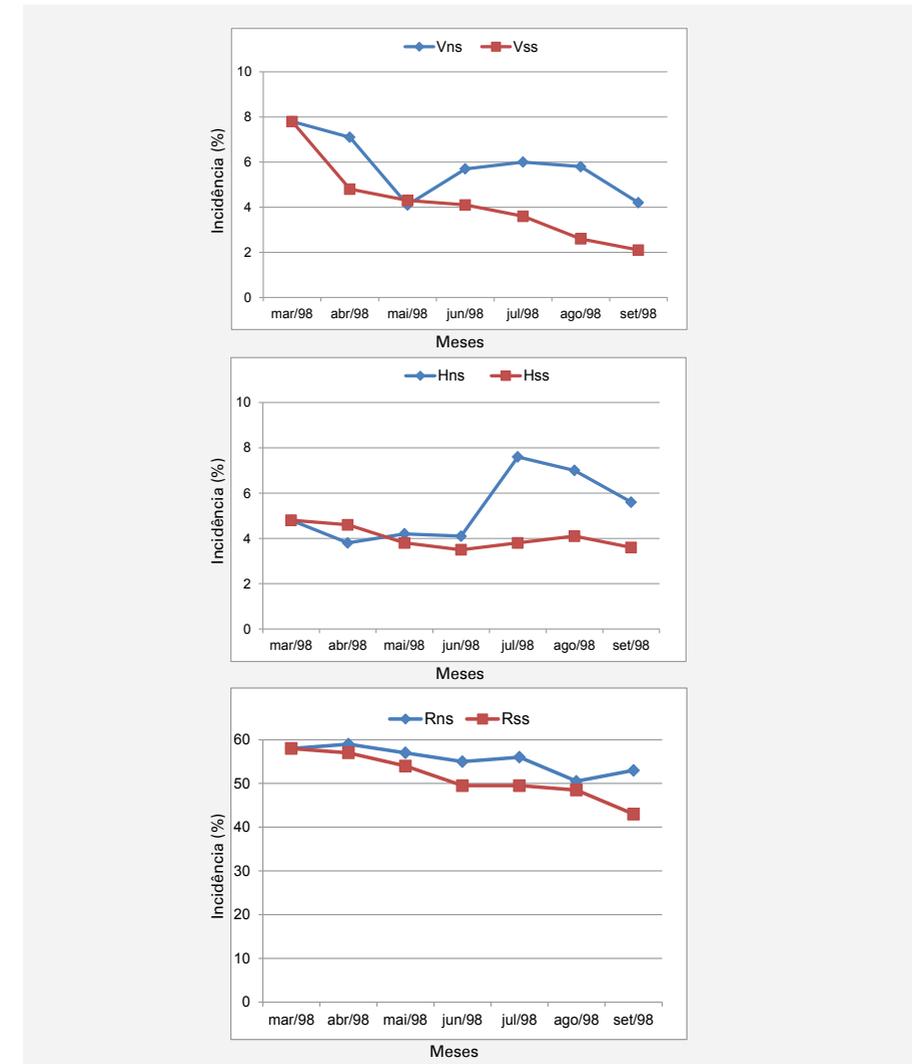


Figura 2. Incidência (%) de *Macrophomina phaseolina* em fragmentos de soja mantidos sobre o solo (ss) ou enterrados a 10 cm de profundidade (ns). V= vagem; H= haste; R= raiz. Embrapa Soja, Londrina, 1998.

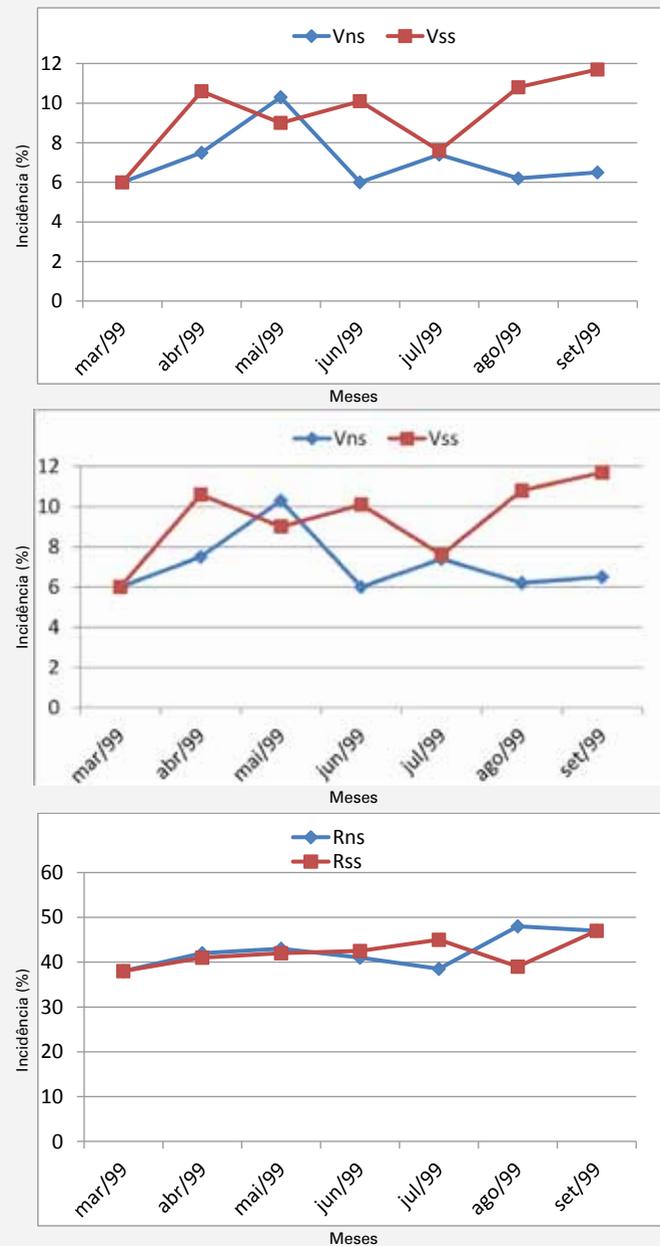


Figura 3. Incidência (%) de *Macrophomina phaseolina* em fragmentos de soja mantidos sobre o solo (ss) ou enterrados a 10 cm de profundidade (ns). V= vagem; H= haste; R= raiz. Embrapa Soja, Londrina, 1999.

Fragmentos de hastes e raízes mantiveram a mesma taxa de sobrevivência, com aumento nos meses de agosto e setembro.

Esses resultados mostram que o fungo consegue se manter viável durante a entressafra, especialmente quando há enterrio dos restos de cultura. O aumento na taxa de sobrevivência é facilmente explicável pela excelente capacidade saprofítica de *M. phaseolina*, favorecida pela disponibilização de matéria orgânica. Além disso, o inóculo naturalmente presente no solo também inicia a infecção dos restos de cultura, incorporados ao solo pela ação de enterrio. Esse fato foi observado anteriormente, para esse patossistema por Pearson et al. (1984) e Wrather et al. (1998).

A maior sobrevivência observada em 1998 pode ser em consequência da maior quantidade de inóculo inicial desse ano e provavelmente, por causa da maior umidade do período, decorrente de maior precipitação do que no ano de 1999.

BAIRD et al. (2003) fizeram estudo similar. Por um período de dois anos eles estudaram fragmentos colonizados por *M. phaseolina* e mantidos em várias profundidades, dentro de sacos de náilon. Constatou-se que o fungo *Trichoderma* spp. reduziu significativamente a quantidade de propágulos de *M. phaseolina* além de degradar os fragmentos de soja, em maior velocidade. Esse estudo mostrou que práticas agrícolas que aumentam a população de *Trichoderma* spp. podem, direta ou indiretamente, diminuir a longevidade de *M. phaseolina*.

El-Barougy e colaboradores (2009) trataram sementes de soja com rhizobactérias antagônicas a isolados de *M. phaseolina*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e a campo com os seguintes organismos: *Bradyrhizobium japonicum* estirpe USDA 110, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, *Bacillus cereus*, *Azotobacter chroococcum* e *Azospirillum brasilense*, considerados como promotores de crescimento. Em casa de vegetação as sementes tratadas com todas as bactérias promotoras de crescimento controlaram a doença. *Bacillus megaterium* apresentou a maior quantidade de plantas

sadias (75%), seguido de *B. cereus* (72%) enquanto que os demais tratamentos apresentaram 67% e 62%. No campo, o tratamento de sementes com *B. megaterium* foi o mais eficiente (87,5%), seguido pela combinação de *A. chroococcum* com *A. brasilense* (66,6%) e *Pseudomonas fluorescens* (58,3%).

2. Sintomas

Os sintomas variam de acordo com a idade da planta no momento da infecção. Infecção durante a emergência causa lesões de coloração marrom-escura, na região do colo. A infecção tende a ser mais severa se houver baixa umidade do solo e alta temperatura. As plantas infectadas ocorrem aleatoriamente, nas fileiras, ou em reboleiras (Figura 4) em decorrência da desuniformidade de distribuição de microesclerócios no solo. As lesões podem ser confundidas com lesões causadas por *Rhizoctonia solani*. No entanto, as lesões de *M. phaseolina* não são profundas e nem causam estrangulamento do hipocótilo. As plantas infectadas que sobrevivem à infecção inicial vão apresentar sintomas de amarelecimento na época de formação de vagens, similar à maturação normal. O amarelecimento é progressivo, levando à murcha. As folhas permanecem aderidas, mas ficam caídas, ao longo das hastes (principal característica), posteriormente tornando-se secas e de coloração marrom-escura (Figura 5). Nessas plantas, as raízes apresentam a epiderme solta, ou facilmente destacável, deixando à mostra pontuações negras, que são os microesclerócios (Figura 6). Quando esses estão incrustados na camada externa do cortex, é comum se ver a medula com micélio cotonoso e escuro.

O fungo é transmitido por semente conforme relato de Andrus (1938). O micélio e os microesclerócios se desenvolvem dentro do tegumento (KUNWAR et al., 1986). As sementes, em geral, não apresentam sinais de infecção.



