

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Comparação de métodos de fenotipagem em soja e variabilidade
genética de *Macrophomina phaseolina***

Francine Talia Panisson

Passo Fundo

2019

Francine Talia Panisson

Comparação de métodos de fenotipagem em soja e variabilidade genética de
Macrophomina phaseolina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestrado em Agronomia.

Orientador:
Dra. Carolina Cardoso Deuner

Passo Fundo

2019

CIP – Catalogação na Publicação

P192c Panisson, Francine Talia

Comparação de métodos de fenotipagem em soja e variabilidade genética de *Macrophomina phaseolina* / Francine Talia Panisson. – 2019.

92 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cardoso Deuner.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Soja - Variedades.
I. Deuner, Carolina Cardoso, orientadora. II. Título.

CDU: 633.34

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues – CRB 10/1569

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

**“Comparação de métodos de fenotipagem em soja e variabilidade genética
de *Macrophomina phaseolina*”**

Elaborada por

Francine Talia Panisson

**Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas**

**Aprovada em: 28/01/2019
Pela Comissão Examinadora**



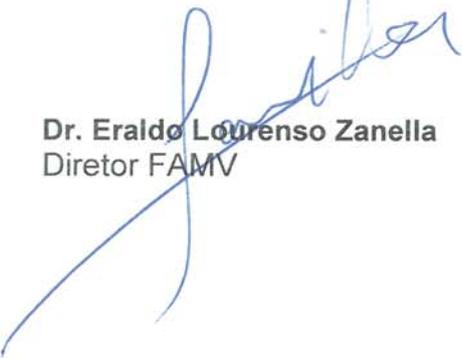
Dra. Carolina Cardoso Deuner
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora



Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia



Dra. Francismar Correa Marcelino Guimarães
Embrapa Soja



Dr. Eraldo Lourenso Zanella
Diretor FAMV



Dra. Claudine Dinali Santos Seixas
Embrapa Soja

DEDICATÓRIA

A Deus por estar sempre comigo, iluminando e guiando meu caminho. Agradeço também por Ele ter colocado pessoas tão especiais a meu lado.

Aos meus pais Eliza e Taylur, pelo amor incondicional, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

À Embrapa Trigo, pela oportunidade e por todo o apoio científico.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro e científico.

À minha orientadora, Carolina Cardoso Deuner, pela sua orientação, confiança, oportunidade, e pelos ensinamentos.

À pesquisadora, Leila Maria Costamilan, por colaborar no desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio e conhecimentos passados, principalmente pela ajuda e confiança depositada em mim na execução do trabalho, que me serviram para crescer como profissional e também como pessoa;

Ao meu tio Altair pela ajuda e pelo carinho.

Aos meus padrinhos, João, Laine, Joãozinho e Clarice, pelo carinho e incentivo.

A minha amiga, Suelen Pieta, com quem posso contar todo o tempo.

Aos docentes de toda a minha trajetória escolar, do Instituto Federal do Paraná, campus Palmas, e da UPF que contribuíram para que eu adquirisse valiosos conhecimentos.

A equipe do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo, Cláudia, Ervino, Cleverton, Jorge, Volmar e Carlos pelos momentos de amizade, companheirismo, ideias, disposição e colaboração nas atividades desenvolvidas.

A equipe do laboratório de biotecnologia da Embrapa Trigo, especialmente Ana Lídia e Jordalan, pela importante colaboração nas atividades no laboratório de biotecnologia;

A equipe do laboratório de biotecnologia da Universidade Estadual do Norte do Paraná, especialmente aos professores Sandremir e Mayra, a Fernanda e aos estagiários pelos ensinamentos, pela amizade e por terem me acolhido com muito carinho.

À pesquisadora da Embrapa Soja, Francismar Corrêa Marcelino-Guimaraes, pela colaboração nas atividades moleculares.

Às pesquisadoras Claudine Dinali Santos Seixas (Embrapa Soja) e Adriane Wendland Ferreira (Embrapa Arroz e Feijão) pela cedência dos isolados.

As amigadas que o Programa de Pós-graduação me proporcionou, especialmente, a Patrícia Frizon.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

EPIGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que eu era antes.”

Marthin Luther King

RESUMO

PANISSON, Francine Talia. **Comparação de métodos de fenotipagem em soja e variabilidade genética de *Macrophomina phaseolina***. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

A podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, é uma doença radicial importante na cultura da soja, sendo favorecida por déficit hídrico e temperaturas altas. O uso de cultivares resistentes representa um pilar para o manejo de doenças, por ser uma das alternativas mais eficientes, mas ainda não foi identificada resistência genética completa ao patógeno em cultivares comerciais brasileiras de soja ao patógeno. A seleção de materiais com resistência pode fornecer fontes úteis para programas de melhoramento genético de soja. Este trabalho teve por finalidades, a) avaliar técnicas de fenotipagem em soja à podridão de carvão; e b) avaliar a variabilidade genética de *M. phaseolina*. No capítulo I, 23 isolados do fungo foram inoculados em três cultivares de soja, pela técnica da haste cortada. Após, dois isolados selecionados foram inoculados em 20 cultivares de soja pelas técnicas de inoculação haste cortada, camada de areia, camada de micélio e inóculo agregado ao solo. Esses dois isolados também foram inoculados, pela técnica da haste cortada, em doze genótipos de soja, sendo 11 genótipos classificados como moderadamente resistentes e um suscetível ao fungo. Com a técnica de inoculação da haste cortada, foi avaliado o comprimento de tecido necrosado na haste das plantas, calculando-se a área relativa abaixo da curva de progresso da doença (ARACPD). Nas demais técnicas de inoculação, foram isolados cinco fragmentos da raiz, da raiz principal e do colo das plantas, avaliando-se a intensidade da doença pela incidência de microescleródios e pela severidade (fragmentos com microescleródios). As análises foram realizadas utilizando-se o software R, e teste de médias por Scott-Knott, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Houve diferença de agressividade entre isolados de *M. phaseolina*, sendo os isolados CMES 1169 e Mp CX os mais agressivos, possibilitando a incorporação destes em estudos da resistência de genótipos de soja ao fungo. As cultivares de soja apresentaram reação distinta de severidade à podridão de carvão pela técnica de inoculação da camada de areia e da haste cortada, sendo esta última técnica de inoculação eficiente para seleção de fontes úteis para o desenvolvimento de genótipos de soja com maiores níveis de resistência à podridão de carvão, pela rapidez de resposta e pela facilidade de execução. As cultivares de soja TMG 7062 e V-Max e os genótipos de soja DT97-4290, Spencer e PI 567334 apresentaram consistentemente menor ARACPD pela técnica da haste cortada, sendo que esses materiais podem ser incluídos em programas de melhoramento para resistência à podridão de carvão de soja. No capítulo II, a variabilidade genética de 23 isolados de *M. phaseolina* foi caracterizada pelo marcador molecular polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de poli-acrilamida a 7% e traduzidos em dados binários, indicando presença (1) ou ausência (0). A análise do agrupamento dos indivíduos foi realizada pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) e a distância genética pelo coeficiente de Jaccard, considerando variação genética dentro e entre as populações a partir de diferentes hospedeiros, origem geográfica (Estado do Brasil) e ano de coleta dos isolados. A análise da variabilidade genética evidenciou alta variabilidade entre os isolados de *M. phaseolina*, com relação ao hospedeiro, à origem geográfica e ao ano de coleta. Os resultados indicaram perspectiva para estudos da reação de

genótipos de soja ao patógeno e para identificação de genes que confirmam resistência, com possibilidade de incorporação em genótipos de soja de interesse.

Palavras-chave: 1. *Glycine max*. 2. Podridão de carvão. 3. Variabilidade genética. 4. Técnica de inoculação. 5. AFLP.

ABSTRACT

PANISSON, Francine Talia. **Comparison of phenotyping methods in soybean and genetic variability of *Macrophomina phaseolina***. 92 f. Thesis (Master in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

Charcoal rot, caused by *Macrophomina phaseolina*, is a radical and important disease in soybean cultures, associated with droughts and high temperatures. The use of resistant cultivars is of utmost importance to deal with diseases, as a total genetic resistance to the pathogen, in Brazilian soybean cultivars, was still not identified. A resistant material selection can supply useful sources for programs to improve soybean breeding. This work aims to a) evaluate phenotyping methods in soybean to eliminate charcoal rot; b) evaluate the genetic variability of *M. phaseolina*. In chapter one, 23 isolates of fungi were inoculated in three soybean cultivars by using cut stem method. Later, two selected isolates were inoculated in 20 soybean cultivars by cut stem, sand layers, mycelium layer, and inoculum aggregate to the soil. These two isolates were also inoculated, by using the cut stem method, in 12 soybean genotypes, 11 of them were classified as, moderately, resistant, and one was susceptible to fungus. By using the cut stem method, the extension of stem necrosis was evaluated and the relative area below the progress curve of the disease calculated (RABCD). In the remaining inoculation methods, five fragments from the main root and from the stem of the plants were isolated to evaluate the intensity of the disease by the incidence of micro-sclerotia and by the severity (fragment of micro-sclerotia). The analyses were carried out using an R Software, and means test by Scott-Khott, with a significance level of 5% ($p < 0.05$). Aggressiveness was present among *M. phaseolina* isolates, the most aggressive ones were CMES 1169 and Mp CX which allowed their inclusion in resistance studies to soybean genotypes to fungus. The soybean cultivars presented distinct severity reaction to charcoal rot when the method of inoculation of sand layers, and cut stem was used; the last one being efficient to select useful source to develop soybean genotypes with higher levels of resistance to charcoal rot, due to prompt answer and execution. The soybean cultivars TMG 7062 and V-Mas, and soybean genotypes DT97-4290, and PI 567334, consistently, presented small ARACPC with cut stem method. These materials can be included in breeding programs for resistance to charcoal rot in soybean. In chapter II, the genetic variability of 23 *M. phaseolina* isolates was characterized by the molecular markers of amplified fragment length polymorphism (AFLP). The amplified fragments were analyzed in Polyacrylamide at 7% and translated into binary data, indicating presence (1) or absence (0). The cluster analysis was carried out with unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGAM) and the genetic distance by Jaccard coefficient, considering the genetic variation within and among the populations from different hosts, geographic origin (State of Brazil), and year the isolates were collected. The genetic variability analysis showed high variability among the *M. phaseolina* isolates, related to the host, the geographic origin and the year of the collection. The results indicated perspective of study reaction of soybean genotypes to the pathogen and to gene identification which ensure resistance, with possibility of incorporation of selected soybean genotypes.

Key words: 1. *Glycine max*. 2. Charcoal rot. 3. Genetic variability. 4. Inoculation method. 5. AFLP.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Etiologia	19
2.2	Sintomas e sinais	21
2.3	Hospedeiros de <i>Macrophomina phaseolina</i>	23
2.4	Ciclo da doença	24
2.5	Variabilidade genética de <i>Macrophomina phaseolina</i>	27
2.6	Manejo integrado	29
2.6.1	Controle cultural	29
2.6.2	Controle genético	31
2.6.2.1	Técnicas de fenotipagem de genótipos de soja a <i>Macrophomina phaseolina</i>	302
3	CAPÍTULO I	35
3.1	Resumo	35
3.2	Introdução	36
3.3	Material e Métodos	39
3.3.1	Seleção de isolado agressivo de <i>Macrophomina phaseolina</i> em soja	39
3.3.2	Seleção de técnica de fenotipagem de cultivares de soja a <i>Macrophomina phaseolina</i>	42
3.3.3	Reação de genótipos de soja a <i>Macrophomina phaseolina</i>	46
3.3.4	Análise estatística	47
3.4	Resultados e Discussão	47
3.4.1	Seleção de isolado agressivo de <i>Macrophomina phaseolina</i> em soja	47
3.4.2	Seleção de técnica de fenotipagem de cultivares de soja a <i>Macrophomina phaseolina</i>	50
3.4.3	Reação de genótipos de soja a <i>Macrophomina phaseolina</i>	55
3.5	Conclusões	57
4	CAPÍTULO II	59
4.1	Resumo	59
4.2	Introdução	60
4.3	Material e Métodos	62
4.4	Resultados e Discussão	65
4.5	Conclusões	78
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

6 CONCLUSÃO GERAL

80

REFERÊNCIAS

81

1 INTRODUÇÃO

A produção de grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) está entre as atividades econômicas que mais cresceram nas últimas décadas, tanto no Brasil quanto no mundo (IRAKURI; LAZZAROTTO, 2014). Estados Unidos, Brasil e Argentina são os maiores produtores dessa importante oleaginosa, responsáveis por 82% da safra mundial (CONAB, 2017c). Muitos fatores podem ser limitantes à produção, como as doenças causadas por fitopatógenos (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015). Dentre as doenças mais importantes à soja, destaca-se a podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (WRATHER; SHANNON; MENGISTU, 2007).

Macrophomina phaseolina é patógeno polífago, com origem no solo, sendo relatado em mais de 500 espécies de plantas hospedeiras além de soja, incluindo outras culturas economicamente importantes como milho, feijão e algodão (TWIZEYIMANA et al., 2012). É amplamente distribuído geograficamente, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (SEXTO; HUGHES; WISE, 2015; SU et al., 2001).

Em soja, o fungo pode manifestar-se em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura, principalmente em períodos prolongados de estresse hídrico e de altas temperaturas (MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015). Os sintomas da doença nas plantas incluem apodrecimento radicial, crescimento atrofiado, clorose foliar, murchamento e morte prematura, muitas vezes com folhas secas presas nas hastes, acarretando maturação antecipada e formação incompleta de grãos (ISHIKAWA et al., 2018; MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015).

Os danos ocasionados por *M. phaseolina* em soja podem ser expressivos, dependendo dos níveis de incidência e severidade da doença. Em 1994, os danos em decorrência da podridão de carvão em soja nos dez maiores países produtores foi de,

aproximadamente, 1,2 milhão de toneladas (WRATHER et al., 1997). No Brasil, na safra de 1996/1997, a estimativa de redução de rendimento ocasionada pela doença foi de 900 mil toneladas (ALMEIDA et al., 2001) e, em 2006, foi de 360 mil toneladas (MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015). Nos Estados Unidos, a podridão de carvão é considerada uma das doenças mais importantes em soja (LUNA et al., 2017), com danos estimados em 2 milhões de toneladas, em 2003 (ALMEIDA et al., 2014).

O uso de cultivares resistentes representaria um pilar para o manejo da doença, por ser uma das alternativas mais práticas e econômicas (ALMEIDA et al., 2014; TONIN et al., 2013). No entanto, cultivares comerciais com resistência completa para *M. phaseolina* não são relatadas em soja ou em outros hospedeiros (MENGISTU et al., 2013; PARIS et al., 2006; PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015). Alguns genótipos são classificados com resistência moderada, sendo utilizados como padrão de comparação (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015). Dentre esses genótipos destacam-se DT97-4290 (PARIS et al., 2006), DG3905, Manokin (MENGISTU et al., 2011a), DT99-16864 (GILLEN et al., 2016; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011a), DT99-17483, DT98-7553 e DT99-17554 (MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011a), e Spencer, PI 594302, PI 567562A, PI 506764, PI 567334, PI 221717, PI 567303B, PI 567335B, PI 567343 e PI 567349A (MENGISTU et al., 2013; TWIZEYIMANA et al., 2012).

Um dos entraves no desenvolvimento de cultivares comerciais de soja resistentes à podridão de carvão é a falta de padronização de técnicas de fenotipagem (TWIZEYIMANA et al., 2012). A precisão de técnicas de fenotipagem confiáveis poderia favorecer a seleção de genótipos de soja com menores níveis de infecção, que poderiam se tornar fontes úteis para programas de melhoramento e para o desenvolvimento de cultivares de soja moderadamente resistentes, auxiliando na redução de danos ocasionados pela podridão de carvão (ALMEIDA et al., 2014).

A maioria das avaliações de reação de genótipos de soja à doença procura simular condições naturais de infecção, sendo executadas em ensaios de campo, com inoculação de solo (MENGISTU et al., 2013) e avaliação visual de severidade de sintomas em raízes

e na parte aérea das plantas, calculando-se a área abaixo da curva de progresso da doença e o índice de unidades formadoras de colônias (IUFCs) (MENGISTU et al., 2007). Entretanto, experimentos em condições de campo apresentam limitações, como a possível desuniformidade de concentração e de distribuição de inóculo, a maturidade das plantas em épocas distintas e a possibilidade de apenas uma avaliação por ano. Avaliações realizadas em ambiente controlado, como em casa de vegetação, podem ajudar a superar as limitações de testes em campo. No entanto, avaliações nessas condições não são amplamente utilizadas, devido a falta de técnica de fenotipagem confiável (RADWAN et al., 2014; TWIZEYIMANA et al., 2012).

Por meio de experimentos em condições controladas, Surrette; Meints e Trevathan (2006) testaram a técnica de inoculação de substrato (formado por areia e farinha de milho) com *M. phaseolina* em plantas de soja, possibilitando a seleção de genótipos moderadamente resistentes à podridão de carvão. Jimenez (2011), a fim de avaliar a infecção de podridão de carvão em raízes de soja nos estádios vegetativos V1 (folhas unifolioladas completamente desenvolvidas) e V2 (primeira folha trifoliolada completamente desenvolvidas), com milheto japonês infestado, expôs as plântulas a diferentes teores de umidade no solo (saturação de vaso, capacidade de vaso e ponto de murcha permanente). A infecção das raízes das plântulas foi afetada pelo nível de estresse hídrico e pela capacidade de retenção de água de cada tipo de solo, sendo que a infecção das raízes pelo fungo foi maior em solos arenosos, devido à baixa capacidade de retenção de água. O mesmo resultado foi observado em solos com desequilíbrio nutricional.

Twizeyimana et al. (2012) adaptaram a técnica de inoculação da haste cortada para a avaliação da resistência de genótipos de soja a *M. phaseolina* em ambiente controlado. Essa técnica permite avaliação precisa de genótipos de soja para resistência parcial por meio da medição direta do desenvolvimento de lesão, evitando o efeito de maturidade das plantas (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015; TWIZEYIMANA et al., 2012). Além disso, distinguiu com sucesso cultivares de soja suscetíveis ou resistentes para podridão de carvão em ambiente controlado (SEXTON; HUGHES; WISE, 2016). Essa técnica não reproduz o que ocorre naturalmente, o que a torna interessante de ser comparada com

outras técnicas de inoculação que simulam o processo natural de infecção do patógeno, no solo.

Outra importante fonte de informação é a variabilidade genética do patógeno, a qual pode favorecer a sobrevivência e a adaptação em ambientes variáveis, pela sua variabilidade morfológica, fisiológica, patogênica e genética já relatada (RAYATPANA et al., 2012). Logo, informações sobre a variabilidade genética do patógeno contribui na compreensão da biologia desse microrganismo (ALMEIDA et al., 2003), a fim de fornecer fontes úteis para programa de melhoramentos para o desenvolvimento de cultivares resistentes e para modular métodos de controle à podridão de carvão (KAUR et al., 2012). A técnica molecular de polimorfismo de comprimento de fragmento (AFLP) apresenta várias vantagens para a caracterização da variabilidade genética de populações do fungo, entre elas o alto polimorfismo e a capacidade de identificar a variabilidade do patógeno entre regiões geográficas e hospedeiros distintos (REYES-FRANCO et al., 2006).

Levando em conta a importância da podridão de carvão em soja, o desenvolvimento de cultivares comerciais resistentes à doença é primordial para o manejo da mesma. Logo, a padronização para a avaliação de genótipos, assim como a compreensão do patógeno são essenciais. Este trabalho teve por finalidades, a) avaliar técnicas de fenotipagem em soja à podridão de carvão; e b) avaliar a variabilidade genética de *M. phaseolina*, a fim de disponibilizar informações para utilização nos programas de melhoramento genético de soja.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) teve origem na China, expandindo-se aos demais países da Ásia (AMARAL; JAIGOBIND, S.; JAIGOBIND, A., 2006), e só foi explorada comercialmente a partir da segunda metade do século 20 nos Estados Unidos. No Brasil, essa oleaginosa foi introduzida em 1914. Na década de 1960, foi reconhecida como economicamente importante ao país, sendo uma maneira de otimizar a ocupação da área destinada ao plantio de trigo, além de possibilitar a sucessão de cultura com leguminosa, a adoção de novas tecnologias e a promoção do avanço das indústrias de óleo vegetal (CAMARGO, 2010; TECNOLOGIAS..., 2002).

A soja contribui para a segurança alimentar, com produção em expansão em diversas regiões do mundo (RADWAN et al., 2014). Os principais países produtores são Estados Unidos, Brasil e Argentina, responsáveis por 82% da produção mundial do grão (CONAB, 2017c). Na safra 2017/2018, a produção brasileira de soja foi superior a 118 milhões de toneladas, considerada a melhor da história graças ao aumento da área plantada, à adequada distribuição de chuvas e à baixa incidência de pragas (CONAB, 2018b).