Foto: Álvaro Almeida

Figura 4. Plantas mortas por *Macrophomina phaseolina* distribuídas em reboleira, típico de fungos habitantes de solo.



Foto: Álvaro Almeida

Figura 5. Plantas adultas, no estágio R5 (enchimento de grãos), mortas por *Macrophomina phaseolina*.



Foto: Cláudia Godoy

Figura 6. Raízes de soja infectadas por *Macrophomina phaseolina*, mostrando microesclerócios (pontuações escuras) que se desenvolvem entre a epiderme, que se solta com facilidade, e o córtex.

3. Fatores predisponentes à infecção

Segundo Bergamaschi et al. (1999) para que uma planta tenha boas condições de sobreviver principalmente em regiões onde há pouca disponibilidade de água, ela deve ser capaz de manter uma condição hídrica superior durante as horas mais críticas do dia, quando a demanda evaporativa da atmosfera é alta. A evapotranspiração máxima de uma cultura depende da demanda evaporativa do ar, que é determinada pela radiação solar, pelo vento, pela umidade e pela temperatura do ar. Desses, a radiação solar é o elemento de maior importância na demanda evaporativa da atmosfera e, portanto, da evapotranspiração (BORCHARDT; TRAUTH, 2012).

A quantidade de água evaporada pelo solo e transpirada pelas plantas é determinada, principalmente, pela disponibilidade de energia e de água. A evapotranspiração é, fundamentalmente, um processo dependente da energia disponível para a mudança de estado físico da água, sendo, portanto, a radiação solar o fator isolado mais importante. O efeito do vento na evaporação é exercido pela remoção e pela renovação do ar acima da superfície evaporante. A temperatura está grandemente associada à radiação solar e, portanto, também se correlaciona positivamente com a evaporação. Um aumento na temperatura do ar influi favoravelmente na intensidade de evaporação porque torna maior a quantidade de vapor d'água que pode estar presente no mesmo volume de ar, ao se atingir o grau de saturação. Quanto maior o grau de umidade do ar, menor a intensidade de evaporação (BERGAMASCHI et al., 1999).

A seca a que são submetidas as plantas de soja, de forma intermitente ou terminal, e a temperatura alta constante, nas horas mais quentes do dia, são fatores limitantes à obtenção de alta produtividade (LUDLOW; MUCHOW, 1990). Um solo bem preparado permite que as raízes tenham melhor distribuição e sejam mais profundas, retendo mais umidade.

A incidência e a severidade de *M. phaseolina*, normalmente, têm sido associadas a dois fatores: deficit hídrico e temperatura do

solo. Nos anos 60, dois pesquisadores determinaram que a severidade da podridão de carvão, em sorgo, foi maior quando as plantas foram submetidas a deficit hídrico (EDMUNDS, 1964; HSI, 1961). Outros exemplos são descritos com algodão (GHAFAR; ERWIN, 1969) e girassol (BLANCO LOPEZ; JIMENEZ DIAZ, 1983).

Diversos relatos associam o deficit hídrico à infecção por *M. phaseolina*. Baixo potencial hídrico aumenta a suscetibilidade das plantas e reduz a atividade de microrganismos antagonistas.

Wrather et al. (2008) afirmaram que as diferenças na redução do rendimento da soja por causa da podridão de carvão entre os anos foi devida as diferenças de pluviosidade. Esses autores avaliaram genótipos sensíveis e tolerantes à seca nos anos 2003 a 2005 e verificaram que alguns genótipos tolerantes à seca resistem mais à colonização das raízes por *M. phaseolina*, mas isso não ocorreu com todos os genótipos tolerantes.

Segundo Olaya e Abawi (1996a), o máximo desenvolvimento micelial, em meio de BDA, foi obtido com potencial osmótico da água (ψ), ajustado com KCl, NaCl ou sacarose e mantidos a 30 °C. O máximo crescimento radial foi obtido em BDA com valores de ψ entre -1.220 J kg^{-1} e -1.880 J kg^{-1} . A biomassa, obtida pelo cultivo em meio de batata-dextrose (meio líquido) foi máxima quando o potencial osmótico ψ esteve entre -2.030 J kg^{-1} e -3.340 J kg^{-1} . A produção de microesclerócios não foi afetada quando o potencial osmótico variou entre -670 J kg^{-1} e -3.920 J kg^{-1} , mas foi completamente inibida, com valores entre -8.270 J kg^{-1} e $-12.020 \text{ J kg}^{-1}$. Os resultados demonstraram que *M. phaseolina* pode desenvolver-se e produzir grandes quantidades de microesclerócios em condições de baixo potencial osmótico (ψ) e justifica como a doença pode ser favorecida pela seca.

Em outro estudo, Olaya e Abawi (1996b) procuraram avaliar o efeito do potencial da matriz do solo na sobrevivência de microesclerócios em solo pasteurizado e não pasteurizado. Foram utilizados os

potenciais (ψ) de 0 J kg⁻¹, -10 J kg⁻¹, -30 J kg⁻¹, -100 J kg⁻¹, -300 J kg⁻¹, -500 J kg⁻¹ e -1.500 J kg⁻¹. Um solo seco ao ar (ψ aproximadamente de -40.000 J kg⁻¹) foi incluído. É importante que se mencione que a condição ideal de umidade do solo, para a cultura da soja, é de -30 J kg⁻¹, equivalente à capacidade de campo. Duas e quatro semanas após, os autores observaram que os microesclerócios das amostras de solo, mantidas a 30 °C e a potenciais osmóticos de -10 J kg⁻¹ e -1.500 J kg⁻¹ apresentavam viabilidade de 40% e 0%, respectivamente. No entanto, microesclerócios mantidos em solo seco ao ar apresentavam 100% de viabilidade. Os autores também avaliaram o efeito do potencial osmótico da água na colonização de fragmentos de hastes de feijão. A colonização dos fragmentos de hastes de feijão aumentava à medida que diminuía o potencial osmótico da água, atingindo o máximo de colonização com o valor de -3.990 J kg⁻¹, decrescendo a partir desse valor. Da mesma forma, o número de microesclerócios desenvolvidos no tecido infectado seguiu a mesma resposta da colonização. Esses trabalhos demonstraram que *M. phaseolina* pode sobreviver e colonizar fragmentos de haste de feijão, mesmo em condições de baixíssimo teor de umidade.

Considerando que o teor de umidade esteja relacionado à aeração do solo, é oportuno mencionar os resultados de Gangopadhyay et al. (1982) ao estudarem o efeito da densidade aparente do solo e da porosidade, sobre a sobrevivência de microesclerócios de *M. phaseolina*. Segundo esses autores, microesclerócios não sobrevivem bem no solo com alta densidade aparente ($D_b = 1,56 \text{ g cm}^{-3}$) e com alta umidade, provavelmente por haver redução de O_2 . Em outro trabalho, Wyllie et al. (1984) descrevem que a germinação de microesclerócios foi inibida quando a concentração de O_2 no solo foi inferior a 16%. Esses resultados provavelmente se associam àqueles obtidos por Kendig et al. (2000) que estudaram o efeito de irrigação e déficit hídrico do solo, na densidade de *M. phaseolina* no solo e em raízes de soja. Os autores submeteram plantas de soja a diferentes sistemas de irrigação. Plantas das cultivares Davis e Lloyd receberam irrigação durante todo o ciclo, até o florescimento, após o florescimento ou foram cultivadas sem irrigação. Os resultados mostraram que a densidade de microesclerócios nas raízes aumentou em todos os trata-

mentos. No entanto, raízes de plantas com irrigação até o florescimento e aquelas que foram irrigadas após o florescimento apresentaram níveis intermediários de microesclerócios, em comparação com aquelas sempre irrigadas e aquelas sem irrigação. Em relação à temperatura, observou-se aumento na severidade da doença em algodão, quando a temperatura foi mantida entre 30 °C e 40 °C (GHAFFAR; ERWIN, 1969). Embora a temperatura do solo tenha sido citada como um componente que contribui para a infecção, provavelmente por debilitar a planta, o trabalho de Manici et al. (1995) procurou avaliar o efeito da temperatura sobre o fungo.

Sessenta e quatro isolados de girassol, coletados em quatro diferentes regiões da Itália (Norte, Meio-Este, Meio-Oeste e Sul) foram submetidos às temperaturas de 15 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C, avaliando-se a taxa de crescimento. Os autores constataram que os isolados tendem a se desenvolver melhor nas temperaturas similares àquelas das regiões onde se desenvolvem naturalmente. Sessenta e dois isolados tiveram um ótimo desenvolvimento à temperatura de 30 °C enquanto quatro desenvolveram-se bem à temperatura de 40 °C. Vários isolados se desenvolveram em temperaturas diferentes daquelas onde são originalmente encontrados, mostrando também uma capacidade de adaptação.

Outro trabalho associou temperatura do substrato e tensões de água, na germinação de microesclerócios de *M. phaseolina* (VIANA; SOUZA, 1997). Utilizando areia como substrato, e temperaturas de 30 °C, 40 °C e 50 °C, combinados com tensões de água de 8 -kPa, 80 -kPa, 300 -kPa e 1.500 -kPa os autores concluíram que a maior porcentagem de germinação dos microesclerócios ocorreu a 30 °C, com tensões de água de 300 -kPa e 1.500 -kPa. A 40 °C a redução de germinação foi acentuada e significativamente inferior às observadas a 30 °C. A 50 °C não houve germinação significativa de microesclerócios.

Zveibil et al., 2012 avaliou a mortalidade de plantas de moranguinho causada por *M. phaseolina*, e constatou que, entre 151 isolados desse patógeno, os microesclerócios tinham a viabilidade reduzida quando o solo foi mantido em temperaturas variando entre 18 °C e 32 °C em condições de casa de vegetação ou a 25 °C. A 35 °C houve menor

efeito sobre a viabilidade, mas todas as temperaturas afetaram a viabilidade dos microesclerócios. A morte das plantas, entretanto, foi maior quando submetidas a 30 °C do que a 25 °C, enquanto que o déficit hídrico em plantas mantidas a 25 °C ou 30 °C não afetou a mortalidade das plantas em solos infestados por *M. phaseolina*. O déficit hídrico somente foi testado com as temperaturas de 25 °C e 30 °C, com ou sem adição de água. As plantas eram irrigadas assim que apresentavam murcha.

O binômio, temperatura e umidade, foi mencionado no trabalho. Não ficou claro, entretanto, como a maior viabilidade de microesclerócios (temperatura de 30 °C) se relacionou com a maior mortalidade das plantas de moranguinho (temperatura variável ou exatos 25 °C).

Essas observações contradizem o que se tem observado no Brasil, em áreas caracterizadas por altas temperaturas e sujeitas a estiagem (déficit hídrico).

4. Variabilidade Genética

Diversos trabalhos relatam diferenças entre isolados obtidos de hospedeiros distintos em relação à morfologia, à patogenicidade e à habilidade metabólica. Essa última tem sido observada quando se cultivam isolados em meio contendo clorato de potássio (CLOUD; RUPE, 1991; PEARSON et al., 1987a) e em meio contendo diferentes fontes de nitrogênio (PEARSON et al., 1987b). Pearson et al. (1986), conseguiram diferenciar isolados de milho e de soja quanto a sensibilidade a clorato de potássio.

Com técnicas de biologia molecular, como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), a identificação de isolados geneticamente diferentes foi facilitada. O trabalho desenvolvido por Fuhlbohmet al. (1997) foi pioneiro no uso de RAPD na determinação de variabilidade genética entre isolados de *M. phaseolina* de caupi, na Austrália.

Almeida e Abdelnoor (1998) também constataram a ocorrência de variabilidade entre isolados de soja, no Brasil. Cinquenta e cinco iso-

lados foram obtidos de raízes de soja, coletadas em diferentes regiões do Brasil (Tabela 1). As raízes foram lavadas em água corrente e fragmentos das raízes foram esterilizados em hipoclorito de sódio (2,5%), lavados em água estéril e transferidos assepticamente para placas contendo BDA e estreptomicina (0,1 mg mL⁻¹ de meio). Cada isolado foi cultivado em meio líquido de batata e dextrose (BD) e o micélio produzido, depois de lavado, foi utilizado para extração do DNA. Os fragmentos amplificados, obtidos por PCR, foram depois separados por eletroforese. O resultado dos padrões das bandas observadas foi utilizado para análise com o programa NTSYS versão 2.02j. Coeficientes de similaridade para todas as possíveis combinações de pares de isolados foram estimados pelo método de DICE. O dendrograma foi construído a partir dos coeficientes de similaridade, usando o método da média das distâncias (Unweightedpair-group method using an arithmetic average-UPGMA) recomendado por Sneath e Sokal (1973).

Os 55 isolados foram agrupados em três grupos distintos (Figura 7). A média de similaridade dentro dos grupos 1, 2 e 3 foi de 99%, 85% e 75%, respectivamente. O primeiro grupo foi composto de apenas três isolados (P1/F1-MS, P5/F5-MS e P1/F2-MS). Dois isolados (P1/F1-MS e P1/F2-MS) não ficaram no mesmo grupo dos isolados P1/F3-MS, P1/F4-MS e P1/F5-MS, todos originários da raiz da mesma planta (P1) de soja, amostra de Mato Grosso do Sul. O mesmo ocorreu em amostra do Rio Grande do Sul, isolados de raízes tanto da planta P1 quanto da P2 foram classificados em dois grupos distintos. Pelos resultados obtidos e considerando que apenas cinco plantas de cada local e 15 fragmentos de raízes foram analisados, pode-se afirmar que o fato não é casual. O dendrograma obtido foi suportado tanto pela análise de bootstrap quanto pela análise cofenética, com um coeficiente de 0,98, considerado valor adequado ao estudo.

O segundo grupo é o maior deles, contendo 33 isolados com similaridade de 85%. O terceiro grupo é constituído por 19 isolados e similaridade de 75%.

Tabela 1. Isolados de *Macrophomina phaseolina* obtidos de diferentes raízes de soja coletadas em diversos locais do Brasil. Embrapa Soja, Londrina, PR.

Isolado	Planta/fragmento	Isolado	Planta/fragmento
1	P1/F2-RS*	29	P4/F5-MS
2	P1/F3-RS	30	P5/F1-MS
3	P1/F4-RS	31	P5/F2-MS
4	P1/F5-RS	32	P5/F3-MS
5	P2/F1-RS	33	P5/F4-MS
6	P2/F2-RS	34	P5/F5-MS
7	P2/F3-RS	35	P6/F1-MS
8	P2/F4-RS	36	P6/F2-MS
9	P2/F5-RS	37	P6/F3-MS
10	P1/F1-MS	38	P6/F4-MS
11	P1/F2-MS	39	P6/F5-MS
12	P1/F3-MS	40	P1/F1-RS
13	P1/F4-MS	41	P1/F2-PR
14	P1/F5-MS	42	P1/F3-PR
15	P2/F1-MS	43	P1/F4-PR
16	P2/F2-MS	44	P1/F5-PR
17	P2/F3-MS	45	P2/F1-PR
18	P2/F4-MS	46	P2/F2-PR
19	P2/F1-MS	47	P2/F3-PR
20	P3/F1-MS	48	P2/F4-PR
21	P3/F2-MS	49	P2/F5-PR
22	P3/F3-MS	50	P1/F1-MG
23	P3/F4-MS	51	P2/F1-MG
24	P3/F5-MS	52	P2/F2-MG
25	P4/F1-MS	53	P2/F3-MG
26	P4/F2-MS	54	P2/F4-MG
27	P4/F3-MS	55	P2/F5-MG
28	P4/F4-MS		

*P_/F_/_ZZ: P_= número da raiz da planta usada; F_= número do fragmento de cada raiz isolada; ZZ= Estado de coleta (MS=Mato Grosso do Sul; MG= Minas Gerais; PR= Paraná; RS= Rio Grande do Sul).

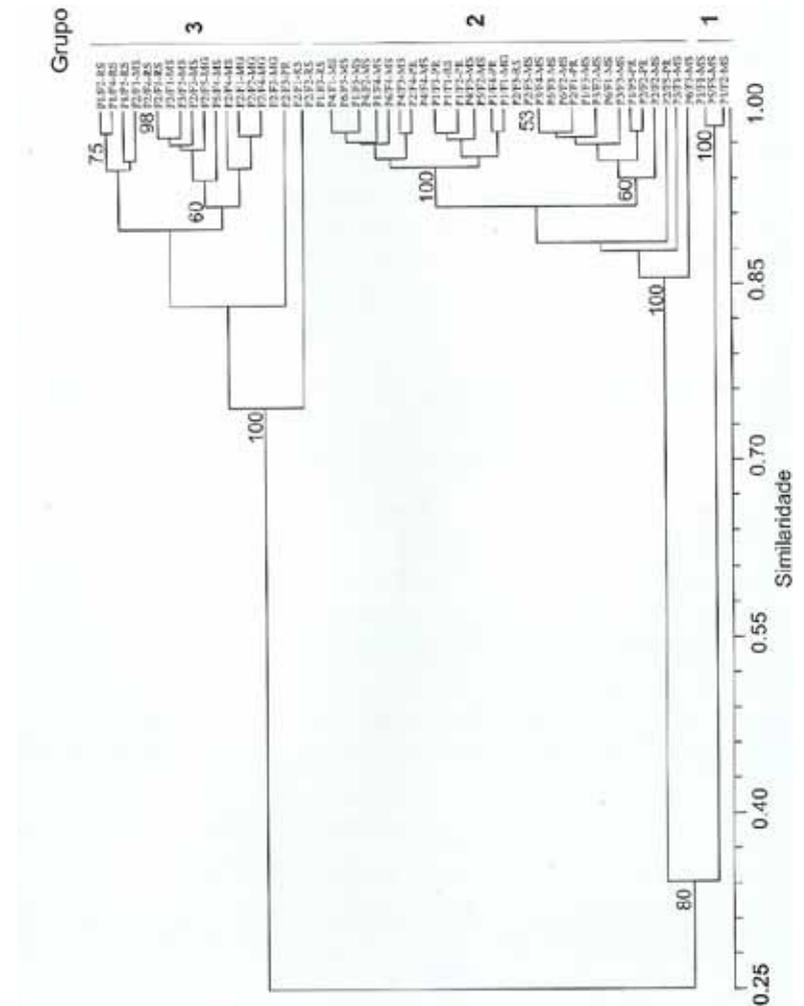


Figura 7. Dendrograma obtido pelo método de UPGMA utilizando os coeficientes DICE, oriundos de análise de RAPD, de 55 isolados de *Macrophomina phaseolina*. Números nos nós representam resultados de 1000 repetições da análise de bootstrap, usando o programa WinBoot (YAP; NELSON, 1996). Apenas valores iguais ou maiores que 50% são mostrados.

A comprovação desses resultados foi obtida pelo uso da análise de coordenadas principais, mostrando que os dois vetores explicam 87% da variância total (Figura 8). O gráfico de dupla dimensão mostra que os isolados se distribuem em três grupos. A adição de um terceiro vetor não aumentou esse valor.