Estresses abióticos, como seca e compactação do solo, e bióticos, como pragas, são restrições à produção da cultura, reduzindo o rendimento e a qualidade de grãos (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015). Os agentes patogênicos de origem no solo são especialmente desafiadores porque seus propágulos de infecção, muitas vezes, sobrevivem por vários anos e são difíceis de detectar e de prever, dificultando a compreensão das variáveis que governam os processos de infecção e de epidemias (JIMENEZ, 2011).

Uma das doenças radiciais mais comumente encontradas na soja é a podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (GUPTA;

SHARMA; RAMTEKE, 2012). Esse fungo é polífago e afeta mais de 100 famílias botânicas (MA, J.; HILL, C. B.; HARTMAN, 2010) e 500 espécies de plantas, dentre elas, milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015). O patógeno apresenta ampla distribuição geográfica e foi identificado na maioria dos continentes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (SEXTON; HUGHES; WISE, 2016).

A primeira identificação de *M. phaseolina* causando doença radicial na cultura da soja, nos Estados Unidos, ocorreu em 1949 (LUNA et al., 2017). No Brasil, a doença foi identificada em 1935, em Campinas, SP, em raízes de feijão (TONIN et al., 2013). Em soja, o primeiro relato da doença ocorreu em 1979, no Paraná, causando danos significativos em cultivares de ciclo tardio. Durante anos, a importância dessa doença em soja foi negligenciada no Brasil por se manifestar normalmente em estádios finais de desenvolvimento da cultura. No entanto, os danos causados foram se tornando mais expressivos no Brasil e, na safra de 1996/1997, chegaram a 900 mil toneladas (WRATHER et al., 1997).

Em 2006, a estimativa de redução de rendimento de grãos ocasionada pela doença foi de 910 mil toneladas na Argentina, 360 mil toneladas no Brasil e 700 mil toneladas nos Estados Unidos (MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015). A ocorrência do patógeno está se tornando frequente, ocasionando redução na produtividade de grãos de soja e, consequentemente, na renda do produtor (ALMEIDA et al., 2010).

2.1 Etiologia

A primeira descrição de *M. phaseolina* ocorreu como *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler em batata-doce, para o micélio com microescleródios. Em seguida, com a observação da formação de picnídios, o fungo foi renomeado como *Macrophoma phaseolina*. Em 1912, na Índia, o mesmo fungo foi isolado do feijão-caupi por Shaw, e foi denominado de *Sclerotium bataticola* (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Após identificada a relação entre microescleródio e picnídio, foram propostos os nomes *R. bataticola* (Taub.) Butler ou *Macrophomina*

phaseoli (Maubl.) Ashby para o estágio picnidial (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Em 1947, Goidanich renomeou o fungo como *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich (JIMENEZ, 2011), identificado como única espécie do gênero *Macrophomina* (RADWAN, 2014). Esse fungo pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae (LUNA et al., 2017).

O fungo produz duas estruturas anamórficas, picnídio (estrutura de reprodução) e microescleródio (estrutura de resistência). Picnídios são globosos e negros, com tamanho variável de 100 µm a 200 µm; formam conidióforos septados ou ramificados, em forma de bastonetes simples e longos, com tamanho aproximado de 10 µm a 15 µm, e conídios unicelulares, hialinos, elipsoides a ovoides, medindo em torno de 14 µm a 30 µm x 5 µm a 10 µm. Têm ostíolo definido, solitário a gregário. A formação de picnídios não ocorre em todos os hospedeiros, sendo frequentemente encontrados em feijão de jardim, feijão-juta e soja (ALMEIDA et al., 2005; KAUR et al., 2012). Os microescleródios são corpos negros e lisos, medindo, aproximadamente, 100 µm de diâmetro (VIANA; SOUZA, 2002), formados a partir da agregação de hifas com 50 células a 200 células (KAUR et al., 2012). Podem germinar independentemente (JIMENEZ, 2011), são resistentes a condições adversas e produzidos, em grande quantidade, nas partes infectadas das plantas, especialmente sob a epiderme de raízes ou na camada externa do córtex e do colo da haste da soja (ALMEIDA et al., 2014).

De acordo com Mihail (1992), há um relato não confirmado da fase teleomórfica de *M. phaseolina* chamada *Orbilina obscura* por Ghosh et al. (1964), mas, desde então, nenhum relato foi feito sobre esta fase.

Isolados de *M. phaseolina* apresentam variações em características morfológicas da colônia em meio de cultura, como pigmentação das hifas (septadas, de coloração cinza, preta ou marrom), tamanho e forma dos microescleródios e presença ou ausência de picnídios (KAUR et al., 2012). Pode ocorrer crescimento de micélio sobre a colônia e formação de anéis concêntricos (SMITH; WYLLIE, 1999). O micélio é uninucleado, mas as células das extremidades (região de crescimento) são, normalmente, multinucleadas (ALMEIDA et al., 2001).

2.2 Sintomas e sinais

A podridão de carvão em soja é pronunciada quando condições ambientais desfavoráveis, como períodos prolongados de seca e de altas temperaturas, estressam a planta. A intensidade da doença está associada a períodos de elevadas temperaturas do ar (em torno de 28 °C a 35 °C) e de estresse hídrico (ALMEIDA et al., 2014; CRUCIOL; COSTA, 2017). A infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento e os sintomas são mais evidentes em raízes e no final do ciclo, com a evolução da infecção (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012).

A infecção das plantas, na lavoura, ocorre aleatoriamente, devido à distribuição desuniforme de microescleródios no solo (ALMEIDA et al., 2010) (Figura 1) e a condições locais de solo compactado, que dificultam a penetração de raízes, acarretando em desenvolvimento superficial do sistema radicial (CRUCIOL; COSTA, 2017). A infecção em raízes pode ocorrer a partir de duas a três semanas após a emergência (REIS; BOARETTO, DANELLI, 2014). Os cotilédones desenvolvem lesões escurecidas, e após o estágio V1 (desenvolvimento completo da folha unifoliolada, pela escala de Fehr et al., 1971), o hipocótilo apresenta lesões marrom-avermelhadas, que podem ficar escuras e se estenderem para a haste. As plantas infectadas podem morrer logo nos estádios iniciais, se houver período quente e seco (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Lesões no pedúnculo afetam o florescimento, a formação de vagens e de grãos, ocasionando dano no rendimento (TWIZEYIMANA et al., 2012). Nos casos em que a planta sobrevive à infecção inicial, os sintomas podem reaparecer no estágio reprodutivo, entre R1 (início do florescimento) e R7 (início da maturação) (SMITH; WYLLIE, 1999). Em estádios reprodutivos tardios, o sistema vascular fica escurecido, as plantas tornam-se cloróticas, secam e as folhas secas permanecem aderidas ao pecíolo, com coloração marrom. Nesta fase, o principal dano ao rendimento são grãos mal formados ou pequenos (TWIZEYIMANA et al., 2012). As lesões podem ser confundidas com aquelas causadas por *Rhizoctonia solani*, mas, com este patógeno, as lesões provocam cancos no colo da planta (ALMEIDA et al., 2001).

Figura 1 - Plantas de soja infectadas por *Macrophomina phaseolina*, distribuídas aleatoriamente na lavoura.



Fonte: COSTAMILAN, L. M.

O sintoma mais característico da podridão de carvão, em fases mais avançadas, é a facilidade com que a epiderme da raiz pode ser destacada do lenho, juntamente com a visualização de microescleródios no tecido da raiz (Figura 2). Os microescleródios, além de serem estruturas de sobrevivência, são a principal fonte de inóculo do fungo e os sinais que identificam o patógeno (ALMEIDA et al., 2010).

Figura 2 - Raiz de soja infectada por *Macrophomina phaseolina*, mostrando microescleródios (pontuações escuras) que se desenvolvem sob a epiderme, que se solta com facilidade.



Fonte: DEUNER, C. C.

2.3 Hospedeiros de *Macrophomina phaseolina*

Reichert e Hellinger (1947), listaram um grande número de espécies de plantas, ao redor do mundo, hospedeiras de *M. phaseolina*. As mais importantes economicamente são: soja, milho, batata (*Solanum tuberosum* L.), batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), café (*Coffea arabica* L.), pimenta (*Capsicum annum* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), uva (*Vitis vinifera* L.), mamão (*Carica papaya* L.), laranja-doce (*Citrus x sinensis* L. Osbeck), maçã (*Malus domestica* Borkh.), girassol (*Helianthus annuus* L.), cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), trevo (*Trifolium* sp.), sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) plátano (*Musa paradisiaca* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.). A variabilidade de hospedeiros do fungo é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, e inclui cereais, leguminosas, vegetais, frutas, plantas lenhosas e herbáceas (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

O patógeno está sendo relatado em novos hospedeiros e áreas geográficas causando a podridão do carvão. Em 2006, plantas de canola (*Brassica napus* L.) foram observadas com sintoma de murcha e coloração marrom-acastanhado, em uma parcela experimental em Merredin, na Austrália Ocidental. Nesse mesmo ano, a podridão de carvão também foi relatada em canola, na Argentina (GAETAN; FERNANDE; MADIA, 2006). Foi relatada a presença de *M.* em tropical soda apple (*Solanum viarum* Dunal), uma importante espécie invasora na Flórida, com sintoma de necrose progressiva nos pecíolo e nas folhas, observando-se a produção de picnídios e picniósporos em tecidos infectados (IRIARTE, 2007).

Em 2006, no sul da Espanha, foi relatada a podridão da coroa e da raiz em cultivares de morangueiro causada por *M. phaseolina*. As plantas afetadas apresentavam raízes necrosadas, áreas marrom-escurecidas ao longo do anel vascular lenhoso. A mesma doença e os sintomas também foram relatados em morangos na Flórida e Israel em 2005 (AVILES et al., 2008).

A *M. phaseolina* é capaz de causar diferentes sintomas dependendo do tecido da planta colonizada. No melão, o fungo infecta as raízes das plantas e posteriormente coloniza os frutos pelo pedúnculo. Uma vez que o fruto é colonizado, o fungo infecta o tegumento e os cotilédones, e essas sementes infectadas originam plântulas doentes que podem aumentar o potencial de inóculo no solo (REUVENI; NACHMIAS; KRIKUN, 1983). A podridão de carvão no girassol foi relatada pela primeira vez em 1927 no Sri Lanka e nos anos subsequentes em vários continentes em todo o mundo. Os sintomas predominantes dessa doença no girassol são descoloração cinzenta a negra com lesões no caule, microscleródios geralmente observados quando é removida a epiderme da raiz. Como a soja, a severidade da doença depende das condições ambientais, especialmente a seca e as altas temperaturas (KHAN, 2007).

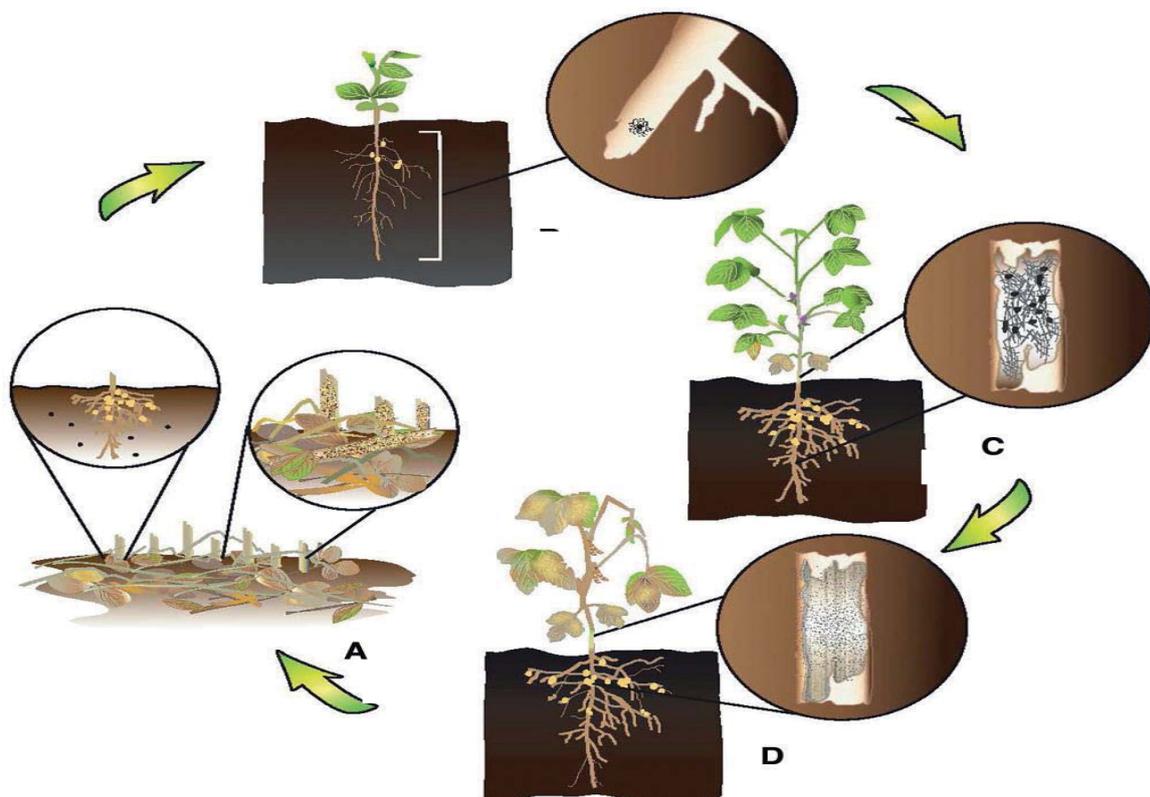
2.4 Ciclo da doença

Após a colheita, com a decomposição dos restos culturais das plantas infectadas, os microscleródios são liberados ao solo, onde permanecem agrupados a uma profundidade de 0 a 20 cm (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Dependendo das condições ambientais, como temperatura e disponibilidade de nutrientes, e de restos culturais de hospedeiros, podem sobreviver de 2 anos a 15 anos (BAIRD; WATSON; SCRUGGS, 2003). A longevidade dessas estruturas no solo tende a diminuir com o tempo, sendo que, em solos úmidos, a sobrevivência é reduzida pela baixa oxigenação do solo. Por outro lado, o baixo potencial hídrico torna as plantas suscetíveis e reduz a atividade de microrganismos antagônicos (ALMEIDA et al., 2005). Além de sobreviver em restos culturais como microscleródio (BAIRD; WATSON; SCRUGGS, 2003; GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012), *M. phaseolina* também pode sobreviver nas formas de micélio e de microscleródio em sementes, desenvolvendo-se no interior do tegumento; normalmente, essas sementes não apresentam sinais de infecção (ALMEIDA et al., 2001) (Figura 3).

A infecção pode ocorrer na emergência, na fase de cotilédones (VC) ou mesmo no início do estágio vegetativo (V1-V2), entre duas a três semanas após a semeadura. A

infecção permanece latente até que as condições ambientais estressantes coincidam com as fases reprodutivas das plantas (R1-R7). Quando a infecção é severa, além do bloqueio dos vasos, a produção de toxinas fúngicas causa a morte da planta (SMITH; WYLLIE, 1999). A germinação dos microescleródios, no solo, começa quando a temperatura estiver entre 28 °C a 35 °C. Os microescleródios germinam na presença de um hospedeiro e produzem tubos germinativos que desenvolvem apressórios que, por sua vez, penetram na planta pela parede celular da epiderme ou por aberturas naturais. Durante o início do estágio de infecção, as hifas ficam restritas aos espaços intercelulares do córtex da raiz, podendo causar a morte de plântulas devido ao rompimento de células adjacentes. Posteriormente, as hifas desenvolvem-se intracelularmente no xilema e promovem a formação de microescleródios, que irão bloquear os vasos e causar a ruptura das células do hospedeiro. (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012; KAUR et al., 2012) (Figura 3).

Figura 3 - O ciclo da doença podridão de carvão, causada por *Macrophomina phaseolina*, em soja.



Fonte: Adaptado de LUNA et al., 2017.

Macrophomina phaseolina inclui uma abundância de genes que codificam a degradação de enzimas hidrolítica e de lignina que degradam os polissacarídeos da parede celular e lignoceluloses para facilitar a penetração de fungos no tecido hospedeiro (ISLAM et al., 2012). As enzimas hidrolíticas incluem enzimas hidrato de carbono-ativas (CAZymes). O genoma fúngico contém 362 CAZymes putativas incluindo 219 glicosil hidrolases (GH), 56 glicosiltransferases (GT), 65 carboidratos de esterases (CE), seis módulos de ligação a carboidratos (CBMs) e 16 polissacarídeos liase (PL). O número CAZymes descobertos no genoma da *M. phaseolina* é superior aos identificados a partir de outros fungos fitopatogênicos. O alto número de CEs permite que o fungo infecte muitos hospedeiros, pois é considerado a primeira linha de ataque durante a invasão do hospedeiro e, portanto, fundamental na patogênese (RADWAN et al., 2014).

O genoma de *M. phaseolina* contém muitos genes envolvidos na degradação da lignina, como lacases, lignina peroxidase, galactose oxidase, cloroperoxidase, haloperoxidase e heme peroxidase. Em comparação com outras sete espécies de fungos, genoma desse fungo inclui o maior número de lacases (ISLAM et al., 2012). Além da degradação das enzimas hidrolítica e lignina, o sequenciamento do genoma identificou muitos genes associados a patogenicidade. Estes incluem uma série de genes de desintoxicação, como o citocromo P450, Cof, superóxido dismutase, e várias β -cetoacil-ACP-sintase envolvidas na biossíntese de um antibiótico policetídeo (BECK et al., 1990), bem como genes de resistência à tetraciclina. Trabalhando juntos, esses genes podem permitir que esse patógeno infecte um ampla gama de plantas hospedeiras (RADWAN et al., 2014).

Esse fungo provoca o desenvolvimento de doenças em plantas secretando uma ou mais fitotoxinas que facilitam a penetração, a invasão e a colonização do hospedeiro. Vários metabólitos fitotóxicos produzidos por *M. phaseolina* foram identificados em isolados individuais. Essas fitotoxinas incluem asperlin, isoasperlin, fomalactona, folicolinica e faseolinona. A faseolinona é uma toxina não específica do hospedeiro que causa murchamento de plântulas e formação de lesões necróticas nas folhas, semelhantes às incitadas pelo patógeno (RADWAN et al., 2014). O genoma desse patógeno quando totalmente sequenciamento permite a descoberta desses genes associado à patogenicidade

fúngica e à produção de toxinas. Essas informações contribuem no planejamento de estratégias racionais para o controle da podridão de carvão, essencial para assegurar a produção e segurança agrícola global (ALMEIDA et al., 2003, ISLAM et al., 2012).

2.5 Variabilidade genética de *Macrophomina phaseolina*

Fungos com uma fase sexual pode apresentar variabilidade genética por meio da recombinação genética, ao passo que fungos sem fase sexual conhecida, como *M. phaseolina*, a variabilidade genética é por meio de mutação, fusão de hifas e recombinação mitótica (KAUR et al., 2012). A variabilidade genética sempre foi evidente entre isolados de *M. phaseolina* e, mesmo em isolados obtidos de um único hospedeiro, ocorreram níveis diferentes de patogenicidade. Marcadores moleculares, como RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) e RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) foram utilizados para caracterizar populações de *M. phaseolina* de distintos hospedeiros e regiões geográficas (SALEH et al., 2010).

A técnica RAPD foi útil na avaliação de 55 isolados brasileiros de *M. phaseolina*, obtidos de raízes de soja em diferentes Estados do Brasil, sendo divididos em três grupos. A variabilidade encontrada foi baixa entre isolados do mesmo grupo, no entanto, a divergência entre os grupos foi alta (ALMEIDA et al., 2003). Os autores consideraram que a variabilidade genética foi originada, possivelmente, pelo parassexualismo, com a fusão de células de diferentes hifas. RAPD foi usada por Su et al. (2001), que verificaram que isolados de *M. phaseolina* originados a partir de um dado hospedeiro foram geneticamente semelhantes entre si, mas distintos quando obtidos a partir de outros hospedeiros. Esse resultado também foi verificado por Purkayastha et al. (2006), ao analisarem a variabilidade genética de 59 isolados indianos do fungo, oriundos de diferentes hospedeiros. De acordo com Jana et al. (2003), a avaliação da variabilidade genética de 43 isolados de *M. phaseolina* de distintos hospedeiros, dentre eles, soja, gergelim, amendoim, grão de bico, algodão e feijão, e de distintas regiões geográficas,

por meio da técnica RAPD, foi possível, com a amplificação do primer OPA-13, distinguir os isolados do fungo.