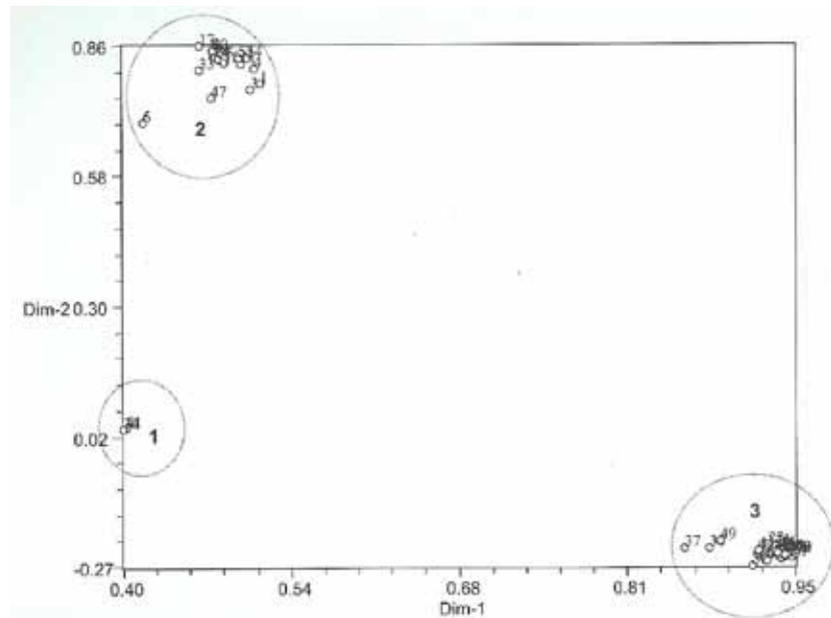


Figura 8. Gráfico bidimensional obtido por análise de coordenadas principais, utilizando dados de RAPD, referente a 55 isolados de *Macrophomina phaseolina*, mostrando a formação de três grupos.

A variabilidade encontrada foi baixa, entre isolados, dentro de cada grupo. No entanto, a divergência entre grupos foi alta, permitindo formar os três grupos. A baixa variabilidade genética encontrada pode ser devida ao número de isolados que não foi grande (55). Caso a amostragem tivesse sido maior, poderia se supor que houvesse maior variabilidade genética. Isso é comum entre organismos que não possuem reprodução sexuada, como parece ocorrer com esse patógeno. Entretanto, existe a possibilidade de parassexualismo, ou seja, fusão de células de diferentes hifas, contribuindo para a variabilidade genética encontrada.

Jana et al. (2003) caracterizaram 43 isolados de *M. phaseolina* e 22 isolados de *Fusarium* spp. coletados em diversas regiões da Índia e oriundos de diversas espécies botânicas, através do método RAPD. Um primer foi obtido (OPA-13) permitindo produzir perfis eletroforéticos específicos para espécies de *Fusarium* e de *M. phaseolina*, utilizando sistema "multiplex".

Nessa mesma linha de pesquisa, também utilizando RAPD, Das et al. (2008) identificaram alto grau de polimorfismo (98,1%) entre 20 isolados de sorgo, que se agruparam em sete grupos ao nível de 37% de similaridade. Isolados sensíveis ao clorato de potássio foram geneticamente mais próximos entre si do que os resistentes. Ficou demonstrado que isolados de sorgo, sensíveis a clorato de potássio, tinham alguma relação com a severidade da podridão de carvão em sorgo.

Todos esses trabalhos confirmam que marcadores RAPD são adequados para avaliar variabilidade genética da população de fungos, constituindo ferramenta auxiliar no estudo da biologia e da ecologia de patógenos. Jana et al. (2005) e Baird et al. (2009) mencionam também a utilização de microsátélites (SSR - Simple Sequence Repeat) para estudar a variabilidade genética de *M. phaseolina*.

A variabilidade genética tem sido observada entre isolados de *M. phaseolina*, bem como, o efeito de especialização desse fungo, de acordo com a planta hospedeira. Su et al. (2001) demonstraram que isolados de *M. phaseolina* de um mesmo hospedeiro são geneticamente similares. Isolado de milho quando inoculado em raízes de sorgo, soja e algodão apresentaram menor quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), diferindo estatisticamente da colonização de raízes do próprio isolado de milho, que apresentou a maior concentração de UFC.

Almeida et al. (2008) avaliaram isolados de soja, milho e girassol, em inoculações cruzadas, quanto à capacidade de formação de microesclerócios em raiz. A maior e a menor produção significativa de microesclerócios ($P=0,05$) foram observadas em raízes de soja e girassol, respectivamente, independente da origem do isolado. Além disso, estudou-se a variabilidade de isolados do fungo, obtidos de sistemas de rotação de culturas estabelecidos há 20 anos utilizando-se RAPD. Oitenta e nove isolados, oriundos de cinco populações foram coletados em amostras de solo de quatro sistemas de rotação e uma amostra de solo virgem. Sete agrupamentos foram observados com 85% de similaridade. Essas análises indicaram que *M. phaseolina* é uma espécie com baixa variabilidade genética, mas com possível efeito do

sistema de rotação. AMOVA foi realizada com os dados de RAPD. Da variabilidade genética total, 21% ($P=0.001$) foi explicada pelas diferenças entre populações e, 79% foi explicada por diferenças dentro das populações ($\Phi_{st}=0.2110$; $P=0,001$). A média do coeficiente de diferenciação gênica (GST) estimada entre as cinco populações foi de 27%, similar aos resultados da AMOVA ($\Phi_{st}=0,2110$). A variabilidade genética total mostrou que as cinco populações têm alto grau de variabilidade ($HT=0,3484$). Os resultados sugerem que a diferenciação genética de *M. phaseolina* pode ser alterada pela rotação de culturas, apesar disso esse efeito da rotação não contribui efetivamente no manejo, porque há ainda, a influência das condições climáticas, que podem contribuir aumentando (temperaturas altas e/ou deficit hídrico) a severidade da doença numa determinada estação de cultivo.

5. Rotação de culturas e manejo do solo

Com o conhecimento da ação polífaga desse fungo, ficou claro que o sistema de rotação de culturas era uma medida inviável para o controle dessa doença (SHORT et al., 1980). Esses autores estudaram a sobrevivência de microesclerócios no período de maio de 1975 a outubro de 1977. A profundidade de enterrio dos microesclerócios no solo não afetou a germinação dos mesmos. A população de microesclerócios viáveis avaliada no final do estudo foi maior do que aquela observada no início, demonstrando que em solo sob pousio houve aumento dessa população, em decorrência da vida saprofítica do fungo, tornando-se inversamente proporcional ao rendimento da soja. Esse fato foi também observado por Almeida et al. (2001), em restos de cultura de soja mantidos sob ou sobre o solo, mostrando que o fungo sobrevive e se multiplica saprofiticamente. Ainda no mesmo trabalho a população de microesclerócios foi proporcional ao número de anos cultivados, consecutivamente, com soja e milho. Da mesma forma, a severidade em raízes de soja infectadas foi diretamente relacionada à concentração de microesclerócios no solo. Os autores concluíram que o rápido aumento dos microesclerócios em solos cultivados com hospedeiros suscetíveis, a persistência desses propágulos no solo e em resíduos de soja e a direta relação entre concentração de microesclerócios e redução de rendimento, não permitem que essa doença possa ser controlada por rotação de culturas.

Trabalho conduzido por Singh et al. (1990) confirmou essa observação. Trabalhando na região de Patancheru, Índia, os autores avaliaram diversos sistemas de rotação quanto ao efeito na produção de microesclerócios, determinado através de análise de amostras de solo. O cultivo de sorgo, seguido por caupi ou grão de bico, favoreceu o aumento da concentração de microesclerócios no solo, em relação a outros sistemas de rotação. No entanto, sistemas de cultivo com pousio, seguindo com semeadura de sorgo ou grão de bico, estabilizou a densidade de inóculo.

No estudo conduzido por Almeida et al. (2008) foi testado o efeito de rotação entre três espécies vegetais. Isolados de soja, milho e girassol foram avaliados, em inoculações cruzadas, quanto à capacidade de formação de microesclerócios em raiz, em casa de vegetação. A maior e a menor produção significativa de microesclerócios ($P=0,05$) foram observadas em raízes de soja (863 microesclerócios por grama de raiz) e girassol (578 microesclerócios por grama de raiz), respectivamente, independente da origem do isolado. Esse resultado foi similar aos obtidos por Su et al. (2001) que observaram maior produção de microesclerócios em isolados de soja do que entre isolados de milho, sorgo ou algodão. O efeito da rotação, nesse estudo, teve alternância de culturas por 20 anos, enquanto Su et al. (2001) utilizaram rotação por 15 anos.

Uma importante diferença entre esses estudos foi o número de microesclerócios. Nos solos do Sul do Brasil, sob rotação de culturas, encontrou-se 215 microesclerócios por grama de solo enquanto Su et al. (2001) encontrou uma média de 10 microesclerócios por grama de solo do estado da Louisiana, nos Estados Unidos da América.

Mengistu et al. (2009) avaliaram a densidade de propágulos de *M. phaseolina* em tecidos de soja e amostras de solo, quando submetidos ao efeito do sistema de cultivo, tipo de palha e herbicida. A análise de variância mostrou efeito significativo do sistema de cultivo e do tipo de palha no número de unidades formadoras de colônias (UFC) desse fungo e interação com o ano. O número de UFC foi maior no sistema convencional do que no sistema de plantio direto, e também foi maior quando se utilizou palha de ervilhaca e solo descoberto, do que

com palha de centeio. Os resultados sugerem que essa doença poderia ser melhor manejada no plantio direto do que em semeadura convencional. O herbicida glifosato não afetou o número de UFC nas amostras de solo e de tecido de raízes. Canaday et al. (1986) avaliaram o efeito de herbicidas no campo, anteriormente, quanto ao nível de estresse induzido nas plantas pulverizadas por diferentes princípios ativos, mas cujas raízes foram colonizadas por *M. phaseolina*. O solo continha 22 e 34 microsclerócios/g de solo em 1983 e 1984, respectivamente. Observou-se que estresse induzido por chloramben e 2,4-DB aumentou significativamente a colonização das raízes enquanto que o alachlor a reduziu. Estresses causados nas raízes, por glifosato e vernolato, não apresentaram qualquer efeito na colonização desse fungo.

Essa doença aparece em reboleiras, de diversos tamanhos. Mihail e Alcorn (1987) consideraram que a podridão de carvão é uma doença que tende a ocorrer em reboleiras próximas. Isso significa que o inóculo é mais concentrado e menos disperso.

Olanya e Campbell (1988) mencionam que a agregação da densidade de inóculo, medida pelo índice de Morisita, diminuiu após uma gradagem. A redistribuição do inóculo, pelo efeito da gradagem, foi mais evidente em reboleiras com alta densidade de inóculo.