A técnica AFLP foi utilizada para determinar a variabilidade genética de 96 isolados de *M. phaseolina*, coletados de distintos hospedeiros em oito países, incluindo o Brasil. A análise detectou altos níveis de polimorfismo e de variabilidade do patógeno entre hospedeiros e entre regiões geográficas (REYES-FRANCO et al., 2006). Da mesma forma, isolados do patógeno do México foram associados à origem geográfica e à espécie hospedeira (MAYEK-PÉREZ et al., 2001). Na mesma linha de pensamento, por meio da técnica AFLP, Vandemark et al. (2000) concluiu que era impossível obter uma correlação no nível de polimorfismo de DNA com a localização geográfica ou hospedeiro. Saleh et al. (2010) avaliaram 143 isolados de *M. phaseolina* obtidos de campo de milho, soja, centeio e pradaria de capim-alto, no estado do Kansas, pelas técnicas AFLP e região espaçadora interna transcrita (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal (rDNA). A semelhança genética foi maior entre os isolados em campos de soja e menor na pradaria de capim-alto. Não houve relação genotípica para especialização de hospedeiro, o que já era esperado, uma vez que esse patógeno é considerado generalista.

Mesmo com abordagens moleculares, não há evidências suficientes para sugerir *forma specialis* ou subespécies dentro de *M. phaseolina* (BAIRD et al., 2010), uma vez que informação genética sobre esse patógeno é escassa (SEXTON; HUGHES; WISE, 2016), com apenas 176 marcadores de sequências expressas (ESTs) e 903 marcadores de sequências de nucleotídeos do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) (ISLAM et al., 2012).

Um único isolado de *M. phaseolina* coletado de juta foi sequenciado usando sequenciamento de próxima geração (*Next-Generation Sequencing* – NGS) e sequenciamento Shotgun. O genoma apresenta aproximadamente 15.000 genes. (ISLAM et al., 2012; RADWAN et al., 2014).

A ampla capacidade de virulência de um genoma é frequentemente associada à inativação mediada por transposon ou à deleção de genes codificadores de padrão

molecular associado ao patógeno cujos produtos desencadeiam o sistema imune adaptativo da planta. O genoma de *M. phaseolina* compreende 2,84% de DNA repetitivo e 3,98% de elementos transponíveis; e contém mais pseudogenes fragmentados (894) do que os pseudogenes processados (31) causados por elementos móveis, mas não possui pseudogenes duplicados. Isso é consistente com os transposons que contribuem para a instabilidade genética em *M. phaseolina* (ISLAM et al., 2012). O sequenciamento de isolados adicionais de *M. phaseolina* de soja e de outros hospedeiros é necessário para comparar a sequência do genoma do isolado de juta. A análise genômica comparativa de diferentes sequências fornecerá informações valiosas sobre a variabilidade genéticas presente entre diferentes isolados deste fungo, e elucidará mecanismos comuns ou distintos utilizados por diferentes isolados para infecção do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2003, ISLAM et al., 2012).

2.6 Manejo integrado

Para o controle de *M. phaseolina* são indicadas estratégias que evitam condições favoráveis à sobrevivência e à propagação do patógeno, como práticas culturais, tratamento de semente e controle biológico (COSER et al, 2017); porém as mesmas não são amplamente adotadas pelos produtores e a eficiência de controle é limitada (MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015).

2.6.1 Controle cultural

A irrigação pode ser empregada durante todo ciclo da cultura da soja (SMITH et al., 2014) e auxilia na redução do estresse por seca, e conseqüentemente, limita os danos ocasionados pela podridão de carvão, mesmo que esses ainda possam variar de 6% a 30% (LUNA et al., 2017). Mengistu et al. (2011b) observaram que, embora a infecção ocorresse em ambientes não irrigados e irrigados, maiores rendimentos foram relatados nestes últimos.

A semeadura direta também é considerada uma das estratégias de controle, por promover a manutenção de restos culturais sobre o solo, reduzir o estresse hídrico, impedir a erosão, favorecer a sobrevivência de fungos antagonistas e interferir nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (ALMEIDA et al., 2010). Entretanto, o acúmulo de palha no solo favorece outras doenças, sendo uma limitação do sistema de semeadura direta (ALMEIDA et al., 2001).

A rotação de culturas não é considerada uma medida confiável para o controle da doença, pois *M. phaseolina* é polífago (LUNA et al., 2017), além de sobreviver e se multiplicar saprofiticamente em restos culturais (ALMEIDA et al., 2014). Short et al. (1980) observaram correlação direta entre a população de microscleródios viáveis no solo e o número de anos consecutivos de produção de milho ou de soja, independentemente da rotação. No entanto, estudos de rotação de culturas determinaram que, mesmo que a soja seja rotacionada com outros hospedeiros de *M. phaseolina*, uma rotação de longo prazo reduziria a população do fungo em comparação com o cultivo contínuo de soja, melhorando o manejo da doença (LUNA et al., 2017).

No sistema de semeadura convencional, o revolvimento do solo causa maior distribuição do patógeno na área. No entanto, isso é aceito até certo nível, pois a infecção das plantas é aleatória. Tanto neste sistema de preparo de solo quanto no sistema plantio direto, a compactação do solo é fator favorável ao desenvolvimento da doença, por impedir que as raízes se desenvolvam em profundidade. Como consequência, a planta fica debilitada, tornando-se suscetível ao ataque do fungo (PEREZ-BRÁNDAN et al., 2012).

2.6.2 Controle genético

A estratégia mais prática e econômica no manejo de doenças é o uso de cultivares resistentes. No entanto, cultivares comerciais com resistência completa para *M. phaseolina* não são relatadas em soja ou em outros hospedeiros (PARIS et al., 2006; MENGISTU et al., 2013; PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015; COSER et al., 2017). Alguns genótipos são caracterizados com resistência moderada, sendo utilizados

como padrão de comparação (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015), como a linhagem de soja DT97-4290 (PARIS et al., 2006). Outras linhagens de soja caracterizadas com moderada resistência à podridão de carvão, são DG3905, Manokin (MENGISTU et al., 2011a), DT99-16864 (GILLEN et al., 2016; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011a), DT99-17483, DT98-7553 e DT99-17554 (MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011a), e Spencer, PI 594302, PI 567562A, PI 506764, PI 567334, PI 221717, PI 567303B, PI 567335B, PI 567343 e PI 567349A (MENGISTU et al., 2013; TWIZEYIMANA et al., 2012). Aliado a esse fator, até o momento nenhum gene maior ou raça específica de resistência foram relatados em qualquer um de seus hospedeiros (RADWAN et al., 2014).

Como um fungo fitopatogênico de ampla gama de hospedeiros, espera-se que *M. phaseolina* possua um número significativo de genes de interação patógeno-hospedeiro. Por meio do sequenciamento do genoma desse patógeno foi identificado 537 genes putativos da interação patógeno-hospedeiro. Esses genes desempenham diversos papéis na patogênese, incluindo adesão, transdução de sinal, quebra da parede celular, biossíntese de purinas e biossíntese da micotoxina patulina. Os transportadores de cassete de ligação de ATP ajudam a defender o patógeno dos metabólitos secundários produzidos pelo hospedeiro, bem como fornecem nutrientes essenciais. Estão presentes vários genes de desintoxicação, tais como os que codificam o citocromo P450 (IPR001128), proteína Cof (IPR000150) e superóxido dismutase. Além disso, vários β -Cetoacil sintase (IPR000794) envolvidos na biossíntese de um antibiótico policetídeo, bem como alguns genes de resistência à tetraciclina foram identificados em *M. phaseolina*. Esses dados sugerem que o genoma desse patógeno codifica um grande repertório de genes associados à patogenicidade, os quais podem estar envolvidos na patogênese desse organismo (ISLAM et al., 2012).

Diante desse contexto, pode-se afirmar que a resistência do hospedeiro a *M. phaseolina* é considerada resistência quantitativa, pois a diferença dos níveis de resistência entre as plantas que não tem o gene R efetivo seria pelas diferenças nas constituições alélicas dos inúmeros genes envolvidos na resposta da planta ao patógeno, em que os efeitos constituem em maior ou menor quantidade de doença (CAMARGO, 2011a).

Logo, os indivíduos do patógeno diferem quanto à agressividade em relação aos genótipos, podendo haver indivíduos mais agressivos que outros (CAMARGO, 2011b).

O desenvolvimento de cultivares de soja resistentes à podridão de carvão é desafiador, mas a sequência precisa do genoma da soja facilita a identificação da base genética e acelerará a criação de cultivares melhoradas (RADWAN et al., 2014). Centenas de características herdadas qualitativamente foram caracterizadas em soja e geneticamente mapeadas. No entanto, as características mais importantes da produção agrícola são herdadas quantitativamente, como é o caso da resistência a *M. phaseolina*. As regiões do genoma que contêm a sequência de DNA que afetam essas características são chamadas de loci de característica quantitativa (QTL) (SCHMUTZ et al., 2010). Nenhuma informação sobre QTL no mapeamento de associação genômica está disponível para podridão de carvão em soja, mas em feijão-caupi há três novos QTLs identificados associados à seca e à resistência a *M. phaseolina*, indicando que diferentes mecanismos genéticos apresentam resposta ao estresse hídrico e à infecção pelo patógeno (MUCHERO; EHLERS; ROBERTS, 2011). Melhorar a tolerância à seca pela resistência genética também pode fornecer novas possibilidades para o controle da doença, uma vez que a podridão de carvão é mais prevalente em condições de estresse hídrico. A combinação destes estudos com métodos tradicionais provavelmente irá melhorar a resistência de cultivares de soja à podridão de carvão (LUNA et al., 2017).

2.6.2.1 Técnicas de fenotipagem de genótipos de soja a *Macrophomina phaseolina*

A melhoria na precisão das técnicas de fenotipagem confiáveis poderia favorecer a seleção de genótipos de soja com menores níveis de infecção, que poderiam se tornar fontes úteis para programas de melhoramento e para o desenvolvimento de cultivares de soja moderadamente resistentes, auxiliando na redução de danos ocasionados pela doença (ALMEIDA et al., 2014).

A maioria das avaliações de reação de genótipos de soja à doença procura simular condições naturais de infecção. Por isso, as avaliações têm sido executadas em ensaios de campo, com inoculação de solo (MENGISTU et al., 2013) e avaliação visual de

severidade de sintomas em raízes e na parte aérea das plantas, calculando-se a área abaixo da curva de progresso da doença e o índice de unidades formadoras de colônias (IUFCs) (MENGISTU et al., 2007). Smith e Carvil (1997) desenvolveram um ensaio, em que os microscleródios são quantificados a partir da haste e da raiz das plantas. Essa técnica consistiu em coletar a haste e a raiz principal de plantas, arbitrariamente selecionadas, e amostras de solo. Embora essa técnica de avaliação contenha informação valiosa, os resultados foram variáveis e houve inconsistência entre os estudos.

Mengistu et al. (2007) estudou cinco diferentes técnicas de campo para avaliação de soja à podridão de carvão, com a finalidade de estabelecer uma técnica consistente, e propuseram o uso do IUFCs como técnica padrão para avaliação de resistência. Essa técnica consistiu na coleta de hastes e raízes de plantas de soja e de amostras de solo. As amostras foram colocadas em meio seletivo esterilizado contendo BDA e incubadas por três dias a 30 °C. Após três dias, as colônias foram contadas e convertidas em UFC por grama de raiz e tecido da haste. O IUFCs é obtido dividindo o UFC de cada genótipo pela UFC do genótipo que tem a maior UFC no presente estudo. Segundo Mengistu et al. (2014) essa técnica permite que os pesquisadores determinem consistentemente as reações para *M. phaseolina* em diferentes genótipos de soja e ambientes em condições de campo.

Entretanto, experimentos em condições de campo apresentam limitações, como a possível desuniformidade de concentração e de distribuição de inóculo, a maturidade das plantas em épocas distintas e a possibilidade de apenas uma avaliação por ano. Avaliações realizadas em ambiente controlado, como em casa de vegetação, podem ajudar a superar as limitações de testes em campo. No entanto, avaliações nessas condições não são amplamente utilizadas, devido a falta de técnica confiável de inoculação (RADWAN et al., 2014; TWIZEYIMANA et al., 2012).

Por meio de experimentos em condições controladas, Surrette; Meints e Trevathan (2006) testaram a técnica de inoculação de substrato (formado por areia e farinha de milho) com *M. phaseolina* em plantas de soja, possibilitando a seleção de genótipos moderadamente resistentes à podridão de carvão. Jimenez (2011), a fim de avaliar a

infecção de podridão de carvão em raízes de soja nos estádios vegetativos V1 (folhas unifolioladas completamente desenvolvidas) e V2 (primeira folha trifoliolada completamente desenvolvidas), com milheto japonês infestado, expôs as plântulas a diferentes teores de umidade no solo (saturação de vaso, capacidade de vaso e ponto de murcha permanente). A infecção das raízes das plântulas foi afetada pelo nível de estresse hídrico e pela capacidade de retenção de água de cada tipo de solo, sendo que a infecção das raízes pelo fungo foi maior em solos arenosos, devido à baixa capacidade de retenção de água. O mesmo resultado foi observado em solos com desequilíbrio nutricional.

Twizeyimana et al. (2012) adaptaram a técnica de inoculação da haste cortada para a avaliação da resistência de genótipos de soja a *M. phaseolina* em ambiente controlado. Essa técnica foi, inicialmente, desenvolvida para avaliação de *Phomopsis longicolla* e de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (LI; HARTMAN; BOYKIN, 2010), e permite avaliação mais precisa de genótipos de soja para resistência parcial por meio da medição direta do comprimento do tecido necrosado na haste, evitando o efeito de maturidade das plantas (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015; TWIZEYIMANA et al., 2012). Além disso, distinguiu com sucesso cultivares de soja suscetíveis ou resistentes para podridão de carvão em ambiente controlado (SEXTON; HUGHES; WISE, 2016). Essa técnica não reproduz o que ocorre naturalmente, o que a torna interessante de ser comparada com outras técnicas de inoculação que simulam o processo natural de infecção do patógeno, no solo.

3 CAPÍTULO I

Otimização de técnicas de fenotipagem em soja visando à determinação da podridão de carvão

3.1 Resumo

Na cultura da soja, a podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, é uma doença importante que incide no sistema radicular das plantas, e as condições ambientais que favorecem sua ocorrência incluem altas temperaturas e baixa umidade do solo. Não há resistência genética completa identificada a esse patógeno em soja, e nem informação de agressividade de isolados para uso em seleção de genótipos. Os objetivos do trabalho foram a) avaliar a agressividade de isolados brasileiros de *M. phaseolina* inoculados em cultivares de soja pela técnica da haste cortada; b) avaliar a severidade de genótipos de soja a isolados brasileiros de *M. phaseolina* pela técnica da haste cortada; e c) avaliar a intensidade de *M. phaseolina* utilizando-se três técnicas de inoculação: camada de micélio, camada de areia e inóculo agregado ao solo, em diferentes cultivares de soja. Primeiramente, 23 isolados do fungo foram inoculados pela técnica da haste cortada em três cultivares de soja, sendo selecionados dois isolados do fungo. Posteriormente, estes dois isolados foram inoculados em vinte cultivares de soja, pelas técnicas haste cortada, camada de micélio, camada de areia e inóculo agregado ao solo. Esses mesmos isolados do patógeno foram inoculados pela técnica da haste cortada em doze genótipos de soja, sendo 11 genótipos classificados como moderadamente resistentes e um suscetível ao fungo. Na técnica da haste cortada, foi medido o comprimento do tecido necrosado na haste das plantas, realizando-se cinco medições com intervalos de três a quatro dias. Calculou-se a Área Relativa Abaixo da Curva de Progresso da Doença (ARACPD). Nas demais técnicas de inoculação, foi avaliada a intensidade da doença através do isolamento de cinco fragmentos da raiz secundária, da raiz principal e do colo de cada planta. Houve diferença de agressividade entre isolados de *M. phaseolina*, sendo os isolados CMES 1169 e Mp CX os mais agressivos, possibilitando a incorporação destes em estudos da resistência de genótipos de soja ao fungo. As cultivares de soja apresentaram reação distinta de severidade à podridão de carvão pela técnica de inoculação da camada de areia e da haste cortada, sendo esta última técnica de inoculação eficiente para seleção de fontes úteis para o desenvolvimento de genótipos de soja com maiores níveis de resistência à podridão de carvão, pela rapidez de resposta e pela facilidade de execução. As cultivares de soja TMG 7062 e V-Max e os genótipos de soja DT97-4290, Spencer e PI 567334 apresentaram consistentemente menor ARACPD pela técnica da haste cortada, sendo que esses materiais podem ser incluídos em programas de melhoramento para resistência à podridão de carvão de soja.

Palavras-chave: 1. *Glycine max*. 2. Podridão de carvão. 3. Intensidade da doença. 4. Resistência.

3.2 Introdução

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid., agente causal da podridão de carvão em soja (*Glycine max* (L.) Merr.), é considerado um dos fungos mais importantes em infecções radiciais da cultura (ALMEIDA et al., 2003). Esse fungo é polífago, sem evidência de hospedeiro específico (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012), sendo relatadas mais de 500 espécies de plantas hospedeiras (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015), dentre elas soja, feijão, milho, sorgo, citrus, café e plantas daninhas (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012).

A podridão de carvão pode infectar a planta de soja em todos os estádios de desenvolvimento, embora os sintomas sejam mais evidentes na fase reprodutiva (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012; SMITH; WYLLIE, 1999) e em condições ambientais caracterizadas por períodos prolongados de seca e de altas temperaturas (MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015). Na lavoura, as plantas são infectadas, inicialmente, pelo sistema radicial, por meio de microescleródios (estruturas de resistência do fungo), presentes no solo (ALMEIDA et al., 2010). Os sintomas característicos da doença nas plantas incluem apodrecimento radicial, crescimento atrofiado, clorose foliar, murchamento e morte prematura, muitas vezes com folhas secas presas em hastes, acarretando em maturação antecipada e formação incompleta de grãos (MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015; RADWAN et al., 2014).

As opções de manejo da podridão de carvão são limitadas (LUNA et al., 2017), indicando-se estratégias que evitem condições favoráveis à sobrevivência e à propagação do patógeno, como irrigação, rotação de cultura, redução da densidade de plantas e escalonamento de datas de semeadura (COSER et al., 2017; TWIZEYIMANA et al., 2012). No entanto, essas estratégias apresentam baixa eficiência de controle (MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015). O desenvolvimento da resistência genética à doença também é objeto de estudo, incluindo o desenvolvimento de técnicas confiáveis para caracterizar a resistência, bem como o desenvolvimento de cultivar resistente (LUNA et al., 2017).

Até o momento, não há cultivares de soja com resistência completa à doença disponíveis no mercado (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012), mas variações na severidade em diferentes genótipos de soja foram relatadas (MENGISTU et al., 2007; PARIS et al., 2006; PEARSON et al., 1984; WRATHER et al., 2008). As cultivares Bay, Essex, Forrest e Sprite (PEARSON et al., 1984) e Delta, Pineland 3478, Hamilton, Jackson II, Davis e Asgrow 3715 (SMITH; WYLLIE, 1999) foram identificadas como moderadamente resistentes ao patógeno sob condições de campo (PEARSON et al., 1984; SMITH; WYLLIE, 1999). Outras linhagens de soja caracterizadas com moderada resistência são utilizadas como padrão de comparação (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015), destacando-se, DG3905, Manokin (MENGISTU et al., 2011a), DT99-16864 (GILLEN et al., 2016; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011a) e DT99-17483, DT98-7553 e DT99-17554 (MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011a), DT97-4290 (PARIS et al., 2006), DG3905, Manokin (MENGISTU et al., 2011a), DT99-16864 (GILLEN et al., 2016; MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011a), DT99-17483, DT98-7553 e DT99-17554 (MENGISTU et al., 2007; MENGISTU et al., 2011a), e Spencer, PI 594302, PI 567562A, PI 506764, PI 567334, PI 221717, PI 567303B, PI 567335B, PI 567343 e PI 567349A (MENGISTU et al., 2013; TWIZEYIMANA et al., 2012). A avaliação da reação de genótipos de soja é primordial (ALMEIDA et al., 2014) para conhecer a agressividade de isolados do fungo para uso de seleção de genótipos, a fim de fornecer fontes úteis para programas de melhoramento e para o manejo da doença.

A maioria dos estudos para avaliação de germoplasma de soja para resistência a *M. phaseolina* é realizada em campo, com infestação natural do fungo ou inoculação com inóculo previamente preparado em laboratório (MENGISTU et al., 2007; PEARSON et al., 1984). A heterogeneidade das áreas experimentais com relação a características do solo e da microflora pode interferir na interação patógeno-hospedeiro, assim como locais com diferentes condições climáticas podem apresentar resultados inconsistentes dos experimentos. A desuniformidade do inóculo, quer na concentração ou na distribuição, pode reduzir a precisão na avaliação dos genótipos. Outro fator a ser destacado é a dificuldade de avaliação de genótipos de soja em relação à maturidade fisiológica da

planta sobre o período de desenvolvimento dos sintomas, visto que genótipos de soja de diferentes grupos de maturidade não atingem simultaneamente o estágio R7 (início da maturação, no qual as avaliações são realizadas), havendo interferência do clima nos resultados. Além disso, ensaios a campo possibilitam apenas uma avaliação por ano. Diante dessas limitações, há dificuldade no progresso para a identificação de fontes de resistência à podridão de carvão (RADWAN et al., 2014; TWIZEYIMANA et al., 2012).