Como essa doença é comum no Brasil, fica explicado porque na semeadura convencional sua ocorrência é mais significativa. Mas não se pode esquecer o efeito da temperatura alta e da seca, que contribuem para aumentar o nível de infecção.

Perez-Bradán et al. (2012) utilizaram campo cultivado com soja, por 20 anos, para avaliar aspectos biológicos, químicos e físicos em diversos sistemas de preparo do solo sobre a incidência de *M. phaseolina*. Os sistemas de preparo do solo foram semeadura direta (SD), semeadura direta com escarificação (SE+E), cultivo mínimo (CM) e semeadura convencional (SC). Quanto aos aspectos biológicos, SD e SD+E apresentaram resultados significativamente superiores do que CM e SC, na análise de atividade microbiana. Na análise de diacetato de fluo-

resceína (FDA), SD foi superior aos demais. Na análise da atividade de desidrogenase, SD, SD+E e SC foram levemente superiores ao CM.

Um dos melhores trabalhos envolvendo *M. phaseolina* e sistemas de preparo do solo é o descrito por Wrather et al. (1998). Os autores utilizaram uma área com sistemas de semeadura direta e convencional, com soja contínua, estabelecidos há vários anos. As avaliações procuraram determinar, durante três safras de soja, o efeito do sistema de preparo de solo (semeadura direta, convencional com arado e convencional com aiveca) na severidade e na população de microesclerócios em duas profundidades do solo (0 cm a 7,5 cm; 7,5 cm a 15 cm). Não houve diferença quanto à população de microesclerócios em ambas as profundidades, para os sistemas convencional com arado de disco e convencional com aiveca. A maior concentração foi observada na profundidade de 0 cm a 7,5 cm, em solo sob semeadura direta. Os autores também não constataram associação entre a produtividade e a densidade de microesclerócios no solo, diferentemente do observado por Short et al. (1980).

Considerando o avanço da semeadura direta no Brasil e a falta de informações relacionadas à *M. phaseolina*, procurou-se avaliar a severidade da podridão de carvão em soja, cultivada nos sistemas convencional e direto (ALMEIDA et al., 2003). Todas as avaliações que compõem o presente estudo foram feitas em experimento instalado na Embrapa Soja, Londrina-PR (Tabela 2) com histórico de 17 anos de semeaduras direta e convencional, em solo oxisol, com 67% argila, 17% silte e 16% de areia, no horizonte Ap.

Tabela 2. Esquema de rotação/sucessão utilizado na Embrapa Soja nos sistemas de semeadura direta e convencional. Embrapa Soja, Londrina, PR.

Tratamento	1997		1998		1999		2000		2001	
	Inv	Ver								
Ad, S	TR	SJ								
Ad, R	TM	ML	AV	SJ	TR	SJ	TR	SJ	TM	ML
Di, S	TR	SJ								
Di, R	TM	ML	AV	SJ	TR	SJ	TR	SJ	TM	ML

Inv = inverno; Ver = verão; AV= aveia; ML= milho; SJ= soja; TM= tremoço; TR= trigo; Ad= arado de disco; Di= semeadura direta; S= sucessão; R= rotação. Fonte: Almeida et al., 2003.

A incidência de raízes infectadas foi determinada pela análise dos sistemas radiculares de plantas de soja cv. Embrapa 48, amostradas durante quatro anos (1997/2001) em áreas com semeaduras direta (SD) e convencional (SC). Cinco plantas foram retiradas, ao acaso, de cada parcela, totalizando 20 plantas por tratamento (sistemas convencional e direto). As raízes foram lavadas e secas à temperatura ambiente. De cada raiz retirou-se, aleatoriamente, quatro fragmentos (raiz principal e outras) os quais foram esterilizados em de hipoclorito de sódio (0,5%) por um minuto e depois lavados em água esterilizada. Os fragmentos foram plaqueados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) contendo 0,1 g L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. As placas foram incubadas a 26 °C no escuro e a avaliação feita sete dias após.

O número de plantas infectadas foi utilizado para determinação da incidência da doença, em cada época de amostragem e os mesmos dados, em porcentagem, utilizados para a obtenção da área abaixo da curva de progresso da doença, seguindo método descrito por Shaner e Finney (1977).

Em 1997/98 e 2000/01, a precipitação total entre a semeadura, em novembro, e a colheita, em março, foi de 876,3 mm e 846,9 mm, respectivamente, não havendo diferença significativa entre a incidência da doença na SD e na SC. Em 1998/99 e 1999/00, a precipitação observada foi de 689,9 mm e 478,3 mm, respectivamente. Em 1998/99 a incidência final nos sistemas de SD e SC foi de 43,7% e 53,1%, respectivamente. Em 1999/00, a incidência final foi de 68,7% e 81,2%, respectivamente.

Nessas duas safras, em anos considerados secos (precipitação pluviométrica <840 mm), as médias de incidência entre os dois sistemas de semeadura foram significativamente diferentes (P=0,05). A concentração de microesclerócios no solo, coletados à profundidade de 0-10 cm em SD e SC, mostrou resultados diferentes. Amostras de solo de SC

sempre apresentaram maior concentração de microesclerócios do que amostras de SD (P=0,05). No entanto, amostras de raízes não apresentaram a mesma resposta. Em anos secos, a concentração foi maior na soja do SC. Não houve diferença em anos com boa precipitação (Figura 9). Esse estudo mostra que a manutenção de umidade, favorecida pelo sistema de semeadura direta, pode reduzir o progresso da doença, favorecendo o manejo da doença.

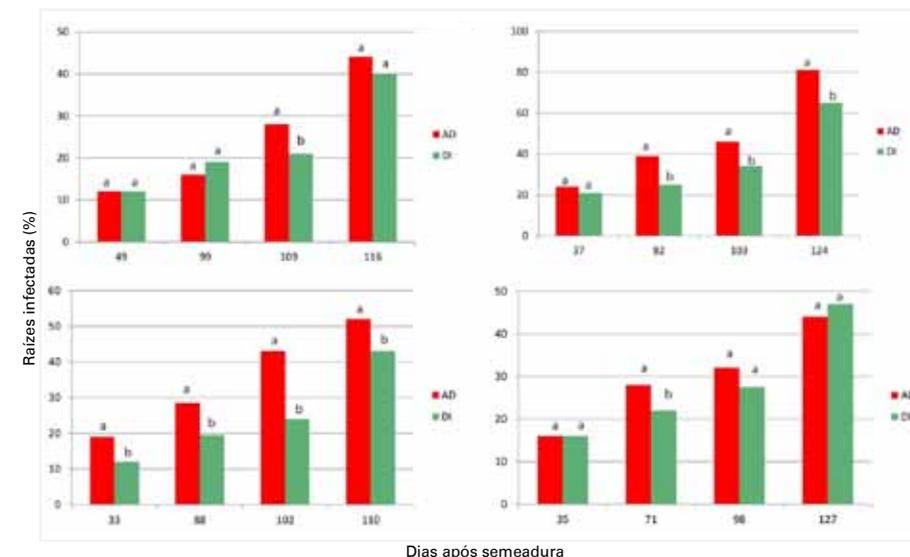


Figura 9. Efeito do sistema de semeadura (convencional e direta) sobre a porcentagem de raízes de soja cv. Embrapa 48 infectadas com *Macrophomina phaseolina*, avaliadas nos anos agrícolas 1997/01. Valores correspondem à média de 20 avaliações. Ad = sistema convencional; Di = sistema direto. A=1997/98 (876 mm chuva); B=1998/99 (689 mm chuva); C=1999/2000 (474 mm chuva); D=2000/01 (846 mm chuva).

A avaliação da intensidade de colonização das raízes foi feita através da contagem de microesclerócios formados. Isso foi determinado utilizando o restante do sistema radicular das plantas amostradas, que foi moído e uma amostra de 0,5 g foi misturada a 80 mL de meio específico segundo Mihail e Alcorn (1982), com posterior distribuição em cinco placas de Petri, que foram incubadas a 28 °C por nove dias. A contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) (Figura 10) foi feita sob microscópio estereoscópico.

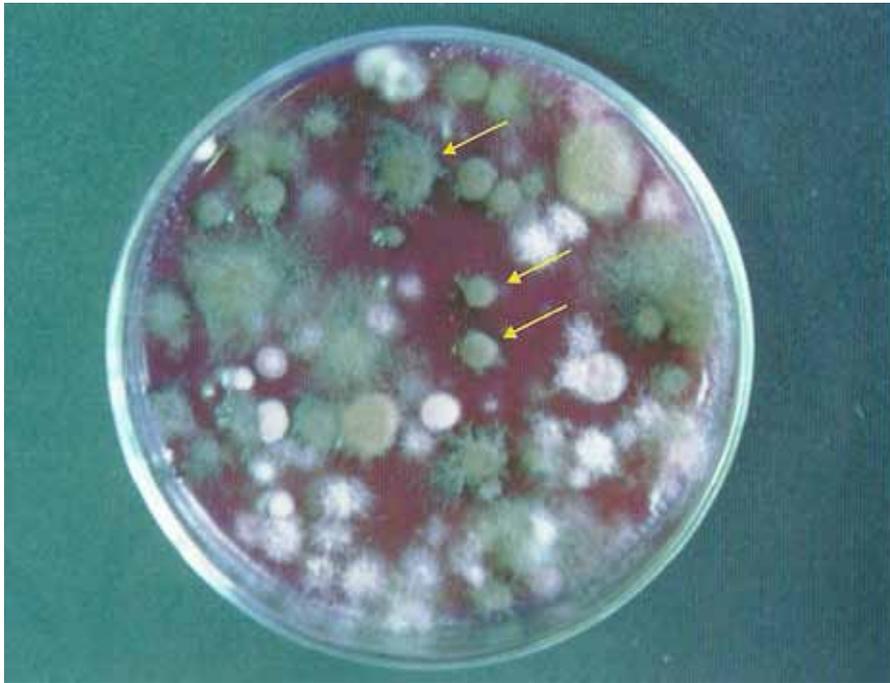


Figura 10. Desenvolvimento de *Macrophomina phaseolina* em meio específico, para determinação da população de microesclerócios em amostras de solo. Setas mostram colônias acinzentadas, típicas do fungo.