Para minimizar esses fatores, experimentos em condições controladas, como em casa de vegetação, podem complementar e ajudar a superar as limitações dos experimentos em campo (RADWAN et al., 2014). No entanto, avaliações nessas condições não são amplamente utilizadas devido à falta de técnica confiável (TWIZEYIMANA et al., 2012).

Por meio de experimentos em condições controladas, Surrette; Meints e Trevathan (2006) testaram a técnica de inoculação de substrato (formado por areia e farinha de milho) com *M. phaseolina* em plantas de soja, possibilitando a seleção de genótipos moderadamente resistentes à podridão de carvão. Jimenez (2011), a fim de avaliar a infecção de podridão de carvão em raízes de soja nos estádios vegetativos V1 (folhas unifolioladas completamente desenvolvidas) e V2 (primeira folha trifoliolada completamente desenvolvidas), com milheto japonês infestado, expôs as plântulas a diferentes teores de umidade no solo (saturação de vaso, capacidade de vaso e ponto de murcha permanente). A infecção das raízes das plântulas foi afetada pelo nível de estresse hídrico e pela capacidade de retenção de água de cada tipo de solo, sendo que a infecção das raízes pelo fungo foi maior em solos arenosos, devido à baixa capacidade de retenção de água. O mesmo resultado foi observado em solos com desequilíbrio nutricional.

Outra forma de inoculação da doença, em casa de vegetação, é a técnica da haste cortada (*cut-stem inoculation technique*), a qual permite a avaliação de genótipos de soja para resistência parcial por meio da medição direta do comprimento do tecido necrosado na haste, evitando o efeito de maturidade das plantas (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015; TWIZEYIMANA et al., 2012). Além disso, distinguiu com sucesso cultivares de soja suscetíveis ou resistentes para podridão de carvão em ambiente

controlado (SEXTON; HUGHES; WISE, 2016). Contudo, essa técnica não reproduz o que ocorre naturalmente, o que a torna interessante de ser comparada com outras técnicas de inoculação que simulam o processo natural de infecção do patógeno, no solo.

Os objetivos do trabalho foram a) avaliar a agressividade de isolados brasileiros de *M. phaseolina* inoculados em cultivares de soja pela técnica da haste cortada; b) avaliar a severidade de genótipos de soja a isolados brasileiros de *M. phaseolina* pela técnica da haste cortada; e c) avaliar a intensidade de *M. phaseolina* utilizando-se três técnicas de inoculação: camada de micélio, camada de areia e inóculo agregado ao solo, em diferentes cultivares de soja.

3.3 Material e Métodos

Considerando os objetivos específicos do trabalho, realizaram-se três experimentos, os quais foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação localizados na Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, em 2016 e em 2017.

3.3.1 Seleção de isolado agressivo de *Macrophomina phaseolina* em soja

Vinte e três isolados de *M. phaseolina* foram obtidos da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES), da Coleção de *M. phaseolina* da Embrapa Trigo e da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão (Tabela 1). O trabalho de acesso ao patrimônio dos isolados está credenciado junto ao SisGen, número AE59B9C.

A obtenção de colônia monospórica dos isolados foi realizada adaptando-se a metodologia de Ma; Hill e Hartman (2010). Folíolos de soja foram coletados de plantas de 28 dias, desinfestados com álcool etílico 70% durante 2 minutos, com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% por 5 minutos e enxaguados com água destilada e esterilizada. Um folíolo foi colocado por placa de Petri contendo meio ágar-água 1% (10 g de ágar/L de água destilada). Um disco da borda da colônia de cada isolado foi retirado do meio de manutenção de batata-dextrose-ágar (BDA) e colocado sobre o folíolo. Após dez dias de

crescimento em câmara de incubação, em temperatura de 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz negra (20 W), a formação dos picnídios foi visualizada em microscópio estereoscópico com aumento de 45x. Em câmara de fluxo laminar, cinco picnídios de cada isolado foram coletados e colocados sobre lâmina de vidro previamente esterilizada, contendo uma gota de água destilada e esterilizada. Uma lâmina de vidro esterilizada foi colocada sobre a lâmina com os picnídios, exercendo-se pressão com uma pinça para rompê-los. Com as lâminas dentro de uma placa de Petri de vidro esterilizada, foi visualizada, em microscópio estereoscópico, a liberação de esporos. Após, 20 mL de água destilada e esterilizada foram adicionados à placa de Petri contendo as lâminas, e o conteúdo foi homogeneizado. Da suspensão, foram pipetados 200 µL para cada uma de seis placas por isolado, com meio de cultura BDA, sendo espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski. Após dois a três dias de crescimento em sala de incubação, observou-se a formação de colônias isoladas, fazendo-se a repicagem para placas com BDA.

Tabela 1 - Identificação de isolados de *Macrophomina phaseolina* obtidos da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES), da Coleção de *Macrophomina phaseolina* da Embrapa Trigo e da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão. Passo Fundo, 2016

(Continuação)

Código	Fonte	Ano de coleta	Local de coleta	Hospedeiro
CMES 326	Embrapa Soja	1992	São Gotardo, MG	soja
CMES 329	Embrapa Soja	1998	Lucas do Rio Verde, MT	soja
CMES 341	Embrapa Soja	2000	São Pedro do Iguaçu, PR	soja
CMES 350	Embrapa Soja	2004	Brasília, DF	soja
CMES 351	Embrapa Soja	2004	Correntina, BA	soja
CMES 352	Embrapa Soja	2005	Nova Xavantina, MT	soja
CMES 625	Embrapa Soja	2007	Londrina, PR	soja
CMES 641	Embrapa Soja	2007	Tamarana, PR	soja
CMES 1020	Embrapa soja	2015	Londrina, PR	trigo
CMES 1169	Embrapa Soja	2013	Borrazópolis, PR	soja
CMES 1431	Embrapa Soja	2015	Bonfim, RR	soja
Mp CX	Embrapa Trigo	2012	Coxilha, RS	soja
Mp PF	Embrapa Trigo	2015	Passo Fundo, RS	soja
Mp SA	Embrapa Trigo	2015	Santo Ângelo, RS	soja
Mp 2007	Embrapa Trigo	2007	Passo Fundo, RS	soja
Mp TP	Embrapa Trigo	2014	Três Palmeiras, RS	soja
Mp 13	Embrapa Arroz e Feijão	2014	Formosa, GO	feijão

Tabela 1 - Identificação de isolados de *Macrophomina phaseolina* obtidos da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES), da Coleção de *Macrophomina phaseolina* da Embrapa Trigo e da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão. Passo Fundo, 2016

(Conclusão)

Código	Fonte	Ano de coleta	Local de coleta	Hospedeiro
Mp 18	Embrapa Arroz e Feijão	2014	Santo Antônio de Goiás, GO	feijão
Mp 24	Embrapa Arroz e Feijão	2014	Santo Antônio de Goiás, GO	feijão
Mp 42	Embrapa Arroz e Feijão	2014	Santo Antônio de Goiás, GO	feijão
Mp 47	Embrapa Arroz e Feijão	2014	Rio Verde, GO	feijão
Mp 49	Embrapa Arroz e Feijão	2014	Rio Verde, GO	feijão
Mp 124	Embrapa Arroz e Feijão	2014	Sorriso, MT	feijão

As cultivares de soja BMX Apolo RR e BMX Ativa RR foram selecionadas para a seleção de isolados agressivos de *M. phaseolina* por apresentarem maior severidade à podridão de carvão, e a cultivar V-Max, por apresentar menor severidade à doença, com base em trabalho anterior (COSTAMILAN; PANISSON; CLEBSCH, 2015). As cultivares foram semeadas em potes plásticos com capacidade de 500 mL, contendo substrato vegetal (Maxfértil ®) composto de casca de pinus, cinzas, fosfato natural, vermiculita e adubo químico nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). Foram semeadas quatro sementes das cultivares por pote, deixando-se três plantas por pote após a germinação. Durante a realização do ensaio, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura média de 30 °C.

Seis semanas após a semeadura, as plantas foram inoculadas pela técnica da haste cortada (TWIZEYIMANA et al., 2012). As hastes das plantas foram cortadas com tesoura, 25 mm acima do nó unifoliolado. Bases de ponteira de micropipeta (200 µL) foram pressionadas sobre meio de cultura BDA contendo colônia do fungo com sete dias, e posicionadas, uma para cada planta, sobre as hastes cortadas, promovendo o contato entre o micélio e o tecido da planta. Três dias após a inoculação, as ponteiras foram retiradas, iniciando a avaliação, que consistiu na medição, com auxílio de régua graduada, do

comprimento do tecido necrosado na haste, em milímetros. Foram realizadas cinco medições, a intervalos de três a quatro dias.

O comprimento do tecido necrosado na haste foi usado para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando-se como unidade experimental o dado médio das três plantas em cada pote. Em razão da diferença no número de dias em que as medições de tecido necrosado foram registradas, foi calculada a área relativa abaixo da curva de progresso da doença (ARACPD), dividindo-se os valores da AACPD pelo número de dias entre a primeira e a última data da medição de tecido necrosado. Os valores da ARACPD foram transformados em “log x” na base 10, para normalizar os dados e corrigir para variância não-constante entre amostras.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, com 69 tratamentos constituídos de um bifatorial (cultivar de soja x isolado do fungo), com 10 repetições.

3.3.2 Seleção de técnica de fenotipagem de cultivares de soja a *Macrophomina phaseolina*

Vinte cultivares de soja cultivadas no Brasil foram selecionadas para esse estudo (Tabela 2), inoculadas com quatro técnicas: haste cortada, camada de micélio, camada de areia e inóculo agregado ao solo, utilizando-se dois isolados de *M. phaseolina*, Mp CX e CMES 1169, selecionados pelos resultados obtidos no experimento anterior.

A metodologia da técnica da haste cortada foi a mesma descrita em 3.3.1.

A técnica de inoculação com camada de micélio foi adaptada de Dorrance; McClure e Martin (2003) e de Costamilan et al. (2013): potes plásticos, com capacidade de 500 mL, foram preparados com uma camada de 1 cm de espessura de vermiculita (Terra Nobre®) no fundo, umedecida com água; após, foi depositado sobre a mesma um disco de meio de cultura BDA com a colônia de *M. phaseolina* com sete dias de desenvolvimento em câmara de incubação, em temperatura de 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo

de 12 horas, com a face do micélio voltada para cima, cobrindo-o com outra camada de vermiculita de 5 cm de vermiculita umedecida. Sobre essa camada, foram semeadas quatro sementes de cada uma das 20 cultivares de soja (Tabela 2), sendo cobertas com 2 cm de substrato vegetal (Maxfértil ®), umedecido. Sete dias após a semeadura, foi realizado raleio, mantendo-se três plantas por pote.

Tabela 2 - Cultivares de soja utilizadas para avaliação da reação a *Macrophomina phaseolina* por diferentes técnicas de inoculação. Passo Fundo, 2016

Cultivar de soja	Obtento
V-Max	Syngenta
V-Max RR	Syngenta
V-Top RR	Syngenta
BMX Apolo RR	DonMario Sementes ®
BMX Ativa RR	Brasmax Genética
BMX Potência RR	Brasmax Genética
BMX Turbo RR	Brasmax Genética
BMX Elite IPRO	Brasmax Genética
Pioneer 95Y52	DuPont Pioneer ®
M 6410 IPRO	Monsoy
DM 6563 RSF IPRO	DonMario Sementes ®
DM 4612	DonMario Sementes ®
SYN 1359S IPRO	Syngenta
SYN 13561 IPRO	Syngenta
BRS 284	Embrapa
BRS 1001 IPRO	Embrapa
BRS 359 RR	Embrapa
BRS 5601 RR	Embrapa
NA 5909 RG	Nidera Sementes
TMG 7062 IPRO	Tropical Melhoramento e Genética

Para a técnica de inoculação com camada de areia, adaptada de Surrette; Meints e Trevathan (2006), o preparo do inóculo constitui-se da adição, em Erlenmeyer (250 mL), de 100 mL de areia fina, 5,36 mL de farinha de milho fina e 40 mL de água destilada, sendo preparados 30 frascos de inóculo por isolado do fungo. Os Erlenmeyers foram esterilizados a 121 °C por 30 minutos. Após o resfriamento, em câmara asséptica, foram adicionados 12 discos (5 mm de diâmetro) de micélio do fungo, com sete dias, em cada Erlenmeyer. Esses foram mantidos em câmara de incubação a, aproximadamente, 30 °C durante 15 dias, sendo

agitados diariamente, até a completa colonização do substrato pelo fungo. Após esse período, o substrato foi deixado secar em bandejas forradas com papel, em casa de vegetação, por dez dias.

Para a inoculação, foram utilizados potes plásticos (500 mL) com uma camada de 1 cm de espessura de vermiculita (Terra Nobre ®) no fundo, que foi umedecida com água. Depositou-se sobre a mesma uma camada de 30 mL de areia inoculada com o fungo, cobrindo-a com uma camada de 5 cm de vermiculita umedecida. Sobre essa camada foram semeadas quatro sementes de cada cultivar de soja, que foram cobertas com substrato vegetal umedecido (Maxfertil ®). Sete dias após a semeadura, foi realizado o raleio, mantendo-se três plantas por pote.

Na inoculação com inóculo agregado ao solo, foram utilizados grãos de trigo colonizados por *M. phaseolina*, com a técnica adaptada de Lima (2007). Em Erlenmeyer (500 mL), foram adicionados 200 g de grãos de trigo, completando com água destilada, sendo preparados cinco Erlenmeyers para cada isolado. Decorridas quatro horas, escoou-se o excesso de água com o auxílio de uma peneira. Em seguida, os Erlenmeyers foram esterilizados a 121 °C por 30 minutos. Após o resfriamento, em câmara asséptica, foram adicionados 12 discos (5 mm de diâmetro) de micélio do fungo em cada Erlenmeyer, os quais foram mantidos em câmara de incubação a, aproximadamente, 30 °C durante 15 dias, sendo agitados diariamente até a completa colonização dos grãos. Após, os grãos foram colocados sobre papel para secar em casa de vegetação, por dez dias a, aproximadamente, 30 °C, sendo triturados em liquidificador após completamente secos.

Para a inoculação, aproximadamente 50 kg de substrato vegetal (Maxfertil ®) foram secos sobre papel, em casa de vegetação, durante sete dias, sendo revolvidos diariamente para uniformizar a secagem. Posteriormente, misturaram-se 20 mg do inóculo de grãos triturados para cada 1.200 mL de mistura de substrato vegetal seco e solo, na proporção 2:1 (JIMENEZ, 2011). Em pote plástico (500 mL), foram adicionados 300 g da mistura de substrato vegetal (Maxfertil ®) e solo de campo (2:1) e semeadas quatro sementes de soja. Sete dias após a semeadura, foi realizado o raleio, mantendo-se três plantas por pote. Quinze dias após a

semeadura, reduziu-se a disponibilidade de água para causar estresse hídrico às plantas, mantendo-se a capacidade de campo (CC) em 60%, repetindo-se por cinco vezes em intervalos de dois dias.

A umidade nos potes plásticos foi ajustada diariamente para 60% da capacidade de campo (0,6 CC) por medição da variação de massa do sistema vaso + substrato + solo e pela adição de água na quantidade suficiente para o retorno do sistema à condição estabelecida de umidade.

Para se ajustar a capacidade de campo em 60% (0,6 CC), foram realizados ensaios preliminares para a mistura substrato + solo: três vasos com a mistura substrato + solo (2:1), contendo 300 g, 400 g e 500 g, respectivamente, foram imersos em um recipiente com água por 72 h, visando à saturação completa do espaço aéreo. Após esse tempo, os vasos foram retirados da imersão, tendo sido coberta a superfície superior, para evitar a evaporação da água, e deixados abertos os orifícios na parte inferior para possibilitar a drenagem do excesso de água. A aferição de variação de massa do sistema pote + substrato + solo foi realizada duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde), ao longo de cinco dias, até que fosse atingida massa constante. Nesse momento, quando a drenagem, sob a ação da gravidade, tornou-se desprezível, admitiu-se como estando a mistura solo + substrato em CC. Amostras da mistura solo + substrato foram colocadas em recipientes metálicos lacrados e enviadas para determinação laboratorial da umidade gravimétrica da mistura substrato + solo em CC. Uma vez conhecida a umidade gravimétrica, definiu-se, a partir da proporção conhecida em massa (g) de água para a massa da mistura substrato + solo (g), as seguintes relações:

(1) Capacidade de campo (CC):

(a) 1.000 g de mistura substrato + solo: 1.068 mL (g) de água

(b) Para x g de mistura substrato + solo, colocar y mL (g) de água

(2) 60% da capacidade de campo (0,6 CC):

(a) 1.000 g de mistura substrato + solo: 641 mL de água

(b) para x g de mistura substrato + solo, colocar z mL (g) de água

Nas três técnicas de inoculação (camada de micélio, camada de areia e inóculo agregado ao solo), as plantas foram coletadas no estágio R1 (início de florescimento, pela escala de Fehr et al., 1971), estágio fenológico da soja em que os sintomas da podridão de carvão passam a ser mais evidentes (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). As raízes foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de substrato e areia. Em câmara de fluxo laminar, foi realizada a desinfestação das plantas, utilizando-se NaOCl a 0,5% por 3 minutos, seguido de duplo enxágue com água destilada e esterilizada. Após, as raízes foram colocadas em papel esterilizado do tipo mata-borrão. De cada planta, cinco fragmentos do colo, cinco de regiões escurecidas da raiz principal e cinco de raízes secundárias foram retirados e colocados em placa de Petri contendo meio ágar-água a 1%, preparando-se uma placa para cada conjunto de cinco fragmentos de cada setor da planta. Sete dias após o isolamento, em microscópio estereoscópico com aumento de até 45x, foi identificada presença ou ausência de microescleródios de *M. phaseolina* em cada fragmento isolado, resultando na incidência da doença; a severidade foi avaliada pela porcentagem de fragmentos infectados pelo fungo em cada placa de Petri.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, com 160 tratamentos constituídos de um trifatorial (cultivar de soja x técnica de inoculação x isolado do fungo), com 5 repetições.

3.3.3 Reação de genótipos de soja a *Macrophomina phaseolina*

Utilizou-se coleção de 12 genótipos de soja, sendo 11 genótipos classificados como moderadamente resistentes e um classificado como suscetível ao fungo, com base em trabalhos anteriores (MENGISTU et al., 2013; TWIZEYIMANA et al., 2012), e disponibilizados pelo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja (Tabela 3). Os genótipos de soja foram inoculados com isolados de *M. phaseolina*, identificados Mp CX e

CMES 1169 (Tabela 1), selecionados no experimento I, com a técnica da haste cortada, descrita anteriormente. A severidade da doença foi avaliada pela medição do comprimento do tecido necrosado na haste das plantas, calculando-se a área relativa abaixo da curva de progresso da doença (ARACPD), conforme já descrito.

O delineamento experimental foi em blocos interamente casualizados, com 24 tratamentos constituídos de um bifatorial (genótipo de soja x isolado do fungo), com 5 repetições.

Tabela 3 - Genótipos de soja classificados como moderadamente resistentes ou suscetível à podridão de carvão, utilizados em avaliações com isolados de *Macrophomina phaseolina*. Passo Fundo, 2017

Genótipo	Identificação Embrapa Trigo	Origem	Classificação*
DT 97-4290	Mp 1	Estados Unidos	moderadamente resistente
Spencer	Mp 2	Estados Unidos	moderadamente resistente
Pharaoh	Mp 3	Estados Unidos	suscetível
PI 594302	Mp 4	Japão	moderadamente resistente
PI 567562A	Mp 5	China	moderadamente resistente
PI 506764	Mp 6	Japão	moderadamente resistente
PI 567334	Mp 7	China	moderadamente resistente
PI 221717	Mp 8	África do Sul	moderadamente resistente
PI 567303B	Mp 9	China	moderadamente resistente
PI 567335B	Mp 11	China	moderadamente resistente
PI 567343	Mp 12	China	moderadamente resistente
PI 567349A	Mp 13	China	moderadamente resistente

Fonte: *Mengistu et al. (2013) e Twizeyimana et al. (2012).

3.3.4 Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o software R (R CORE TEAM, 2017).

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Seleção de isolado agressivo de *Macrophomina phaseolina* em soja

Pelo teste de haste cortada, foram verificadas diferenças significativas de severidade entre todos os isolados de *M. phaseolina* avaliados, por meio do desenvolvimento diferenciado do comprimento do escurecimento da haste. Entre as três cultivares de soja utilizadas, também foi verificado diferentes níveis de severidade causados por esses isolados (Tabela 4).

Tabela 4 - Área relativa abaixo da curva de progresso da doença (ARACPD) de isolados de *Macrophomina phaseolina* inoculados em cultivares de soja, com a técnica da haste cortada. Passo Fundo, 2016-2017

Isolado de <i>Macrophomina phaseolina</i>	Cultivar de soja		
	BMX Apolo RR	BMX Ativa RR	V-Max
	ARACPD		
Mp 49	42,29 a	38,58 a	16,79 b
Mp 124	37,53 a	47,74 a	18,32 b
Mp CX	31,49 a	48,39 a	29,77 a
CMES 1020	27,32 a	32,97 a	27,00 a
Mp TP	21,99 b	34,19 a	16,05 b
CMES 641	21,67 b	42,35 a	28,40 a
CMES 1431	21,26 b	27,49 b	21,69 b
CMES 625	20,41 b	34,27 a	20,45 b
CMES 326	19,75 b	38,36 a	21,08 b
Mp SA	19,75 b	37,41 a	18,05 b
CMES 1169	19,03 b	31,16 a	34,16 a
CMES 329	18,92 b	41,25 a	24,59 a
Mp 47	17,91 b	34,89 a	14,06 b
Mp 2007	17,64 b	18,53 c	16,71 b
Mp 13	16,73 c	24,93 b	5,97 d
Mp 341	15,64 c	34,10 a	27,20 a
Mp 18	15,05 c	28,74 b	6,29 d
CMES 350	14,90 c	34,20 a	25,53 a
CMES 352	14,90 c	27,82 b	19,59 b
CMES 351	14,82 c	31,25 a	23,94 a
Mp PF	14,54 c	19,26 c	17,32 b
Mp 24	14,54 c	28,68 b	5,93 d
Mp 42	11,86 c	37,09 a	11,31 c
ARACPD geral	19,44 B	32,62 A	17,74 B
C. V. (%)	14,49	11,98	19,38

Nota: Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Para a cultivar BMX Apolo RR, o isolado com maior ARACPD foi o Mp 49. Mas os isolados Mp 124, Mp CX e CMES 1020 apresentaram ARACPD semelhante ao Mp 49. O isolado Mp 42 resultou na menor ARACPD, mas ficou semelhante aos isolados Mp 24, Mp PF, CMES 351, CMES 352, CMES 350, Mp 18, CMES 341 e Mp 13.

Para a cultivar BMX Ativa RR, o isolado com maior ARACPD foi o Mp CX, mas ficou semelhante a maioria dos isolados, e diferiu de Mp 18, Mp 24, CMES 352, CMES 1431 e Mp 13. O isolado Mp 2007 apresentou menor ARACPD, sendo semelhante apenas de Mp PF.

Para a cultivar V-Max, o isolado CMES resultou em maior ARACPD, que foi semelhante aos isolados Mp CX, CMES 641, CMES 341, CMES 1020, CMES 350, CMES 329 e CMES 351. O isolado com menor ARACPD foi Mp 24, mas os isolados Mp 13 e Mp 18 apresentaram ARACPD semelhante ao Mp 24.

Com maior desenvolvimento de severidade da doença, destacou-se a cultivar BMX Ativa RR, com maior ARACPD; com menor ARACPD, foram classificadas as cultivares BMX Apolo RR e V-Max (Tabela 4).

Pelos resultados observados, constatou-se complexa variabilidade quanto à agressividade da população de *M. phaseolina*. A variabilidade na agressividade desse patógeno também foi relatada por Claudino e Soares (2014) ao inocular em mamona 27 isolados brasileiros do fungo, oriundos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas.

Pode-se afirmar ainda, que não foi identificada especificidade do hospedeiro entre os isolados testados, o que pode ser observado, por exemplo, pelo comportamento do isolado Mp 124, oriundo de feijão e considerado um dos mais agressivos quando inoculado nas cultivares de soja BMX Apolo RR e BMX Ativa RR. Essa característica do fungo também foi observada em ensaio realizado em casa de vegetação, em que isolados de *M. phaseolina* de algodão, milho, sorgo e soja não diferiram na colonização de raízes, à exceção de isolados de milho, que foram específicos a raízes de milho (SU et al., 2001). Também não foi observada especificidade de hospedeiro do patógeno quando

plantas de morangueiro foram inoculadas com isolados de *M. phaseolina* obtidos de outras espécies de hospedeiros (MAHMOUDI; GHASHGHAIE, 2012).

A partir dos resultados obtidos nesse experimento, os isolados Mp CX e CMES 1169 apresentaram-se consistentemente entre os mais agressivos, inclusive estando entre os mais agressivos para a cultivar V-Max, que resultou menor valor de ARACPD. Dessa forma, esses isolados foram utilizados para a seleção de técnica de inoculação de *M. phaseolina*.

3.4.2 Seleção de técnica de fenotipagem de cultivares de soja a *Macrophomina phaseolina*

a) Técnica da haste cortada: houve reações diferenciadas entre cultivares comerciais de soja inoculadas com o isolado Mp CX, o que não ocorreu com o isolado CMES 1169 (Tabela 5). Com Mp CX, as cultivares M 6410 IPRO, BMX Ativa RR, BRS 1001 IPRO, BRS 284, NA 5909 RG, BRS 5601 RR, SYN 1359S IPRO, DM 6563 RSF IPRO, V-Top RR, DM 4612, SYN 13561 IPRO, NA 5909 RG, BMX Elite IPRO, V-Max RR, BMX Apolo RR, BRS 359 RR e Pionner 95Y52 apresentaram maior ARACPD, pelo valor do comprimento do tecido necrosado, e a cultivar TMG 7062 IPRO foi classificada com menor ARACPD. Os isolados de *M. phaseolina* apresentaram diferença estatística entre si quanto à agressividade, destacando-se o isolado CMES 1169 com maior valor de ARACPD.

A cultivar V-Max foi classificada entre as cultivares com menor ARACPD quando inoculada com o isolado Mp CX, sendo semelhante a cultivar BMX Turbo RR, e diferiu apenas da cultivar TMG 7062 IPRO que resultou em menor ARACPD. Esse resultado coincide com os obtidos na avaliação da reação de linhagens de soja do programa de melhoramento genético da Embrapa Trigo, que utiliza rotineiramente o isolado Mp CX com a técnica da haste cortada e a cultivar V-max como testemunha com menor ARACPD (COSTAMILAN et al., 2017).

Tabela 5 - Área relativa abaixo da curva de progresso da doença (ARACPD) para infecção de cultivares comerciais de soja inoculadas com os isolados CMES 1169 e Mp CX de *Macrophomina phaseolina* pela técnica da haste cortada. Passo Fundo, 2016-2017

Cultivar de soja	Isolado de <i>Macrophomina phaseolina</i>	
	CMES 1169	Mp CX
ARACPD		
V-Top RR	54,42 n.s.	42,32 a
BRS 1001 IPRO	48,74	47,28 a
BMX Turbo RR	42,85	26,37 b
BMX Potência RR	38,97	45,69 a
V-Max RR	38,37	38,18 a
Pioneer 95Y52	32,43	35,22 a
SYN 13561 IPRO	31,30	41,81 a
DM 6563 RSF IPRO	30,36	44,03 a
M 6410 IPRO	28,44	56,25 a
NA 5909 RG	28,41	40,00 a
BMX Ativa RR	26,86	49,45 a
BRS 284	26,01	46,70 a
TMG 7062 IPRO	24,44	15,77 c
BRS 359 RR	24,28	37,47 a
BMX Elite IPRO	22,27	38,77 a
BMX Apolo RR	19,92	38,06 a
SYN 1359S IPRO	19,26	44,88 a
DM 4612	16,09	42,01 a
V-Max	15,13	31,18 b
BRS 5601 RR	14,63	45,28 a
ARACPD geral	38,56 A	27,30 B
C. V. (%)	9,59	18,87

Nota: n.s.: diferenças não significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Com o objetivo de avaliar essa mesma técnica de inoculação, Twizeyimana et al. (2012) observaram diferença na severidade da doença entre nove genótipos de soja, sendo que os resultados corresponderam aos obtidos em condição de campo. Ishikawa et al. (2018) também obtiveram resultados similares de severidade de podridão de carvão em cultivares avaliadas em campo com a severidade dessas mesmas cultivares avaliadas em casa de vegetação pela técnica da haste cortada.

b) Inoculação de substrato: com relação às três técnicas de inoculação do substrato testadas (camada de areia, camada de micélio e inóculo agregado ao solo), todas induziram sintomas nas plantas inoculadas. A intensidade da doença, determinada pela incidência e a severidade da podridão de carvão com o isolado CMES 1169, apresentou diferenças tanto entre técnicas de inoculação quanto entre partes da planta afetada (Tabela 6). A técnica de inoculação com camada de areia destacou-se das demais técnicas, pois apresentou plantas com maiores incidência e severidade no isolamento de raiz secundária, de raiz principal e de colo. Essa técnica apenas não diferiu estatisticamente da técnica de inoculação do inóculo agregado ao solo no isolamento do colo.

Tabela 6 - Intensidade média de podridão de carvão em 20 cultivares comerciais de soja, inoculadas com o isolado CMES 1169 de *Macrophomina phaseolina* pelas técnicas de inoculação de substrato. Passo Fundo, 2016-2017

Técnica de inoculação	Raiz secundária		Raiz principal		Colo	
	I*	S**	I	S	I	S
	%					
Camada de areia	79,87 a	53,30 a	83,17 a	59,58 a	32,08 a	14,10 a
Inóculo agregado ao solo	59,33 b	33,87 b	69,33 b	45,80 b	26,67 a	13,73 a
Camada de micélio	29,67 c	16,47 c	21,00 c	10,93 c	1,00 b	0,40 b
C. V. (%)	27,44	33,36	25,04	29,22	68,05	83,63

Incidência (calculada pela presença ou ausência de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* em cada fragmento); **Severidade (calculada pela porcentagem de fragmentos infectados por *Macrophomina phaseolina*).

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

Resultados similares foram obtidos na incidência e na severidade da doença quando as cultivares de soja foram inoculadas com o isolado Mp CX (Tabela 7). Nesse caso, a técnica de inoculação da camada de areia também apresentou maiores incidência e severidade quando foi realizado o isolamento de raiz secundária, de raiz principal e de colo. As técnicas de inoculação do inóculo agregado ao solo e da camada de micélio não diferiram estatisticamente quanto às partes isoladas da planta.

Tabela 7 - Intensidade média de podridão de carvão em 20 cultivares comerciais de soja, inoculadas com o isolado Mp CX de *Macrophomina phaseolina* pelas técnicas de inoculação de substrato. Passo Fundo, 2016-2017

Técnica de inoculação	Raiz secundária		Raiz principal		Colo	
	I*	S**	I	S	I	S
%						
Camada de areia	80,67 a	58,33 a	83,33 a	60,80 a	36,00 a	16,20 a
Inóculo agregado ao solo	54,33 b	29,47 b	42,00 b	25,80 b	8,67 b	2,87 b
Camada de micélio	54,00 b	31,60 b	35,00 b	21,27 b	5,67 b	1,87 b
C. V. (%)	28,13	33,36	33,93	44,99	68,05	120,23

*Incidência (calculada pela presença ou ausência de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* em cada fragmento); **Severidade (calculada pela porcentagem de fragmentos infectados por *Macrophomina phaseolina*).

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

Contaminando-se o substrato, a diferença entre as técnicas de inoculação do fungo em soja foi evidente, com relação à incidência e à severidade. A técnica da camada de areia permite a simulação do processo natural de infecção e a uniformização da quantidade de inóculo no substrato de cultivo, que são alguns dos fatores mais importantes na seleção de plantas para resistência a determinado patógeno (CLAUDINO, 2013). Esse mesmo resultado foi observado em experimentos realizados em casa de vegetação, por Surrete; Meints; Trevathan (2006) e, em câmara de crescimento, por Bristow e Wyllie (1984).

Como os isolados do fungo não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 8), foi selecionado o isolado Mp CX para a verificação de incidência e severidade no conjunto de 20 cultivares de soja.

Tabela 8 - Intensidade média de podridão de carvão em 20 cultivares comerciais de soja, inoculadas com os isolados CMES 1169 e Mp CX de *Macrophomina phaseolina* pela técnica de camada de areia. Passo Fundo, 2016-2017

Isolado de <i>Macrophomina phaseolina</i>	Incidência	Severidade
	%	
Mp CX	80,67 n.s.	58,33 n.s.
CMES 1169	79,87	53,30
C. V. (%)	36,33	44,23

Nota: n.s.: diferenças não significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

As 20 cultivares de soja testadas não diferiram significativamente quanto à intensidade da doença quando as plantas foram inoculadas com o isolado Mp CX, pela técnica da camada de areia (Tabela 9). As cultivares que apresentaram valores menores de incidência e de severidade foram TMG 7062 IPRO, NA 5909 RG, SYN 1359S IPRO e V-Max.

Tabela 9 - Intensidade média de podridão de carvão em 20 cultivares comerciais de soja, inoculadas com o isolado Mp CX de *Macrophomina phaseolina*, pela técnica da camada de areia. Passo Fundo, 2016-2017

Cultivar de soja	Incidência	Severidade
	%	
BMX Potência RR	93,33 n.s.	68,00 n.s.
BRS 359 RR	93,33	72,00
SYN 13561 IPRO	93,33	54,00
V-Max RR	93,33	70,00
BRS 284	90,00	72,00
DM 6563 RSF IPRO	90,00	58,00
BMX Elite IPRO	86,67	63,33
BMX Turbo RR	86,67	55,33
BMX Apolo RR	83,33	58,67
M 6410 IPRO	83,33	54,00
BRS 5601 RR	83,33	65,33
V-Top RR	83,33	68,00
Pioneer 95Y52	82,50	63,67
BRS 1001 IPRO	80,00	54,67
DM 4612	72,86	56,05
BMX Ativa RR	70,00	43,33
SYN 1359S IPRO	70,00	36,00
V-Max	70,00	41,33
NA 5909 RG	56,67	34,00
TMG 7062 IPRO	43,33	28,67
C. V. (%)	16,89	27,16

Nota: n.s.: diferenças não significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Procedimentos padrões de inoculação e de teste de resistência de genótipos de soja ainda não foram amplamente adotados na pesquisa da resistência de *M. phaseolina*, o que limita a comparação de resultados obtidos entre pesquisadores (TWIZEYIMANA et al., 2012). Considerando a perspectiva do melhorista de plantas, a técnica de inoculação da

haste cortada poderia servir como metodologia padrão pela rapidez de resposta e pela facilidade de execução, além de possibilitar a diferenciação da reação de cultivares de soja, como observado neste trabalho. Resultados semelhantes foram constatados por Mengistu; Rupe e Wrather (2015) e Sexton; Hughes e Wise (2016), que distinguiram genótipos de soja com níveis de infecção intermediária ao fungo. A compreensão da genética, do comportamento do hospedeiro e do patógeno no processo de desenvolvimento da doença, e da interação patógeno-hospedeiro são importantes para programa de melhoramento confiável para resistência à doença. A complexa variabilidade genética do fungo é um dos fatores que dificulta estudos sobre a resistência genética à podridão de carvão (KHAN, 2007).

3.4.3 Reação de genótipos de soja a *Macrophomina phaseolina*

Todos os genótipos de soja avaliados desenvolveram doença durante o experimento, indicando que não houve imunidade ou resistência completa a *M. phaseolina*, sendo condizente com os resultados obtidos por Mengistu et al. (2013). A severidade da doença foi variável, quando inoculados com os isolados CMES 1169 e Mp CX (Tabela 10).

Para o isolado CMES 1169, o genótipo com maior ARACPD foi o PI 567562A. Mas, os genótipos PI506764, PI 567335B, PI 594302, Pharaoh, PI 567303B, DT 97-4290, PI 567343 e PI 221717 apresentaram ARACPD semelhante ao PI 567562A. O genótipo PI 567334 resultou em menor ARACPD.

Para o isolado Mp CX, o genótipo PI 567562A também apresentou maior ARACPD, mas foi semelhante aos genótipos Pharaoh, PI 594302, PI 506764, PI 567349A e PI 567343. O genótipo PI 567303B resultou em menor ARACPD.

O genótipo DT 97-4290 apresentou menor ARACPD comparado ao genótipo Pharaoh, ao serem inoculados com o isolado Mp CX, confirmando dados obtidos por Paris et al. (2006), que o classificaram como moderadamente resistente, enquanto o segundo é classificado como suscetível (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015;

TWIZEYIMANA et al., 2012). Esses resultados foram condizentes com os obtidos por Mengistu et al. (2007), em ensaios de campo e com avaliação de índice de unidade formadora de colônia (IUFs). No entanto, quando esses genótipos foram inoculados com o isolado CMES 1169 resultaram na ARACPD semelhante.

Tabela 10 - Área relativa abaixo da curva de progresso da doença (ARACPD) de genótipos de soja moderadamente resistentes ou suscetível à podridão de carvão, inoculados com isolados CMES 1169 e Mp CX de *Macrophomina phaseolina* pela técnica da haste cortada. Passo Fundo, 2017

Genótipo de soja	Isolado de <i>Macrophomina phaseolina</i>	
	CMES 1169	Mp CX
ARACPD		
PI 567562A	30,60 a	30,19 a
PI 506764	25,34 a	16,75 a
PI 567335B	22,91 a	9,14 b
PI 594302	22,84 a	17,14 a
Pharaoh	22,75 a	19,78 a
PI 567303B	22,56 a	3,00 c
DT 97-4290	21,71 a	8,36 b
PI 567343	20,53 a	12,56 a
PI 221717	20,10 a	7,94 b
Spencer	14,04 b	7,78 b
PI 567349A	13,65 b	14,29 a
PI 567334	8,82 c	8,30 b
ARACPD geral	19,57 A	11,16 B
C. V. (%)	11,81	19,99

Nota: Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O genótipo Spencer também apresentou menor valor da ARACPD que o genótipo Pharaoh, quando inoculados por ambos os isolados testados, resultado também relatado por Twizeyimana et al. (2012). O genótipo Spencer apresentou menor valor da ARACPD que o genótipo DT 97-4290, quando inoculado com o isolado CMES 1169. Resultado semelhante foi obtido por Pawlowski; Hill e Hartman (2015), em que genótipos de soja apresentaram menor comprimento do tecido necrosado na haste que o genótipo DT97-4290, por meio da técnica da haste cortada. Entretanto, discordando dos resultados obtidos por Twizeyimana et al. (2012). Mas quando inoculados pelo

isolado Mp CX, os genótipos Spencer e DT 97-4290, resultaram na ARACPD semelhante.

Considerando o genótipo de soja DT97-4290 como padrão moderadamente resistente a *M. phaseolina*, os genótipos Spencer e PI 567334, apresentaram-se consistentemente entre os genótipos de menor ARACPD, inclusive menor ARACPD que o genótipo Pharaoh, quando inoculados com os isolados CMES 1169 e Mp CX. Assim esses genótipos poderiam ser úteis em programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares resistentes à podridão de carvão (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015). Da mesma forma, o isolado brasileiro Mp CX apresentou resultados similares com trabalhos anteriores, frente aos genótipos de soja testados. Logo, esse isolado também poderia ser incluído em programas de melhoramento.

A identificação de genótipos mais resistentes pode ser o início da identificação e do mapeamento de locos de caracteres quantitativos de resistência (QTLs), associados ao genoma da soja, para a introgressão via marcadores para resistência à podridão de carvão (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015). Ainda não foi relatado nenhum QTL controlando a resistência moderada ao fungo em soja, mas há relatos em feijoeiro-comum, no feijão-caupi e no sorgo (HERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2009; MUCHERO; EHLERS; ROBERTS, 2011; REDDY et al., 2008).

3.5 Conclusões

Há diferença de agressividade entre isolados de *M. phaseolina*, sendo os isolados CMES 1169 e Mp CX os mais agressivos, possibilitando a incorporação destes em estudos da resistência de genótipos de soja ao fungo.

As cultivares de soja apresentam reação distinta de severidade à podridão de carvão pela técnica de inoculação da camada de areia e da haste cortada, sendo esta última técnica de inoculação eficiente para seleção de fontes úteis para o desenvolvimento de genótipos de soja com maiores níveis de resistência à podridão de carvão, pela rapidez de resposta e pela facilidade de execução.

As cultivares de soja TMG 7062 e V-Max apresentaram-se consistentemente entre as cultivares de menor Área Relativa Abaixo da Curva de Progresso da Doença (ARACPD) pela técnica da haste cortada, e podem ser incluídas em programas de melhoramento para resistência à podridão de carvão de soja.

Os genótipos de soja DT97-4290, Spencer e PI 567334 apresentaram-se consistentemente entre os genótipos de menor ARACPD pela técnica da haste cortada, e podem ser incluídos em programas de melhoramento para resistência à podridão de carvão de soja.