A mesma avaliação foi feita em amostras de solo, para verificar a distribuição espacial de microesclerócios. Dentro de uma área com semeadura direta e outra com semeadura convencional, com as plantas no estágio de enchimento de grãos (estádio R5 segundo Fehr et al., 1971), foram delimitados 16 quadrados contíguos, medindo 0,4 m de lado, cada um. Dentro de cada quadrado, coletaram-se cinco amostras de solo, utilizando trado com cinco centímetros de diâmetro, na profundidade de 0-10 cm. As amostras, dentro de cada parcela, foram misturadas. De cada amostra composta, retiraram-se 5 g de solo peneirado em malha com dois milímetros de abertura, lavado em solução de hipoclorito de sódio e misturado a meio específico de Mihail e Alcorn (1982), para determinação da concentração de microesclerócios.

Os dados foram utilizados no programa Statistica versão 5.1 (Stat-SoftInc., Tulsa, OK, EUA) para determinação do gráfico de distribuição

espacial. O gráfico foi estimado a partir das coordenadas de X e Y, de acordo com o método "Distance-weighted least squares", com o ajuste da curva dos dados através de regressão polinomial de 2ª ordem, gerada pelo programa.

A infecção de raízes de soja por *Macrophomina phaseolina* ocorreu em ambos os sistemas de semeadura, em todos os anos do estudo. No entanto, pôde-se constatar que, em dois anos, houve maior severidade da doença nas parcelas com sistema de semeadura convencional (Figura 9, B e C). Em geral, a infecção aumentou ao longo do ciclo da cultura. A doença foi mais evidente nas raízes coletadas no final de ciclo, mostrando coloração marrom escura do sistema vascular. Em raros casos, observaram-se ramos secos, caídos e aderidos às plantas, sintoma tradicionalmente visto nessa doença.

A análise da epidemia da doença, avaliada durante quatro anos agrícolas (1997/2001) através da medição da área abaixo da curva de progresso da doença, foi significativa apenas nos anos de 1998/99 e 1999/00 (Tabela 3). Esses dois anos foram considerados secos, o total de chuva, no ciclo da cultura, foi menor do que 840 mm, citado por Berlato e Bergamaschi (1979) como ideal para essa cultura nas condições brasileiras.

Tabela 3. Área abaixo da curva de progresso da doença, determinada pela porcentagem de raízes de soja cv. Embrapa 48 infectadas por *Macrophomina phaseolina*. Plantas coletadas nos sistema de semeadura convencional e direta. Volume de chuva refere-se ao período de novembro a março de cada ano agrícola. Embrapa Soja, Londrina, PR.

Ano	Convencional	Direta	Chuva (mm)
1997/98	935,94* a	940,63 a	876,3
1998/99	1118,75 a	850,00 b	689,9
1999/00	2189,06 a	1764,06 b	474,3
2000/01	1637,50 a	1518,75 a	846,9

* Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A análise do número de microesclerócios formados nas raízes constitui outro parâmetro de avaliação para o efeito do sistema de semeadura e umidade do solo, na severidade da doença.

Embora avaliada em apenas um ano, constatou-se maior número de microesclerócios nas raízes retiradas do sistema de semeadura convencional. Também ficou evidente o efeito de ano. A densidade de microesclerócios, formados nas raízes das plantas amostradas, mostrou que, dependendo do ano, há diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tabela 4). Esse fato necessita de maior número de anos para confirmação dos resultados obtidos. Nos mesmos anos, a população de microesclerócios foi maior no sistema convencional.

Tabela 4. Densidade de microesclerócios de *Macrophomina phaseolina* em amostras de solo e raízes, coletadas nas parcelas com sistema de semeadura direta e convencional. Embrapa Soja, Londrina, PR.

Semeadura	Densidade de microesclerócios		Severidade (% raízes infectadas)	
	1999/2000	2000/2001	1999/2000	2000/2001
Raiz ¹				
Direta	149,0*b	138,9 b	68,75 b	46,88 a
Convencional	290,3 a	183,5 a	81,25 a	43,75 a
Solo ²				
Direta	26,4 a	73,8 a		
Convencional	27,2 a	59,5 b		

¹CFUg⁻¹, avaliados em 0,25 g de raízes moidas.

²CFUg⁻¹ solo, avaliados em 5 g solo.

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados estão de acordo com observações de Kendig et al. (2000) que detectaram menor infecção em plantas de soja irrigadas. Os resultados mostraram que a umidade do solo tem efeito significativo na infecção das raízes de soja e indica que infecções precoces acontecem com maior intensidade em solos com baixa umidade.

Outra avaliação desse trabalho foi a determinação da concentração de microesclerócios no solo. Foram constatadas diferenças entre os anos e entre os tratamentos. As maiores concentrações foram detectadas no sistema convencional. No ano 2000/01 a concentração de microesclerócios foi maior do que no ano de 1999/00. Entretanto, esse fato não se relacionou à infecção. Esse dado, difere da observação

de Short et al.(1980), mas está de acordo com Wrather et al.(1998). No trabalho de Zambolim et al. (1983), os autores constataram que houve aumento na porcentagem de raízes de soja infectadas por *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani* quando houve aumento do inóculo no solo. Estudos adicionais poderão esclarecer essa observação, visto que Bruton et al. (1987), trabalhando com cantaloupe (espécie de melão) não detectou correlação entre o número de microesclerócios e o número de plantas infectadas. Com relação ao aumento do número de microesclerócios, os dados obtidos confirmam importante relato de Dhingra e Sinclair (1978) os quais determinaram que o cultivo de soja e milho aumentaram a quantidade de microesclerócios no solo.

Um fato interessante, determinado nesse estudo, foi a presença de *M. phaseolina* em solo de mata, sem histórico de cultivo anterior e também em solo cultivado com café. Embora encontrado em baixíssima concentração, essa presença demonstra ser o patógeno nativo do solo e cuja população deve ter aumentado após a introdução de culturas anuais ou perenes (Tabela 5). Nesse mesmo estudo, as parcelas em sistema convencional apresentavam maior densidade de microesclerócios do que em sistema de semeadura direta.

Os dados desse estudo permitem concluir que no período estudado e nas condições climáticas da região de Londrina, o sistema de semeadura convencional promoveu maior infecção de raízes de soja por *M. phaseolina*, embora não tenham sido observadas diferenças em rendimento.

Como houve variação entre os anos do estudo e a severidade foi maior em anos secos, acredita-se que a umidade seja mais importante do que a temperatura, para que esse patossistema tenha maior sucesso. Isso pode ser observado pela leitura da temperatura na superfície do solo, nas parcelas com semeadura direta e convencional. A temperatura da superfície do solo foi levemente mais alta no sistema convencional, enquanto que a refletância foi maior no solo com semeadura direta (Tabela 6).

Tabela 5. Distribuição espacial de microesclerócios em amostras de solo retiradas de um grid 4 x 4, com cada quadrado medindo 0,4 m x 0,4 m, em seis locais diferentes. Embrapa Soja, Londrina, PR.

Quadrado	Número de esclerócios					
	SD-LDB*	SC-LDB	SD-CM	SC-CM	Café	Mata
1	8,16	5,20	77,59	68,96	0,42	0,00
2	3,04	8,25	56,00	66,78	0,79	0,00
3	10,11	10,88	84,83	43,46	0,00	0,76
4	10,40	6,12	86,28	60,77	0,58	0,00
5	0,42	10,75	72,40	56,75	0,00	0,00
6	6,26	13,41	88,28	69,93	0,79	0,26
7	3,68	10,86	90,34	67,52	0,58	0,00
8	7,49	17,67	90,14	104,86	0,00	0,25
9	7,66	34,53	83,21	53,44	0,35	0,00
10	10,55	16,58	77,05	69,73		0,00
11	13,47	11,53	78,08	68,73		0,00
12	14,74	18,40	84,40	79,33		0,64
13	4,61	19,54	80,70	98,06		1,17
14	4,95	13,54	76,34	64,20		0,26
15	5,66	14,38	59,99	51,84		0,51
16	15,11	16,56	72,14	68,52		0,77
Média	7,89	14,25	68,52	61,28		0,29

*SD-LDB= semeadura direta, Londrina;

SC-LDB= semeadura convencional, Londrina;

SD-CM= semeadura direta, Campo Mourão;

SC-CM= semeadura convencional, Campo Mourão.

Tabela 6. Temperatura (°C) da superfície do solo e albedo, medidas nos sistemas de semeadura convencional e direta. Embrapa Soja, Londrina, PR.

Sistema	Data	Temperatura da superfície do solo (°C)	Albedo (%)
Convencional	12/11/98	74,71± 2,35	10,6
Direto	12/11/98	70,17± 5,00	17,1
Convencional	30/11/99	58,54± 2,37	11,8
Direto	30/11/99	53,21± 2,62	17,9

*Albedo = razão entre radiação refletida e radiação incidente x 100.

A avaliação da distribuição de microesclerócios no solo, nos dois sistemas de semeadura, mostra que em ambos os sistemas, tanto em Londrina quanto em Campo Mourão, os microesclerócios são distribuídos irregularmente, embora a maior média de microesclerócios, por grama de solo seco, fosse observada nas amostras do solo retirada de semeadura

convencional. Em nenhum dos dois locais analisados há uniformidade na distribuição. A demonstração dessa desuniformidade na distribuição dos microesclerócios no solo pode ser observada na Figura 11.