4 CAPÍTULO II

Variabilidade genética de isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina* pelo marcador molecular de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP)

4.1 Resumo

Macrophomina phaseolina é um fungo polífago, que infecta mais de 500 espécies de plantas. Em soja, é o agente causal da podridão do carvão, uma das doenças radiciais mais importantes e prevalentes na cultura. Informações quanto à variabilidade genética do patógeno ainda são escassas. Essas informações são essenciais aos programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de cultivares de soja comerciais resistentes à doença. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de isolados brasileiros de *M. phaseolina* com base no marcador molecular de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). Vinte e três isolados brasileiros do fungo, obtidos de distintos hospedeiros (soja, feijão e trigo), origens geográficas e anos de coleta, foram analisados pelo marcador molecular AFLP, com dez combinações de iniciadores. A análise do agrupamento dos indivíduos foi realizada pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) e a distância genética foi realizada pelo coeficiente de Jaccard. No agrupamento dos isolados considerando o hospedeiro, foram formados três grupos: no grupo I, foram incluídos treze isolados de soja e um isolado de feijão; no grupo II, foram incluídos três isolados de feijão, dois isolados de soja e um isolado de trigo; no grupo III, restaram três isolados de feijão. O agrupamento dos isolados considerando origem geográfica também formou três grupos: o grupo I, por isolados pertencentes a Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná, Distrito Federal, Bahia e Rio Grande do Sul; o grupo II, por isolados de Goiás, Mato Grosso e Roraima; o grupo III, por isolados de Goiás. Considerando-se o ano de coleta, também houve agrupamentos em três conjuntos: o grupo I, foi formado por isolados coletados em 1992, 1998, 2000, 2004, 2007, 2012, 2013, 2014 e 2015; no grupo II, foram incluídos isolados de 2014, 2005 e 2015; e, no grupo III, isolados coletados em 2014. Os resultados indicaram que a análise da variabilidade genética com base na técnica AFLP evidenciou alta variabilidade entre os isolados de *M. phaseolina*, com relação ao hospedeiro, à origem geográfica e ao ano de coleta. Essas informações podem fornecer informações necessárias para projetar métodos de controle mais eficazes e, assim, contribuir no desenvolvimento e na liberação de cultivares de soja resistentes à podridão de carvão.

Palavras-chave: 1. *Glycine max*. 2. Podridão de carvão. 3. Resistência genética.

4.2 Introdução

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. (GOIDANISH, 1947), é um fungo anamórfico (KAUR et al., 2012), que pertence ao filo Ascomycota e a família Botryosphaeriaceae (LUNA et al., 2017). Esse fungo é polífago e infecta mais de 500 espécies de plantas, incluindo cereais, leguminosas e vegetais (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Apesar da ampla gama de hospedeiros, é identificado como única espécie do gênero *Macrophomina* (RADWAN, 2014).

O patógeno apresenta ampla distribuição geográfica e foi identificado na maioria dos continentes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (SEXTON; HUGHES; WISE, 2016). Tem sido relatado o aumento da sua incidência em diversas espécies de culturas em todo o mundo, destacando a importância da doença causada pelo fungo para a produção agrícola em regiões propensas à seca (ISLAM et al., 2012).

Macrophomina phaseolina, é o agente causal da podridão de carvão em soja (*Glycine max* (L.) Merr.), um dos fungos prevaletentes em infecção radicial na cultura (ALMEIDA et al., 2003). Na lavoura, a severidade da doença é expressiva em condições de elevada temperatura e de estresse hídrico. Os sintomas característicos são apodrecimento radicial, murcha foliar, maturação antecipada e formação incompleta de grãos (MENGISTU; RUPE; WRATHER, 2015).

A estratégia mais prática e econômica no manejo de doença de plantas é o uso de cultivares resistentes. No entanto, cultivares comerciais com resistência completa para *M. phaseolina* não são relatadas em soja ou em outros hospedeiros (COSER et al, 2017; MENGISTU et al., 2013; PARIS et al., 2006; PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015). Alguns genótipos são caracterizados com resistência moderada, sendo utilizados como padrão de comparação (PAWLOWSKI; HILL; HARTMAN, 2015).

Um dos entraves das pesquisas para resistência a essa doença tem sido atribuído à variabilidade genética do patógeno, uma vez que a complexidade genética do mesmo ainda é pouco conhecida (SEXTON; HUGHES; WISE, 2016). Técnicas moleculares

indicaram a variabilidade genética entre isolados de *M. phaseolina* (ALMEIDA et al., 2003). Marcadores moleculares, como RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) e RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) foram utilizados para caracterizar populações de *M. phaseolina* de distintos hospedeiros e regiões geográficas (SALEH et al., 2010).

A técnica RAPD foi útil na avaliação de 55 isolados brasileiros de *M. phaseolina*, obtidos de raízes de soja em diferentes Estados do Brasil, sendo divididos em três grupos. A variabilidade encontrada foi baixa entre isolados do mesmo grupo, no entanto, a divergência entre os grupos foi alta (ALMEIDA et al., 2003). Os autores consideraram que a variabilidade genética foi originada, possivelmente, pelo parassexualismo, com a fusão de células de diferentes hifas. RAPD foi usada por Su et al. (2001), que verificaram que isolados de *M. phaseolina* originados a partir de um dado hospedeiro foram geneticamente semelhantes entre si, mas distintos quando obtidos a partir de outros hospedeiros. Esse resultado também foi verificado por Purkayastha et al. (2006), ao analisarem a variabilidade genética de 59 isolados indianos do fungo, oriundos de diferentes hospedeiros.

De acordo com Jana et al. (2003), a avaliação da variabilidade genética de 43 isolados de *M. phaseolina* de distintos hospedeiros, dentre eles, soja, gergelim, amendoim, grão de bico, algodão e feijão, e de distintas regiões geográficas, por meio da técnica RAPD, foi possível, com a amplificação do primer OPA-13, distinguir os isolados do fungo.

A técnica AFLP foi utilizada para determinar a variabilidade genética de 96 isolados de *M. phaseolina*, coletados de distintos hospedeiros em oito países, incluindo o Brasil. A análise detectou altos níveis de polimorfismo e de variabilidade do patógeno entre hospedeiros e entre regiões geográficas (REYES-FRANCO et al., 2006). Da mesma forma, isolados do patógeno do México foram associados à origem geográfica e à espécie hospedeira (MAYEK-PÉREZ et al., 2001). Na mesma linha de pensamento, por meio da

técnica AFLP, Vandemark et al. (2000) concluiu que era impossível obter uma correlação no nível de polimorfismo de DNA com a localização geográfica ou hospedeiro.

Saleh et al. (2010) avaliaram 143 isolados de *M. phaseolina* obtidos de campo de milho, soja, centeio e pradaria de capim-alto, no estado do Kansas, pelas técnicas AFLP e região espaçadora interna transcrita (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal (rDNA). A semelhança genética foi maior entre os isolados em campos de soja e menor na pradaria de capim-alto. Não houve relação genotípica para especialização de hospedeiro, o que já era esperado, uma vez que esse patógeno é considerado generalista.

A variabilidade genética de *M. phaseolina* pode favorecer a sobrevivência e a adaptação em ambientes variáveis, pela sua diversidade morfológica, fisiológica, patogênica e genética já relatada (RAYATPANAHI et al., 2012). Mesmo com abordagens moleculares, não há evidências suficientes para sugerir forma *specialis* ou subespécies dentro de *M. phaseolina* (BAIRD et al., 2010). Contudo, o conhecimento sobre a variabilidade genética do patógeno favoreceria a seleção de genótipos resistentes para o desenvolvimento e a liberação de novas cultivares de soja resistentes à doença, e contribuiria na compreensão da biologia desse organismo (ALMEIDA et al., 2003).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de isolados brasileiros de *M. phaseolina* com base no marcador molecular de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), a fim de uso futuro em programas de melhoramento genético de soja.

4.3 Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Fitopatologia e de Biotecnologia da Embrapa Trigo, em Passo Fundo, RS, e no laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte do Paraná, em Bandeirantes, PR, em 2017.

Vinte e três isolados de *M. phaseolina* componentes da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES), da Coleção de *M. phaseolina* da Embrapa Trigo e da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão foram utilizados neste trabalho (Tabela 1). Foram obtidas colônias monospóricas, adaptando-se a metodologia descrita por Ma; Hill e Hartman (2010), discriminada no capítulo anterior (3.3.1 Seleção de isolado agressivo de *Macrophomina phaseolina*).

O DNA dos isolados de *M. phaseolina* foi obtido a partir do crescimento do fungo em Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura líquido com batata e dextrose (BD) (ALMEIDA et al, 2003). Os Erlenmeyers foram tampados com algodão e esterilizados a 121 °C por 30 minutos. Em câmara asséptica, foi feito o repique do fungo cultivado em placas de Petri por sete dias, transferindo discos de micélio para o Erlenmeyer contendo o meio líquido. Após dez dias em câmara de incubação a 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas, foi realizada a filtração da massa micelial, adaptando-se o protocolo descrito por Bonato et al. (2014). A filtração foi realizada com um funil, no qual foi colocado um pano de algodão e, sobre esse, a massa micelial formada no meio líquido. O pano foi dobrado e realizada pressão mecânica para a remoção do líquido contido na massa micelial. Com o auxílio de uma espátula esterilizada, foram coletadas frações da massa micelial, em forma de tiras, sendo as mesmas transferidas para tubos de polipropileno (2,0 mL) contendo esferas de maceração.

A extração de DNA foi realizada pela adaptação do protocolo descrito por Specht et al. (1982), sendo utilizado o micélio triturado com nitrogênio líquido e 1.000 µL de tampão de extração (Tris – HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 0,5 mM pH 8,0; SDS 2%) por amostra. A quantificação de DNA das amostras foi estimada por espectrofotometria no NanoDrop ND-1000.

As reações de AFLP foram realizadas de acordo com protocolo proposto por Vos et al. (1995) e modificado por Reck et al. (2011). O DNA foi digerido pelas enzimas EcoRI e MseI e, após a digestão, foi efetuada ligação de adaptadores aos fragmentos resultantes, que foram, então, pré-amplificados utilizando-se os iniciadores E

(5'GACTGCGTACCAATTCA-3') e M (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'). Em seguida, a reação em cadeia da polimerase (PCR) seletiva, em que primers seletivos aplicados são quase idênticos aos pré-seletivos E e M, exceto por combinações específicas de dois ou três nucleotídeos na região terminal 3'. Foram utilizadas dez combinações de iniciadores: E-AA/M-GG, E-AGC/M-AGC, E-GA/M-AA, E-TA/M-CT, E-TA/M-GG, E-TA/M-TA, E-TA/M-AG, E-TA/M-TG, E-TA/M-ACA e E-TA/M-CA.

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida a 7% (29:1 acrilamida : bis-acrilamida) e o marcador 10 pb (Invitrogen) foi utilizado como referência. Os fragmentos foram avaliados visualmente, em comparação com a escala do marcador de DNA de 10 pb, codificados manualmente e traduzidos em dados binários indicando presença (1), ausência (0) ou parcela perdida (9).

O software dBoot v.1.1 (COELHO, 2001) foi utilizado para avaliar o coeficiente de variação (C.V. %) do número de marcadores amplificados para determinar o parâmetro de confiabilidade dos testes estatísticos, sendo que o valor abaixo de 5 indica confiabilidade nos resultados (FERREIRA et al., 2015).

O aplicativo computacional TFGA 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para análise, para a qual se emprega a correção de frequências alélicas para marcadores dominantes (LYNCH; MILLIGAN, 1994). Foram calculadas a distância genética de Nei (1978) e a identidade genética de Nei (1978), a heterozigose média de Nei (1978), a proporção de loci polimórficos (P) a critério de 95% e a variância das frequências gênicas entre diferentes populações (teste análogo à estimativa de *F_{st}*).

Por meio do programa NTSYS-pc 2.10 (ROHLF, 2000), os indivíduos foram agrupados pelo método da média aritmética não ponderada (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages - UPGMA) e pelo coeficiente de Jaccard. A distância entre os indivíduos foi avaliada pelo coeficiente de Jaccard, gerando figura de dispersão em 3D através do software FAMD (Fingerprint Analysis with Missing Data) (MILLER, 1997; SCHLÜTER; HARRIS, 2006).

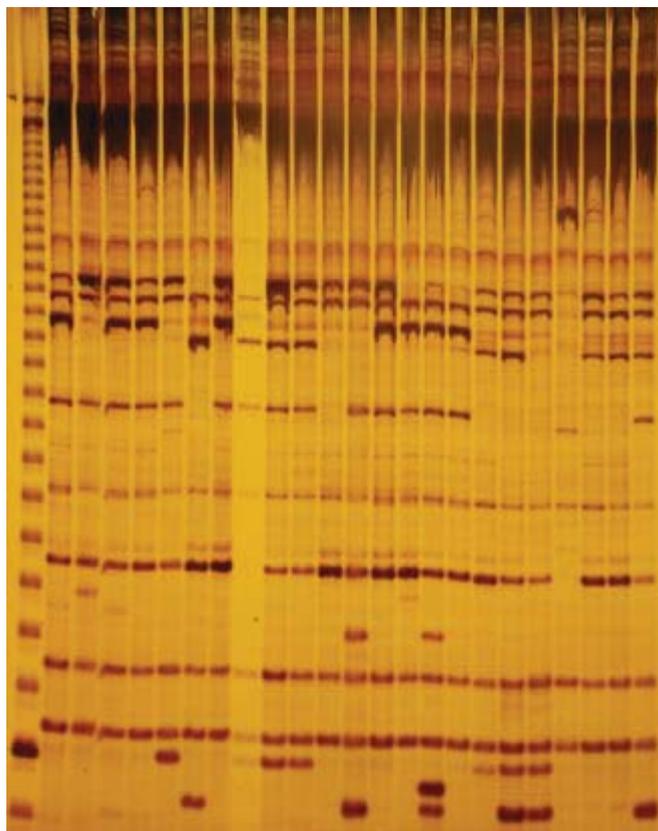
O programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER; LAVALI; SCHENEIDER, 2005) foi empregado na análise da variância molecular (AMOVA), para estimar a partição da variação genética dentro e entre as populações a partir de diferentes hospedeiros, origem geográfica (estado do Brasil) e ano de coleta dos isolados. A partir da AMOVA, foi calculada a diferenciação genética entre as populações (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992), utilizando-se o índice Φ_{ST} (análogo de F_{st}) (WEIR; COCKERHAM, 1984), nas comparações par a par dos dados de AFLP. As estimativas de significância foram conduzidas com base em 10.000 permutações.

4.4 Resultados e Discussão

O técnica molecular AFLP indicou que isolados de *M. phaseolina* apresentaram alta variabilidade genética e possibilitou acessar a variabilidade genética intraespecífica dos isolados do fungo. Essa técnica é uma combinação de técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com variação nos fragmentos em função dos diferentes sítios de restrição, o que permite a detecção da variabilidade genética do patógeno (VOS et al., 1995; DINIZ, 2007). A determinação da variabilidade genética intraespecífica, por meio da técnica AFLP, também foi obtida para o patógeno *Diaporthe aspalathi*, agente causal do cancro da haste na soja (BRUMER et al., 2018).

Foram obtidos 193 fragmentos, sendo 142 fragmentos polimórficos e 51 monomórficos, a partir da amplificação de dez combinações de iniciadores EcoR1/MseI de AFLP, com média de 14,2 e de 5,1 fragmentos polimórficos e monomórficos por combinações de iniciadores, respectivamente. O valor da média de fragmentos polimórficos de AFLP obtido nesse trabalho é próximo ao relatado por Vos et al. (1995), que foi de 15. As bandas polimórficas corresponderam a 73,6% do total de fragmentos amplificados. As combinações de iniciadores produziram os seguintes números de bandas: E-AA/M-GG (29), E-AGC/M-AGC (17), E-GA/M-AA (37), E-TA/M-CT (24), E-TA/M-TA (19), E-TA/M-AG (8), E-TA/M-TG (11), E-TA/M-ACA (7), E-TA/M-CA (17) e E-TA/M- GG (24) (Figura 4).

Figura 4 - Padrão molecular de 23 amostras de DNA de isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, amplificados pelo primer E-TA/M- GG, em gel de poliacrilamida a 7% e técnica AFLP. Bandeirantes, 2017



O número total de loci analisados mostrou ser suficiente, com coeficiente de variação da curva (C.V. %) de 3,3%. O valor de heterozigose média dos indivíduos foi de 15,0%, e a proporção de loci polimórficos foi de 73,6%.

Por meio da AMOVA foi avaliada a partição da variação genética entre populações e dentro de populações de isolados do patógeno oriundos de distintos hospedeiros (Tabela 11). Essa partição mostrou maior variação genética dentro da população, com 82,7% da variação total e 17,3% da variação genética observadas entre populações. Nessa mesma análise foi obtido o valor do fluxo gênico (F_{st}) de 0,17308, sendo significativo a 0,05% com probabilidades calculadas por 10.000 permutações ao acaso. Esse valor F_{st} obtido indica alta estruturação populacional (MENDONÇA, 2011).

Tabela 11 - Análise da variância molecular (AMOVA), para estimar a partição da variação genética entre populações e dentro de populações de 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, provenientes de distintos hospedeiros. Bandeirantes, 2017

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	2	66,127	3,21026	17,31
Dentro de populações	20	306,743	15,33714	82,69
Total	22	372,870	18,54740	
Índice de fixação (<i>F_{st}</i>)	0,17308			

Quando as populações do fungo foram agrupadas conforme os hospedeiros dos quais foram isolados (soja, feijão e trigo), os valores de *F_{st}*, distância genética de Nei e identidade genética de Nei foram obtidos por pares de população (Tabela 12). Todos os valores encontrados de *F_{st}* entre pares de populações foram significativos a 0,05% de probabilidade. Os valores obtidos para a identidade genética de Nei entre pares de populações foram próximos a 1, e mostraram alto grau de similaridade genética entre as populações avaliadas (SOUZA et al., 2008). A distância genética de Nei, que infere a divergência genética entre populações (SOUZA et al., 2008), apresentou menor valor entre os pares de populações soja x feijão e maior valor entre os pares soja x trigo.

Tabela 12 - Diferenciação genética de populações (*F_{st}*), distância genética de Nei e identidade genética de Nei por pares de população de 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, provenientes de distintos hospedeiros. Bandeirantes, 2017

Pares de população	<i>F_{st}</i>	Distância genética de Nei	Identidade genética de Nei
Soja x feijão	0,18088	0,0434	0,9575
Soja x trigo	0,22995	0,1275	0,8803
Feijão x trigo	-0,12538	0,0911	0,9129

O agrupamento dos indivíduos de *M. phaseolina*, provenientes de distintos hospedeiros, foi realizado pelo método UPGMA (Figuras 5 e 6), que diferenciou três grupos principais no nível de coeficiente de similaridade de 0,7. O agrupamento I, com coeficiente de similaridade de 0,72, foi formado pelos isolados Mp 13 (feijão) e CMES 326, CMES 329, CMES 341, CMES 350, CMES 351, CMES 625, CMES 641, CMES

1169, CMES 1431, Mp PF, Mp SA, Mp 2007 e Mp TP (soja). Esses isolados têm origem em diferentes Estados brasileiros, como Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Bahia. No agrupamento II, também com coeficiente de similaridade de 0,72, foram incluídos os isolados Mp CX e CMES 352 (soja), Mp 18, Mp 49 e Mp 124 (feijão) e Mp 1020 (trigo), com origens nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Mato Grosso. O agrupamento III foi formado apenas por isolados de feijão (Mp 24, Mp 42 e Mp 47), originários do estado de Goiás, com coeficiente de similaridade de 0,65. Assim, observou-se que o grupo I reuniu, basicamente, isolados de soja; o grupo II incluiu isolados de soja, feijão e trigo; e o grupo III incluiu apenas isolados de feijão.

Após a colheita, *M. phaseolina* sobrevive saprofiticamente, permanecendo em restos culturais e no solo até o próximo cultivo. Dessa forma, por ser também polífago, infectará a próxima cultura cultivada na área, caso seja hospedeira (ALMEIDA et al., 2014).

Como já relatado em seção anterior, os isolados Mp CX e CMES 1169 apresentaram-se, consistentemente, entre os mais agressivos quando inoculados em cultivares de soja. A partir da análise do dendrograma e da distância genética, observou-se que estes isolados ficaram em grupos distintos (Figura 5 e 6). *Macrophomina phaseolina* não apresenta especificidade de hospedeiro e há variabilidade de agressividade entre os isolados (MAYEK-PÉREZ et al, 2001; SU et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008; TWIZEYIMANA et al., 2012), no entanto, os mecanismos específicos que contribuem para a relação entre hospedeiro e *M. phaseolina* não foram determinados (SU et al., 2001).

Figura 5 - Dendrograma construído através do algoritmo UPGMA do programa NTSYS, com coeficiente de similaridade de Jaccard calculado pela técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados AFLP, relacionando 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, provenientes de distintos hospedeiros. O dendrograma foi gerado a partir de dez *primers* seletivos. Bandeirantes, 2017

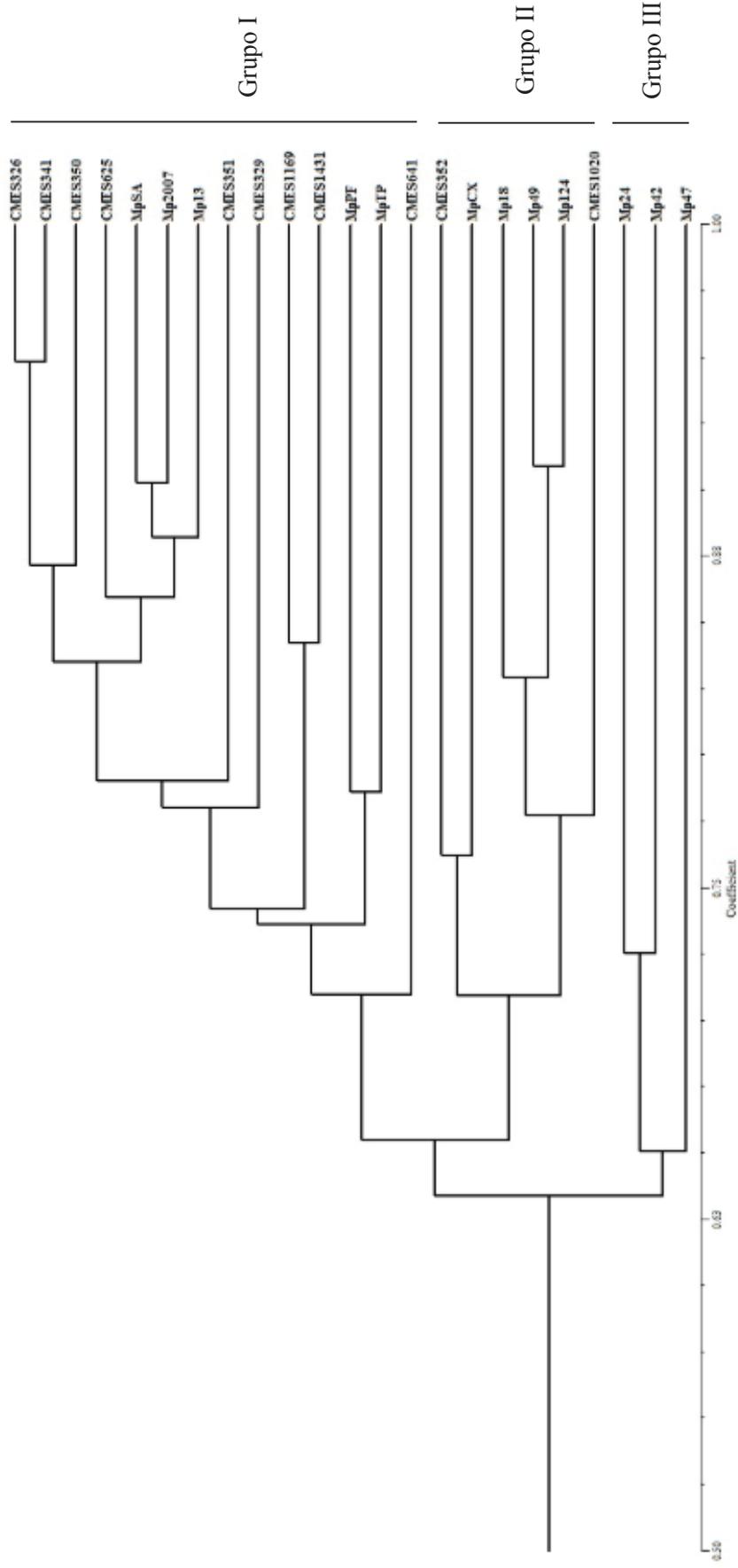
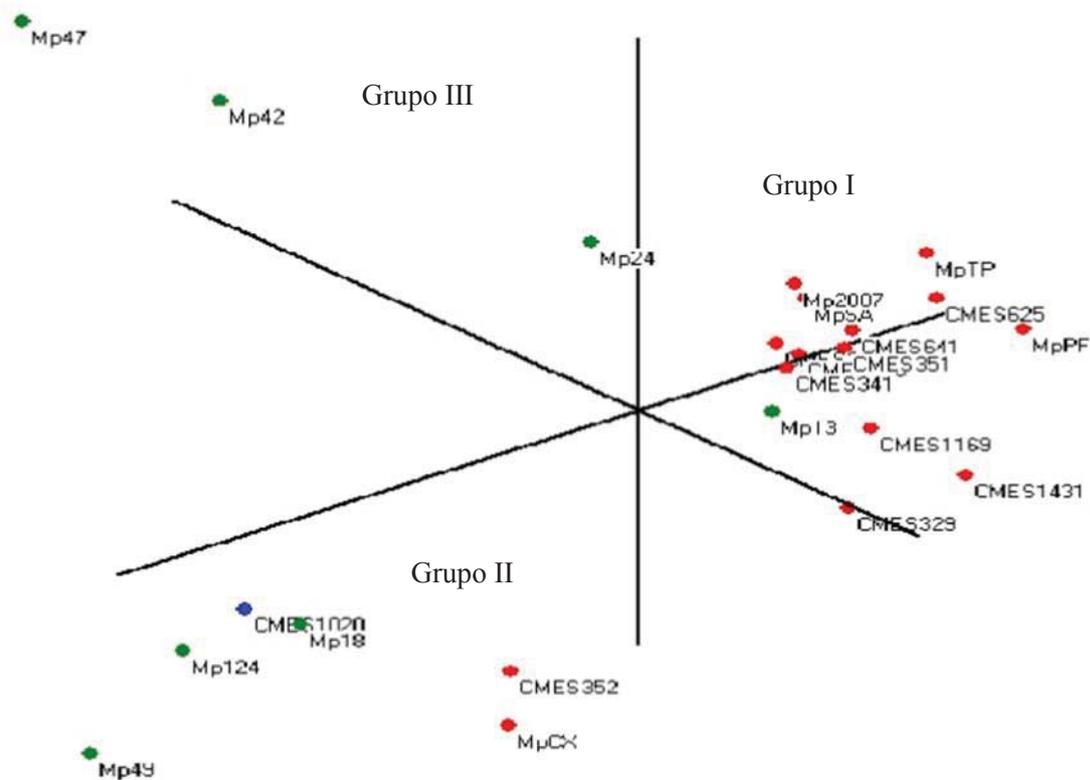


Figura 6 - Distância genética entre 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, provenientes de distintos hospedeiros, construída com coeficiente de Jaccard. Bandeirantes, 2017



Nota: ● Isolado de *Macrophomina phaseolina* provenientes de soja.
 ● Isolado de *Macrophomina phaseolina* provenientes de feijão.
 ● Isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente de trigo.

Su et al. (2001) e Almeida et al. (2003) obtiveram resultados diferentes quanto ao agrupamento de isolados de *M. phaseolina* utilizando a técnica RAPD (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso). Segundo esses autores, os isolados foram agrupados de acordo com o hospedeiro, sendo que Su et al. (2001) avaliaram isolados obtidos de soja, sorgo e algodão, e Almeida et al. (2003), de soja, milho e girassol. A baixa variabilidade dos isolados do presente trabalho, provenientes do mesmo hospedeiro e incluídos no mesmo grupo, pode ser devida ao número pequeno de isolados avaliados ou pela característica predominante de reprodução assexuada do patógeno, na qual o parassexualismo (fusão de hifas e troca de material genético entre elas) pode ser responsável pela variabilidade genética (ALMEIDA et al., 2014).

Por meio da AMOVA também foi avaliada a partição da variação genética entre populações e dentro de populações de isolados do patógeno a partir da origem geográfica, ou seja, do estado do Brasil em que foram coletados os isolados (Tabela 13). Essa partição mostrou maior variação genética dentro da população, com 82,57% da variação total e 17,43% da variação genética observadas entre populações. Nessa mesma análise foi obtido o valor do fluxo gênico (F_{st}) de 0,17427, sendo significativo a 0,05% com probabilidades calculadas por 10.000 permutações ao acaso.

Tabela 13 - Análise da variância molecular (AMOVA), para estimar a partição da variação genética entre populações e dentro de populações de 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, provenientes de distintos estados do Brasil. Bandeirantes, 2017

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	7	157,303	3,0330	17,43
Dentro de populações	15	215,567	14,37111	82,57
Total	22	372,870	17,40418	
Índice de fixação (F_{st})	0,17427			

Quando as populações do fungo foram agrupadas conforme os estados brasileiros dos quais foram coletados (MG, MT, PR, DF, BA, RR, RS e GO), os valores de F_{st} , distância genética de Nei e identidade genética de Nei foram obtidos por pares de população (Tabela 14). Todos os valores encontrados de F_{st} entre pares de populações foram significativos a 0,05% de probabilidade. Os valores obtidos para a identidade genética de Nei entre pares de populações apresentaram alto grau de similaridade genética, pelos valores serem próximos a 1 (SOUZA et al., 2008). A distância genética de Nei apresentou menor valor entre os pares de população PR x RS e maior valor entre os pares MG x BA e BA x RR.

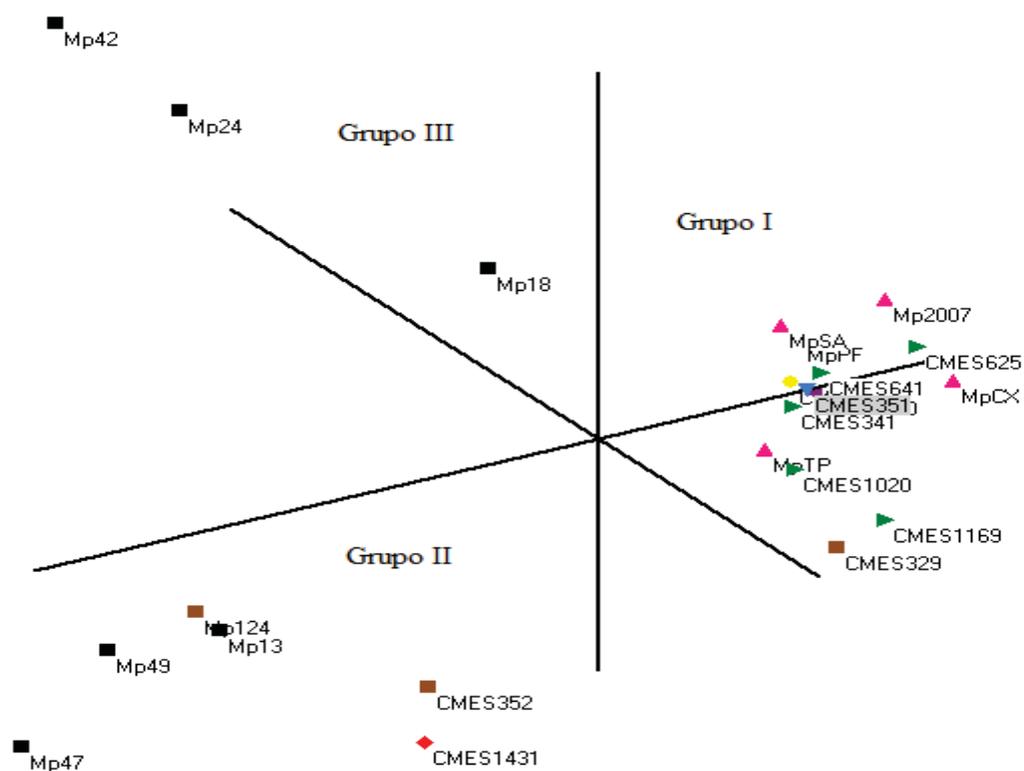
Tabela 14 - Diferenciação genética de populações (F_{st}), distância genética de Nei e identidade genética de Nei por pares de população de 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, provenientes de distintos estados do Brasil. Bandeirantes, 2017

Pares de população	F_{st}	Distância genética de Nei	Identidade genética de Nei
MG x MT	-0,29032	0,1054	0,9000
MG x PR	-0,10619	0,0711	0,9314
MG x DF	1,00000	0,0642	0,9378
MG x BA	1,00000	0,1210	0,8860
MG x RR	1,00000	0,2064	0,8135
MG x RS	0,04505	0,0589	0,9428
MG x GO	0,19190	0,1489	0,8617
MT x PR	0,13462	0,0573	0,9444
MT x DF	-0,18812	0,1194	0,8875
MT x BA	-0,18812	0,1136	0,8926
MT x RR	-0,29032	0,0936	0,9106
MT x RS	0,21214	0,0654	0,9367
MT x GO	0,09325	0,0486	0,9526
PR x DF	-0,06838	0,0639	0,9381
PR x BA	-0,03306	0,0764	0,9264
PR x RR	0,26036	0,1209	0,8861
PR x RS	0,15074	0,0288	0,9716
PR x GO	0,27951	0,0777	0,9253
DF x BA	1,00000	0,1328	0,8756
DF x RR	1,00000	0,1938	0,8238
DF x RS	0,12397	0,0704	0,9320
DF x GO	0,21725	0,1536	0,8576
BA x RR	1,00000	0,2064	0,8135
BA x RS	0,13821	0,0713	0,9311
BA x GO	0,12838	0,1364	0,8725
RR x RS	0,40113	0,1306	0,8775
RR x GO	-0,00302	0,1113	0,8947
RS x GO	0,34107	0,0960	0,9084

No agrupamento dos indivíduos de *M. phaseolina*, considerando a origem geográfica, foram obtidos três grupos (Figura 7). O agrupamento I, foi formado pelos isolados e CMES 326 (MG), CMES 329 (MT), CMES 341, CMES 625, CMES 641, CMES 1020 e CMES 1169 (PR), CMES 350 (DF), CMES 351 (BA), Mp CX, Mp PF, Mp SA, Mp 2007 e Mp TP (RS). No agrupamento II, foram incluídos os isolados Mp 13,

Mp 47 e Mp 49 (GO), Mp 124 e CMES 352 (MT) e CMES 1431 (RR). O agrupamento III foi formado pelos isolados Mp 18, Mp 24 e Mp 42, originários do estado de Goiás.

Figura 7 - Distância genética entre 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, provenientes de distintos estados do Brasil, construída com coeficiente de Jaccard. Bandeirantes, 2017



Nota: ● Isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente de Minas Gerais (MG).
 ■ Isolado de *Macrophomina phaseolina* provenientes de Mato Grosso (MT).
 ▲ Isolado de *Macrophomina phaseolina* provenientes do Paraná (PR).
 ▲ Isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente do Distrito Federal (DF).
 ▲ Isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente da Bahia (BA).
 ◆ Isolado de *Macrophomina phaseolina* proveniente de Roraima (RR).
 ▲ Isolado de *Macrophomina phaseolina* provenientes do Rio Grande do Sul (RS).
 ■ Isolado de *Macrophomina phaseolina* provenientes de Goiás (GO).

A alta similaridade observada entre isolados de diferentes regiões geográficas evidencia que os isolados utilizados neste trabalho evoluíram da mesma população ancestral. Uma das hipóteses é a migração de alguns isolados por meio de sementes,

maquinário agrícola e solo infestado com microescleródios, uma vez que estas são formas de disseminação do patógeno (ALMEIDA et al., 2003; BAIRD et al., 2010).

A partição da variação genética entre populações e dentro de populações de isolados de *M. phaseolina* também foi analisada pelo ano de coleta dos isolados, gerando a AMOVA (Tabela 15). Essa partição mostrou maior variação genética dentro da população, com 90,61%, e menor variação genética entre populações, com 9,39%. O valor do fluxo gênico (F_{st}) foi de 0,09389, sendo significativo a 0,05% com probabilidades calculadas por 10.000 permutações ao acaso.

Tabela 15 - Análise da variância molecular (AMOVA), para estimar a partição da variação genética entre populações e dentro de populações de 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina* considerando o ano de coleta. Bandeirantes, 2017

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	9	170,370	1,61413	9,39
Dentro de populações	13	202,500	15,57692	90,61
Total	22	372,870	17,19106	
Índice de fixação (F_{st})	0,09389			

No agrupamento das populações do fungo, considerando o ano de coleta (1992, 1998, 2000, 2004, 2005, 2007, 2012, 2013, 2014, 2015), os valores de F_{st} , distância genética de Nei e identidade genética de Nei foram obtidos por pares de população (Tabela 16). Os valores encontrados de F_{st} entre pares de populações foram significativos a 0,05% de probabilidade. Os resultados da identidade genética de Nei entre pares de populações apresentaram alto grau de similaridade genética, pelos valores serem próximos a 1. A distância genética de Nei apresentou menor valor entre os pares de população 2004 x 2007 e maior valor entre os pares 1998 x 2005.

Tabela 16 - Diferenciação genética de populações (F_{st}), distância genética de Nei e identidade genética de Nei por pares de população de 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, considerando o ano de coleta. Bandeirantes, 2017

(Continuação)

Pares de população	F_{st}	Distância genética de Nei	Identidade genética de Nei
1992 x 1998	1,00000	0,0979	0,9067
1992 x 2000	1,00000	0,0262	0,9741
1992 x 2004	-0,41176	0,0576	0,9440
1992 x 2005	1,00000	0,2323	0,7927
1992 x 2007	-0,25000	0,0731	0,9295
1992 x 2012	1,00000	0,1938	0,8238
1992 x 2013	1,00000	0,1813	0,8342
1992 x 2014	0,07915	0,1249	0,8826
1992 x 2015	-0,06796	0,0809	0,9223
1998 x 2000	1,00000	0,0697	0,9326
1998 x 2004	0,11111	0,1159	0,8905
1998 x 2005	1,00000	0,2587	0,7720
1998 x 2007	0,11765	0,1332	0,8753
1998 x 2012	1,00000	0,2323	0,7927
1998 x 2013	1,00000	0,1813	0,8342
1998 x 2014	0,22565	0,1832	0,8326
1998 x 2015	0,14729	0,1301	0,8780
2000 x 2004	-0,33333	0,0691	0,9332
2000 x 2005	1,00000	0,2388	0,7876
2000 x 2007	-0,16883	0,0865	0,9171
2000 x 2012	1,00000	0,2001	0,8187
2000 x 2013	1,00000	0,1628	0,8497
2000 x 2014	0,09745	0,1403	0,8691
2000 x 2015	-0,08911	0,0872	0,9165
2004 x 2005	0,35135	0,1586	0,8534
2004 x 2007	-0,13514	0,0188	0,9814
2004 x 2012	0,27273	0,1590	0,8530
2004 x 2013	0,17241	0,1405	0,8690
2004 x 2014	0,15382	0,0779	0,9251
2004 x 2015	-0,00176	0,0371	0,9636
2005 x 2007	0,28571	0,1668	0,8464
2005 x 2012	1,00000	0,2454	0,7824
2005 x 2013	1,00000	0,2454	0,7824
2005 x 2014	0,12637	0,1353	0,8734
2005 x 2015	0,24138	0,1239	0,8835
2007 x 2012	0,02174	0,1287	0,8793
2007 x 2013	0,00000	0,1257	0,8819
2007 x 2014	0,17754	0,0681	0,9342
2007 x 2015	-0,010501	0,0189	0,9813

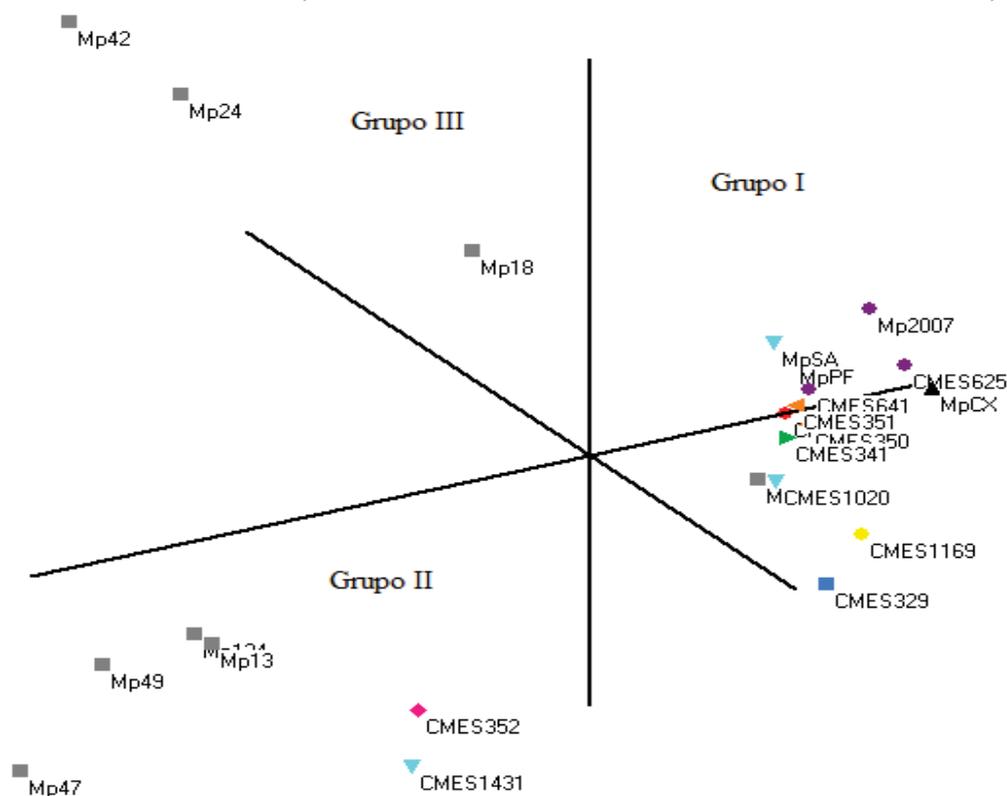
Tabela 16 - Diferenciação genética de populações (F_{st}), distância genética de Nei e identidade genética de Nei por pares de população de 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, considerando o ano de coleta. Bandeirantes, 2017

(Conclusão)

Pares de população	F_{st}	Distância genética de Nei	Identidade genética de Nei
2012 x 2013	1,00000	0,1938	0,8238
2012 x 2014	0,25118	0,1960	0,8220
2012 x 2015	0,18519	0,1333	0,8752
2013 x 2014	0,13743	0,1662	0,8469
2013 x 2015	-0,06796	0,1018	0,9032
2014 x 2015	0,09705	0,0388	0,9619

O agrupamento dos indivíduos de *M. phaseolina*, considerando o ano de coleta, resultou na formação de três grupos, sendo similar ao agrupamento dos indivíduos obtido por diferentes origens geográficas (Figura 8). O agrupamento I, foi formado pelos isolados CMES 326 (1992), CMES 329 (1998), CMES 341 (2000), CMES 350 e CMES 351 (2004), CMES 625, CMES 641 e Mp 2007 (2007), Mp CX (2012), CMES 1169 (2013), Mp TP (2014), Mp PF e Mp SA (2015). No agrupamento II, foram incluídos os isolados Mp 13, Mp 47, Mp 49 e Mp 124 (2014) e CMES 352 (2005) e CMES 1431 (2015). O agrupamento III foi formado pelos isolados Mp 18, Mp 24 e Mp 42, todos coletados em 2014.