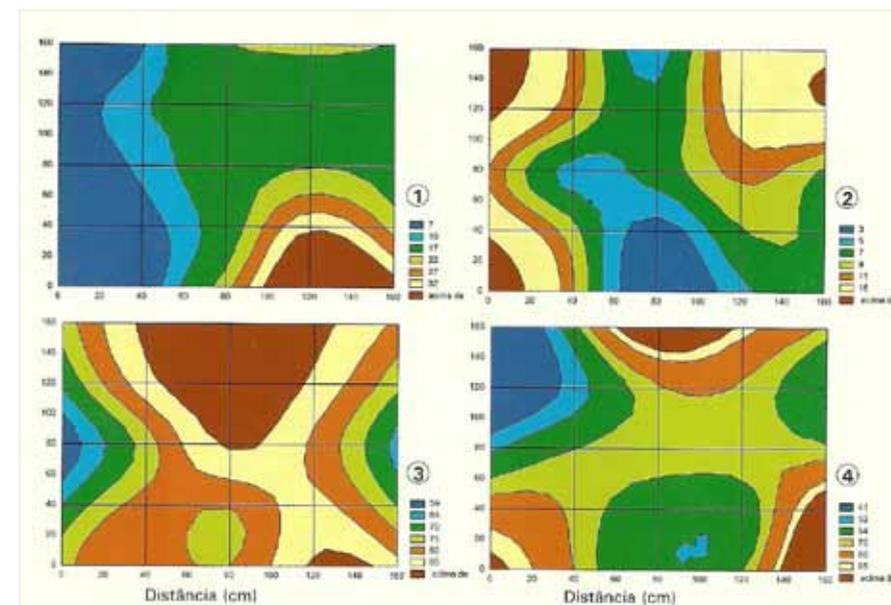


Figura 11. Distribuição espacial de microesclerócios de *Macrophomina phaseolina*, em amostras de solo com semeadura direta (1 e 3) e convencional (2 e 4), coletadas em quadrados vizinhos com área de 0,016 m (0,4 m x 0,4 m), nos municípios de Campo Mourão (1 e 2) e Londrina (3 e 4). As médias de microesclerócios por grama de solo seco em cada área de 2,56 m são: área 1=7,9; 2=14,3; 3=68,3 e, 4=79,3.

Concluindo, *Macrophomina phaseolina* é naturalmente encontrado no solo, podendo ser identificado em amostras de solo de mata virgem, sem histórico de cultivo de plantas. Em áreas cultivadas, os microesclerócios são distribuídos irregularmente, havendo claramente manchas de solo com maior concentração.

A infecção das raízes de soja pelo fungo, sob condições de deficit hídrico, foi mais favorecida sob semeadura convencional. E, a distribuição espacial de microesclerócios é maior no solo, também sob semeadura convencional. A temperatura da superfície do solo sob plantio direto foi mais baixa podendo explicar o menor deficit hídrico.

6. Resistência genética

O controle de doenças pode envolver uma ou várias estratégias. Uma dessas estratégias é o uso de cultivares resistentes. Mas, para essa doença, não há nenhuma cultivar resistente disponível no mercado.

Pearson et al. (1984) encontraram diferenças na taxa de colonização das raízes entre nove cultivares avaliadas, sendo que as cultivares Bay, Essex, Forrest [grupo de maturidade relativa V (EUA)] e Sprite [grupo de maturidade relativa III (EUA)] apresentaram as menores taxas. Bristol e Wyllie (1984) avaliando e ranqueando 14 cultivares quanto à altura de planta, ao volume e ao peso de raiz e ao peso da parte aérea, apontaram a cultivar Dunfield como a menos afetada por *M. phaseolina*. Smith e Carvil (1997) avaliaram 24 genótipos quanto à colonização do colo e da raiz por *M. phaseolina* e rendimento, apontando como moderadamente resistentes (MR) as cultivares Asgrow 4715, Delta Pineland 3478, Hamilton e Jackson II. A linhagem DT97-4290 foi a primeira a ser registrada como MR ao fungo (PARIS et al., 2006).

Mengistu et al. (2007) testaram cinco métodos de avaliação para resistência a *M. phaseolina*, empregando 24 genótipos. Apontaram como melhores, três métodos: o índice de unidades formadoras de colônia (IUF) [unidades formadoras de colônias (UFC) de um determinado genótipo dividido pelo UFC do genótipo suscetível mais suscetível no teste], a intensidade de descoloração do tecido vascular e cortical e a intensidade de microesclerócios, que eles denominaram severidade na raiz e no caule (SRC). O IUF é mais trabalhoso, porém mais acurado que o SRC e a intensidade de descoloração do tecido vascular e cortical. Baseados no IUF os autores indicaram como MR os genótipos DT99-16864, DT99-17483 e, DT99-17554. E quando baseados na SRC mais quatro genótipos foram considerados MR: DT98-7553, STALWART, MD98-6491 e N98-7265.

Quanto ao método de avaliação, a correlação encontrada por Mengistu et al. (2011) foi mais consistente entre os métodos IUF e SRC ($r=0,71$

e $r=0,69$) durante os anos de 2002 e 2003, respectivamente. Entre os dois métodos, a Embrapa Soja tem optado pela contagem de UFC (ALMEIDA et al, 2008). Smith e Carvil (1997) já haviam concluído que esse era o melhor método, embora, mais trabalhoso. Propõe-se numa primeira avaliação utilizar a intensidade de descoloração do tecido vascular e cortical e após se ter os resultados, efetuar o IUF dos melhores genótipos.

Mengistu et al. (2011), usando como padrão a linhagem DT97-4290, avaliaram 149 genótipos de diferentes grupos de maturidade relativa e, levando em conta os três anos (2006, 2007 e 2008) de avaliação, confirmaram os genótipos, do grupo de maturidade relativa V (EUA), DT99-16864, DT99-17483 e DT99-17554 como MR, e apontaram outros três cultivares: DG3950 [grupo de maturidade relativa III (EUA)], Manokin [grupo de maturidade relativa IV (EUA)] e DT98-7553 [grupo de maturidade relativa V (EUA)]. Esse último havia sido considerado MR na avaliação da SRC no trabalho de Mengistu et al. (2007). Mengistu et al. (2013) também avaliaram 628 materiais comparando com o padrão MR DT97-4290. Os autores apontaram quatro genótipos com menor nível de infecção por *M. phaseolina* do que o padrão: PI594302, PI567562A, PI506764 e PI 567334.

Todos esses genótipos que apresentam menor nível de infecção ou foram considerados MR podem ser utilizados em programas de melhoramento visando à obtenção de cultivares que resistam, mesmo que parcialmente, a infecção por esse patógeno, reduzindo a possibilidade de perda pela doença.

Plantas de soja quando infectadas por *M. phaseolina* produzem a fitoalexina gliceolina, um dos compostos que poderiam restringir o desenvolvimento do fungo, conferindo assim, resistência às plantas (LYGGIN et al., 2010). A rápida biossíntese de gliceolina durante a infecção poderia ser um mecanismo de resistência ao patógeno. Essa característica poderia ser explorada em programas de melhoramento genético e/ou em projetos de obtenção de plantas transgênicas.

Conclusão

Macrophomina phaseolina é um fungo difícil de manejar, mas práticas que melhoram as condições físicas do solo e o uso de cultivares com maior tolerância à seca e/ou temperaturas altas contribuem para a manutenção em níveis baixos de incidência e severidade da podridão de carvão.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos a Silvana R. R. Marin, Luís Carlos Benato e Nilson Valentin pela coleta e pelo processamento das amostras. Agradecemos também ao Dr. Adônis Moreira pela confecção dos gráficos das figuras 2, 3 e 9.

Referências

- ALMEIDA, A.M.R.; ABDELNOOR, R.V. Variabilidade genética de isolados de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., coletados em diferentes regiões do Brasil. In: ENCONTRO PARANAENSE DE BIOTECNOLOGIA APLICADA A AGROPECUARIA, 1., 1985, Londrina. **Palestras e resumos...** Londrina: Embrapa Soja: IAPAR : UEL, 1998. p. 97.
- ALMEIDA, A.M.R.; SARAIVA, O.F.; FARIAS, J.R.B.; GAUDÊNCIO, C.A.; TORRES, E. Survival of pathogens on soybean debris under no tillage and conventional tillage systems. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1231-1238, 2001.
- ALMEIDA, A.M.R.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; TORRES, E.; FARIAS, J.R.B.; BENATO, L.C.; PINTO, M.C.; VALENTIM, N. Progress of soybean Charcoal rot under tillage and no-tillage systems in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 131-135, 2003.
- ALMEIDA, A.M.R.; SOSA-GOMEZ, D.R.; BINNECK E.; MARIN, S.R.R.; ZUCCHI, M.I.; ABDELNOOR, R.V.; SOUTO, E.R. Effect of crop rotation on specialization and genetic diversity of *Macrophomina phaseolina*. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 257-264, 2008.
- ANDRUS, C.F. Seed transmission of *Macrophomina phaseoli*. **Phytopathology**, v. 28, p. 620-634, 1938.
- BAIRD, R.E.; WATSON, C.E.; SCUGGS, M. Relative longevity of *Macrophomina phaeolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. **Plant Disease**, v. 87, p. 563-566, 2003.
- BAIRD, R.E.; WADL, P.A.; WANG, X. Microsatellites from the charcoal rot fungus *Macrophomina phaseolina*. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 946-948, 2009.
- 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.
- BERLATO, M.A.; BERGAMASCHI, H. Water consumption by soybeans: I- Seasonal evapotranspiration in conditions of optimal water availability in soil. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 1., 1979, Londrina. **Anais...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1979. p. 53-58.
- BITANCOURT, A.A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, v. 1, n. 2, p. 41, fev, 1935.
- BLANCO-LOPEZ, M.A.; JIMENEZ-DIAZ, R.M. Effect of irrigation on susceptibility of sunflower to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 67, p. 1214-1238, 1983.
- BRUTON, B.D.; JEGER, M.J.; REUVENI, R.M. *Macrophomina phaseolina* infection and vine decline in cantaloupe in relation to planting date, soil environment, and plant interaction. **Plant Disease**, v. 71, n. 3, p. 259-263, 1987.
- CANADAY, C.H., HELSEL, D.G., WYLLIE, T.D. Effects of herbicide-induced stress on root colonization of soybeans by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 70, p. 863-866, 1986.
- CLOUD, G.L.; RUPE, J.C. Morphological instability on a chlorate medium of isolates of *Macrophomina phaseolina* from soybean and sorghum. **Phytopathology**, v. 81, n. 8, p. 892-895, 1991.
- COOK, G.E.; BOOSALIS, M.G.; DUNKLE, L.D.; ODOVODY, G.N. Survival of *Macrophomina phaseolina* in corn and sorghum stalk residue. **Plant Disease Report**, v. 57, p. 873-875, 1973.
- DAS, I.K., FAKHRUDDIN, B., ARORA, D.K. RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity. **Microbiological Research**, v. 163, p. 215-224, 2008.

- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*.** Viçosa: UFV, 1978. 166 p.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: effects of soil moisture, carbon:nitrogen ratios, carbon sources, and nitrogen concentrations. **Phytopathology**, v. 65, p. 236-240, 1975.
- 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.
- EL-BAROUGY, AWAD, N.M., TURKY, A.S., HAMED, H.A. Antagonistic activity of selected strains of rhizobacteria against *Macrophomina phaseolina* of soybean plants. **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science**, v. 5, p. 337-347, 2009.
- FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E.; BURNWOOD, D.T.; PENNINGTON, J.S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merr. **Crop Science**, v. 11, p. 929-931, 1971.
- FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. **Doenças da soja no Brasil.** Londrina: EMBRAPA.CNPSO, 1979. 42 p.(EMBRAPA. CNPSO. Circular técnica,1).
- FEBRAPDP. **Evolução da área cultivada no sistema de plantio direto na palha – Brasil.** Disponível em: <http://www.febrapdp.org.br/download/PD_Brasil_2013.l.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2013.
- FIGUEIREDO, M.B.; TERANISHI, J.; CARDOSO, E.R.M.G. Incidência de *Macrophomina phaseolina* em feijoeiro e outras plantas cultivadas. **O Biológico**, São Paulo, v. 35, p. 105-109, 1969.
- FUHLBOHM, M. Genotypic diversity among Australian isolates of *Macrophomina phaseolina*. In: BIENNAL AUSTRALIAN PLANT

PATHOLOGY SOCIETY CONFERENCE, 20., 1997. [Abstracts...][S.I.]: Lincoln University, 1997. p. 52.

GANGOPADHYAY, S.; WYLLIE, T.D.; TEAGUE, W.R. Effect of bulk density and moisture content of soil on the survival of *Macrophomina phaseolina*. **Plant and Soil**, v. 68, p. 241-247, 1982.

GHAFFAR, A.; ZENTMYER, G.A. *Macrophomina phaseolina* on some new weed hosts in California. **Plant Disease Reporter**, v. 52, p. 223, 1968.

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.

GOIDANISH, G. Revisione del genere *Macrophomina* Petrak. Species tipica: *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. nov. comb. nec. *M. phaseoli* (Maubl.) Ashby. **Annalidella Sperimentazione Agraria**, v. 1, p. 449-461, 1947.

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.

HARLTON, C.E.; LÉVESQUE, C.A.; PUNJA, Z.K. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. **Phytopathology**, v. 85, n. 10, p. 1269-1281, 1995.

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

HOLLIDAY, P.; PUNITHALINGAN, E. *Macrophomina phaseolina*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, n. 275, 1970. 2 p.

JANA, T., SHARMA, T.R., SINGH, N.K. SSR-based detection of genetic variability in the genetic variability pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Mycological Research**, v. 108, p. 81-86, 2005.

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.

KNOX-DAVIES, P.S. Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. **American Journal of Botany**, v. 54, p. 1290-1295, 1967.

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

LEHMAN, P.S.; MACHADO, C.C.; TARRAGO, M.T. Frequência e severidade de doenças da soja nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 183-193, 1976.

LYGIN, A.V.; HILL, C.B.; ZEMOVA, O.V.; CRULL, L.; WIDHOLM, J.M.; HARTMAN, G.L.; LOZOVAYA, V.C. Response of soybean pathogen to glyceollin. **Phytopathology**, v. 100, p. 897-903, 2010.

LUTRELL, E.S. A pycnidial strain of *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 36, n. 11, p. 978-980, 1946.

LUDLOW, M.M.; MUCHOW, R.C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. **Advances in Agronomy**, v. 43, p. 107-153, 1990.

MACHADO, C.C. *Macrophomina phaseolina*: biological behavior of isolates, spatial pattern of microsclerotia in the soil, and incidence on soybeans. 1987. 195 f. Thesis (PhD) - University of Illinois, Urbana Champaign.

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.

MANICI, L.M.; CAPUTO, F.; CERATO, C. Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climatic regions of sunflower production in Italy. **Plant Disease**, v. 79, n. 8, p. 834-838, 1995.

MENDES, H.C.; RIBEIRO, I.J.; CIA, E.; ABRAHÃO, J. Estiolamento do algodoeiro causado por *Macrophomina phaseolina*. **Bragantia**, v. 30, n. 1, p. 43-48, 1971.

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. Disponível em: <http://eppserver.ag.utk.edu/personnel/Canaday/Evaluation_of_Soybean_Genotypes_for_Resistance_to_Charcoal_Rot.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2013.

MENGISTU, A.; ARELLI, P.; BOND, J.P.; NELSON, R.; RUPE, J.B.; SHANNON, G.J.; WRATHER, A.J. Identification of soybean accessions resistant to *Macrophomina phaseolina* by field screening and laboratory validation. **Plant Management Network**, mar. 2013. Plant Health Progress. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/php/elements/sum2.aspx?id=10618>>. Acesso em: 19 nov. 2013.

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

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

MIHAIL, J.D.; ALCORN, S.M. Quantitative recovery of *Macrophomina phaseolina* sclerotia from soil. **Plant Disease**, v. 66, n. 8, p. 662-663, 1982.

MIHAIL, J.D.; ALCORN, S.M. *Macrophomina phaseolina*: spatial patterns in a cultivated soil and sampling strategies. **Phytopathology**, v. 77, p. 1126-1131, 1987.

MYCOBANK. *Macrophomina phaseolina*. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank>>. Acesso em: 01 ago. 2013.

OLANYA, O.M.; CAMPBELL, C.L. Effects of tillage on the spatial pattern of microsclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 78, n. 2, p. 217-221, 1988.

OLAYA, G.; ABAWI, G.S. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 80, n. 12, p.1347-1350, 1996a.

OLAYA, G.; ABAWI, G.S. Influence of water on survival of sclerotia in soil and on colonization of bean stem segments by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 80, n. 12, p. 1351-1354, 1996b.

PAL, K.K.; TILAK, K.V.; SAXENA, A.K.; DEY, R.; SINGH, C.S. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 156, n. 33, p. 209-223, 2001.

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

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

PEARSON, C.A.; LESLIE, S.; SCWENK, F.W. Nitrogen source utilization by chlorate-resistant and chlorate-sensitive isolates of *Macrophomina phaseolina*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, p. 497-502, 1987b.

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

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

PEREZ-BRADÁN, C.; ARZENO, J.L.; HUIDOBRO, J.; GRÜMBERG, B.; CONFORTO, C.; HILTON, S.; BENDING, G.D.; MERILES, J.M.; VARGAS-GIL, S. Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of Charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. **Crop Protection**, v. 40, p. 73-82, 2012.

SARAIVA, O.F.; TORRES, E. Manejo dos resíduos da colheita, condicionado por sistemas de preparo do solo. In: EMBRAPA SOJA. **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja 1999**. Londrina, 2000. p.103-104.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

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

SINCLAIR, J.B.; GRAY, L.E. Three fungi that can reduce soybean yields. **Illinois Research**, v. 14, p. 5, 1972.

SINGH, S.K.; NENE, Y.L.; REDDY, M.V. Influence of cropping systems on *Macrophomina phaseolina* populations in soil. **Plant Disease**, v. 74, n. 10, p. 812-814, 1990.

SMITH, G.S.; CARVIL, O.N. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 81, n. 4, p. 363-368, 1997.

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

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W.R. Freeman, 1973. 573 p.

SONGA, W.; HILLOCKS, R.J. Legume host of *Macrophomina phaseolina* in Kenya and effect of crop species on soil inoculum levels. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 387-391, 1996.

SU, G.; SUH, S.O.; SCHNEIDER, R.W.; RUSSIN, J.S. Host specialization in the Charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 91, p.120-126, 2001.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

VILICH, V. Crop rotation with pure stands and mixtures of barley and wheat to control stem and root diseases. **Crop Protection**, v. 12, p. 373-379, 1993.

VIANA, F.M.P.; SOUZA, N.L. Efeito da temperatura e da tensão de água do substrato na germinação de microesclerócios de *Macrophomina phaseolina*. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 236-239, 1997.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 86, p. 497-504, 1990.

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.; KENDIG, S.R.; TYLER, D.D. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. **Plant Disease**, v. 82, n. 2, p. 247-250, 1998.

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. Disponível em: <<http://naldc.nal.usda.gov/download/21179/PDF>>. Acesso em: 22 nov. 2013.

WYLLIE, T.D. Worst soybean disease. **Crop and Soils Magazine**, v. 27, p. 10-11. 1974.

WYLLIE, T.D. Charcoal rot of soybean current status. In: WYLLIE, T.D.; SCOTT, D.H., (Ed.). **Soybean diseases of the North Central Region**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1988. p.106-103.

WYLLIE, T.D.; GANGOPADHYAY, S.; TEAGUE, W.R.; BLANCHARD, R.W. Germination and production of *Macrophomina phaseolina* microsclerotia as affected by oxygen and carbon dioxide concentration. **Plant and Soil**, v. 81, p.195-201, 1984.

YAP, I.; NELSON, R.J. **Winboot**: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. Manila: International Rice Research Institute, 1996. 32 p. (IRRI. Discussion Paper Series, 14).

YOUNG, P.A. Charcoal rot of plants in east Texas. **Texas Agricultural Experiment Station**. Bulletin, v. 712, p. 1-33, 1949. (College Station).

ZAMBOLIM, L.; SCHENCK, N.C.; MITCHELL, D.J. Inoculum density, pathogenicity, and interactions of soybean root-infecting fungi. **Phytopathology**, v. 73, n. 10, p. 1398-140, 1983.

ZVEIBIL, A.; MOR, N.; GNAYEM, N. Survival, host-pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. **Phytopathology**, v. 96, p. 265-272, 2012.