Figura 8 - Distância genética entre 23 isolados brasileiros de *Macrophomina phaseolina*, considerando o ano de coleta, construída com coeficiente de Jaccard. Bandeirantes, 2017



- Nota:
- Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 1992.
 - Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 1998.
 - ▲ Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 2000.
 - ▲ Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 2004.
 - ◆ Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 2005.
 - Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 2007.
 - ▲ Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 2012.
 - Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 2013.
 - Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 2014.
 - ▲ Isolado de *Macrophomina phaseolina* do ano 2015.

A análise da variabilidade genética com base na técnica AFLP evidenciou alta variabilidade entre os isolados de *M. phaseolina*. Essa variabilidade não foi estruturada segundo hospedeiro, estado de origem geográfica ou ano de coleta. Diante disso, torna-se importante realizar estudos do patógeno, independente da espécie hospedeira ou da origem geográfica, para detalhar a identidade do mesmo por meio de métodos moleculares (CLAUDINO; SOARES, 2014). Uma das estratégias seria pelo

sequenciamento do genoma de isolados adicionais de *M. phaseolina* de soja e de outros hospedeiros para comparar com a sequência do genoma do isolado do fungo proveniente de juta já sequenciado. Análise genômica comparativa de diferentes sequências fornecerá informações valiosas sobre a variabilidade genética presente entre diferentes isolados deste fungo, e elucidará mecanismos comuns ou distintos utilizados por diferentes isolados para infecção do hospedeiro. Além disso, o genoma inteiro sequenciamento permitirá a descoberta de genes associado à patogenicidade fúngica e à produção de toxinas (ISLAM et al., 2012). Essas informações podem fornecer informações necessárias para projetar métodos de controle mais eficazes e assim contribuir no desenvolvimento e na liberação de cultivares de soja resistentes à podridão de carvão (KAUR et al., 2012).

4.5 Conclusões

A análise da variabilidade genética com base na técnica AFLP evidenciou alta variabilidade entre isolados de *M. phaseolina*, com relação ao hospedeiro, à origem geográfica e ao ano de coleta.

Os agrupamentos dos indivíduos de *M. phaseolina*, provenientes de distintos hospedeiros, possibilitou a formação de três grupos: no grupo I, foram incluídos treze isolados de soja e um isolado de feijão; no grupo II, foram incluídos três isolados de feijão, dois isolado de soja e um isolado de trigo; no grupo III, restaram três isolados de feijão.

Os agrupamentos dos isolados de *M. phaseolina*, considerando origem geográfica, possibilitou a formação de três grupos: no grupo I, foram incluídos isolados pertencentes a Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná, Distrito Federal, Bahia e Rio Grande do Sul; o grupo II, isolados de Goiás, Mato Grosso e Roraima; o grupo III, isolados de Goiás.

Os agrupamentos dos isolados de *M. phaseolina*, considerando o ano de coleta, possibilitou a formação de três grupos: o grupo I, foi formado por isolados coletados em 1992, 1998, 2000, 2004, 2007, 2012, 2013, 2014 e 2015; no grupo II, foram incluídos isolados de 2014, 2005 e 2015; e, no grupo III, isolados coletados em 2014.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na avaliação da agressividade de isolados de *M. phaseolina*, o isolado Mp CX, oriundo da soja, destacou-se por ser um dos mais agressivos e, entre os isolados de feijão, Mp 124 e Mp 49, foram os mais agressivos. A partir desses resultados, ao analisar o dendrograma e a distância genética construída pelo coeficiente de Jaccard, esses isolados ficaram incluídos no mesmo grupo. Assim, os grupos formados pelos isolados do patógeno também estão relacionados com a agressividade dos mesmos. Contudo, novos estudos referentes a agressividade de *M. phaseolina*, independente da espécie hospedeira ou da região geográfica, devem ser realizados para elucidar informações quanto à identidade do patógeno por meio de métodos moleculares, e assim contribuir no desenvolvimento e na liberação de cultivares de soja resistentes à podridão de carvão.

É imprescindível que novos estudos sejam realizados a fim de identificar genes de resistência à podridão de carvão em soja para que possam ser combinados em genótipos de soja já relatados como moderadamente resistentes à doença, a fim de desenvolver cultivares comerciais de soja com melhores níveis de resistência.

Outra possibilidade de desenvolver cultivares de soja com melhores níveis de resistência a *M. phaseolina*, é a identificação de genes tolerantes ao estresse hídrico, uma vez que é um dos fatores predisponentes à infecção do fungo em soja.

6 CONCLUSÃO GERAL

Há diferença de agressividade entre isolados de *M. phaseolina*, sendo os isolados CMES 1169 e Mp CX os mais agressivos, possibilitando a incorporação destes em estudos da resistência de genótipos de soja ao fungo.

As cultivares de soja apresentam reação distinta de severidade à podridão de carvão pela técnica de inoculação da camada de areia e da haste cortada, sendo esta última técnica de inoculação eficiente para seleção de fontes úteis para o desenvolvimento de genótipos de soja com maiores níveis de resistência à podridão de carvão, pela rapidez de resposta e pela facilidade de execução.

As cultivares de soja TMG 7062 e V-Max e os genótipos de soja DT97-4290, Spencer e PI 567334 apresentaram-se consistentemente entre as cultivares de menor Área Relativa Abaixo da Curva de Progresso da Doença (ARACPD) pela técnica da haste cortada, e podem ser incluídas em programas de melhoramento para resistência à podridão de carvão de soja.

A análise da variabilidade genética com base na técnica AFLP evidenciou alta variabilidade entre isolados de *M. phaseolina*, com relação ao hospedeiro, à origem geográfica e ao ano de coleta.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R.; ABDELNOOR, R. V.; ARIAS, C. A. A.; CARVALHO, V. P.; JACOUD FILHO, D. S.; MARIN, S. R. R.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; CARVALHO, C. G. P. Genotypic diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 279-285, 2003.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 569-588.

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N. de; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M. da; GAUDÊNCIO, C. de A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. (Documentos, 346).

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, n. 4, p. 257-264, 2008.

ALMEIDA, A. M. R.; TORRES, E.; FRANCHINI, J. C.; FARIAS, J. R. B.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; MARIN, S. R. R. **Macrophomina phaseolina em soja: sistemas de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. (Circular técnica, 34).

ALMEIDA, A. M. R.; TORRES, E.; FRANCHINI, J. C.; OLIVEIRA, M. C. N. de; DEBIASI, H.; FARIAS, J. R. B.; COSTA, J. M.; SIMIONATO, A. A.; PELLIZZARO, E. C. Podridão do Carvão (*Macrophomina phaseolina*). In: ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S. (Ed.). **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 49-71.

AMARAL, L. do; JAIGOBIND, S. J.; JAIGOBIND, A. G. **Dossiê técnico: óleo de soja**. Brasília, DF: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas; Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná, 2006. 35 p. Disponível em: <<http://respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MzA2>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

AVILES, M.; CASTILLO, S.; BASCON, J.; ZEA-BONILLA, T.; MARTIN-SANCHEZ, P.M.; PEREZ-JIMENEZ, R.M. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. **Plant Pathology**, v. 57, p. 382, 2008.

BECK, J.; RIPKA, S.; SIEGNER, A.; SCHILTZ, E.; SCHWEIZER, E. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. **European Journal of Biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 487–498, 1990.

BAIRD, R. E.; WADL, P. A.; ALLEN, T.; MCNEILL, D.; WANG, X.; MOULTON, J. K.; RINEHART, T. A.; ABBAS, H. K.; SCHIER, T.; TRIGIANO, R. N. Variability of United States isolates of *Macrophomina phaseolina* based on simple sequence repeats and cross genus transferability to related genera within Botryosphaeriaceae. **Mycopathologia**, v. 170, n. 3, p. 169-180, 2010.

BAIRD, R. E.; WATSON, C. E.; SCRUGGS, M. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. **Plant Disease**, v. 87, n. 5, p. 563-566, 2003.

BONATO, A. L. V.; MUNIZ, J. B.; MACIEL, J. L. N.; ORTIZ, J. C. **Otimização do método de extração de DNA de *Magnaporthe oryzae* de trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2014. (Comunicado técnico online, 343). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/114990/1/2014-Comunicado-tecnico-online-343.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2018.

BRISTOW, W. E.; WYLLIE, T. Reaction of soybean cultivars to *Macrophomina phaseolina* as seedlings in the growth chamber and field. **Transactions of the Missouri Academy of Science**, v. 18, p. 5-10, 1984.

BRUMER, B. B.; LOPES-CAITAR, V. S.; CHICOWSKI, A. S.; BELOTI, J. D.; CASTANHO, F. M.; SILVA, D. C. G. da; CARVALHO, S. de; LOPES, I. O. N.; SOARES, R. M.; SEIXAS, C. D. S.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Morphological and molecular characterization of *Diaporthe* (anamorph *Phomopsis*) complex and pathogenicity of *Diaporthe aspalathi* isolates causing stem canker in soybean. **European Journal Plant Pathology**, v. 151, n. 4, p. 1009-1025, 2018.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011a. p. 119-132.

CAMARGO, L. E. A. Controle genético. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011b. p. 325-341.

CAMARGO, P. O. **Estudo da herança de caracteres quali-quantitativos e mapeamento genético de alelos resistentes à Ferrugem da Soja presentes na PI561356 e PI594754**. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

CLAUDINO, M. R. **Métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira visando à seleção de genótipos resistentes**. 2013. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agrobioenergia e Agricultura Familiar) – Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual de Paraíba, Campina Grande, 2013.

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

COELHO, A. S. G. **BOOD**: avaliação de dendogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, versão 3.0. Goiânia: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Goiás, 2001.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira** – Grãos: safra 2017/18 - sétimo levantamento, v. 5, n. 7, p. 1-182, abril 2018a.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira** - Grãos: safra 2017/18 - nono levantamento, v. 5, n. 9, p. 1-182, junho 2018b.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectiva para a agropecuária: produtos de verão** - safra 2017/2018, v. 5, 2017c.

COSER, S. A.; RESSY, R. V. C.; ZHANG, J.; MUELLER, D. S.; MENGISTU, A.; WISE, K. A.; ALLEN, T. W.; SINGH, A. K. Genetic architecture of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance in soybean revealed using a diverse panel. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 1626, Sept. 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01626/full>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; CLEBSCH, C. C.; PANISSON, F. T. Podridão cinza da raiz: avaliação de resistência de genótipos de soja, safra 2016/2017. In: COSTAMILAN, L. M. (Ed.). **Soja: resultados de pesquisa 2016/2017**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2017. p. 51-55. (Embrapa Trigo. Documentos online, 171). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164786/1/ID44121-2017DO171p51.pdf>>.

COSTAMILAN, L. M.; CLEBSCH, C. C.; SOARES, R. M.; SEIXAS, C. D. S.; GODOY, C. V.; DORRANCE, A. E. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* pathotypes from Brazil. **Plant Pathology**, v. 135, n. 4, p. 845-853, 2013.

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

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

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

DINIZ, M. C. **Associação de marcadores (AFLP) com caracteres de interesse agrônômico em clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

DORRANCE, A. E.; McCLURE, S. A.; MARTIN, S. K. Effect of partial resistance on *Phytophthora* stem rot incidence and yield of soybean in Ohio. **Plant Disease**, v. 87, n. 3, p. 308-312, 2003.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

FERREIRA, D. G.; GALINDO, B. A.; FRANTINE-SILVA, W.; ALMEIDA, F. S.; SOFIA, S. H. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 1, p. 155-161, 2015.

GAETAN, S. A.; FERNANDE, L.; MADIA, M. Occurrence of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on canola in Argentina. **Plant Disease**, v. 90, p. 524-524, 2006.

GILLEN, A. M.; MENGISTU, A.; SMITH, J. R.; PARIS, R. L. Registration of DT99-16864 Soybean germplasm line with moderate resistance to charcoal rot [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.]. **Journal of Plant Registrations**, v. 10, n. 3, p. 309-315, 2016.

GOIDANISH, G. Revisione del genere *Macrophomina* Petrak. Species tipica: *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. nov. comb. nec. *M. phaseoli* (Maubl.) Ashby. **Annali della Sperimentazione Agraria**, v. 1, n. 3, p. 449-461, 1947.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RANTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 4, p. 167-180, 2012.

HERNÁNDEZ-DELGADO, S.; REYES-VALDÉS, M.; ROSALES-SERNA, R.; MAYEK-PÉREZ, N. Molecular markers associated with resistance to *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in common bean. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 163-170, 2009.

IRAKURI, M. H., LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. (Documentos, 349).

IRIARTE, F.; ROSSKOPF, E.; HILF, M.; McCOLLUM, G.; ALBANO, J.; ADKINS, S. First report of *Macrophomina phaseolina* causing leaf and stem blight of tropical soda apple in Florida. **Plant Health Progress**, 2007.

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

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.

JANA, T.; SHARMA, T. R.; PRASAD, R. D.; ARORA, D. K. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. **Microbiological Research**, v. 158, n. 3, p. 249-257, 2003.

JIMENEZ, D. R. C. **Influence of soils, nutrition, and water relations upon charcoal rot disease processes in Kansas**. 2011. 137 f. Thesis (Master of Science in Plant Pathology) - College of Agriculture, Kansas State University, Kansas, 2011.

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, n. 2, p. 136-151, 2012.

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

LI, S.; HARTMAN, G. L.; BOYKIN, D. L. Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis* spp. on soybean. **Plant Disease**, v. 94, n. 8, p. 1035-1040, 2010.

LIMA, M. I. P. M. **Protocolo usado na Embrapa Trigo para produção de peritécios de *Gibberella zeae* em grãos de trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 5 p. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 218).

LUNA, M. P. R.; MUELLER, D.; MENGISTU, A.; SINGH, A. K.; HARTMAN, G. L.; WISE, K. A. Advancing our understanding of charcoal rot in soybeans. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2017.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, n. 2, p. 91-99, 1994.

MA, J.; HILL, C. B.; HARTMAN, G. L. Production of *Macrophomina phaseolina* conidia by multiple soybean isolates in culture. **Plant Disease**, v. 94, n. 9, p. 1088-1092, 2010.

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**, v. 175, n. 11, p. 10-16, 2012.

MAYEK-PÉREZ, N.; LÓPEZ-CASTANEDA, C.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M., GARCÍA- ESPINOSA, R.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; MARTÍNEZ-DE LA VEJA, O.; SIMPSON, J. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. **Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 5, p. 257-264, 2001.

MENDONÇA, P. C. **Caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville por marcador molecular aflp e transferência de microssatélites**. 2011. 87 f. Tese (Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2011.

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

MENGISTU, A.; ARELLI, P. A.; BOND, J. P.; SHANNON, G. J.; WRATHER, A. J.; RUPE, J. B.; CHEN, P.; LITTLE, C. R.; CANADAY, C. H.; NEWMAN, M. A.; PANTALONE, V. R. Evaluation of soybean genotypes for resistance to charcoal rot. Online. **Plant Health Progress**, sept. 2011a.

MENGISTU, A.; RAY, J. D.; SMITH, J. R.; BOYKIN, D. L. Maturity effects on colony-forming units of *Macrophomina phaseolina* infection as measured using near-isogenic lines of soybeans. **Journal of Crop Improvement**, v. 28, p. 38-56, 2014.

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, n. 6, p. 2453-2461, 2007.

MENGISTU, A.; RUPE, J. C.; WRATHER, J. A. Charcoal rot. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; STEFFEY, K. L.; DAVIS, J. A. (Ed).

Compendium of soybean diseases and pests. 5th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2015. p. 67-69.

MENGISTU, A.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; BELLALLOUI, N. Seasonal progress of charcoal rot and its impact on soybean productivity. **Plant Disease**, v. 95, n. 9, p. 1159-1166, 2011b.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA):** program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3 a windows. Flagstaff: Northern Arizona University, Department of Biological Sciences, 1997. Disponível em: <<http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/TFPGADOC.PDF>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

MUCHERO, W.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A. Genic SNP markers and legume synteny reveal candidate genes underlying QTL for *Macrophomina phaseolina* resistance and maturity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.]. **BMC Genomics**, v. 12, n. 8, p. 1-14, 2011. Disponível em: <<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2164-12-8>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

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, n. 5, p. 2324-2325, 2006.

PAWLOWSKI, M. L.; HILL, C. B.; HARTMAN, G. L. Resistance to charcoal rot identified in ancestral soybean germplasm. **Crop Science**, v. 55, n. 3, p. 1230-1235, 2015.

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

PEREZ-BRANDÁN, C.; ARZENO, J. L.; HUINDOBRO, 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.

PURKAYASTHA, S.; KAUR, B.; DILBAGHI, N.; CHAUDHURY, A. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. **Plant Pathology**, v. 55, n. 1, p. 106-116, 2006.

R CORE TEAM. **The R Project for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2017. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 out. 2017.

RADWAN, O.; ROUHANA, L. V.; HARTMAN, G. L.; SCHUYLER, S. K. Genetic mechanisms of host-pathogen interactions of charcoal rot in soybean. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, n. 3, p. 617-629, 2014.

RAYATPANAH, S.; NANAGULYAN, G. S.; ALAV, S. V.; RAZAVI, M.; GHANBARI-MALIDARREH, A. Pathogenic and genetic diversity among Iranian isolates of *Macrophomina phaseolina*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 1, p. 40-44, 2012.

RECK, M.; BENÍCIO, L. M.; RUAS, E. A.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, M. P.; ORTIZ, M. A.; TALAVERA, S.; URTUBEY, E.; STUESSY, T.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TREMETSBERGER, K.; MICHELAN, V. S.; MATZENBACHER, N. I.; VANZELA, A. L. L.; TERRAB, A.; SAMUEL, R.; RUAS, C. F. Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochoeris catharinensis* (Asteraceae). **Plant System Evolution**, v. 296, n. 3, p. 231-243, 2011.

REDDY, P. S.; FAKRUDIN, B.; PUNNURI, S.; ARUN, S.; KURUVINASHETTI, M.; DAS, I.; SEETHARAMA, N. Molecular mapping of genomic regions harboring QTLs for stalk rot resistance in sorghum. **Euphytica**, v. 159, n. 1/2, p. 191-198, 2008.

REICHERT, I.; HELLINGER, E. On the occurrence, morphology and parasitism of *Sclerotium bataticola*. **Palestine Journal of Botany**, v. 6, p. 107-147, 1947.

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, n. 2, p. 128-133, 2014.

REUVENI, R.; NACHMIAS, A.; KRIKUN, J. The role of seedborne inoculum on the development of *Macrophomina phaseolina* on melon. **Plant Disease**, v. 67, p. 280-281, 1983.

REYES-FRANCO, M. C.; HERNÁNDEZ-DELGADO, S.; BEAS-FERNÁNDEZ, R.; MEDINA-FERNÁNDEZ, M.; SIMPSON, J.; MAYEK-PÉREZ, N. Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 7/8, p. 447-453, 2006.

ROHLF, F. J. **NTSYS pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software, 2000.

SALEH, A. A.; AHMED, H. U.; TODD, T. C.; TRAVERS, S. E.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F.; GARRETT, K. A. Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 79-91, 2010.

SCHLÜTER, P. M.; HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Resources**, v. 6, n. 2, p. 569-572, 2006.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SON, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X. C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, A. S. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 178-183, 2010.

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

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

SMITH, D.; MARTY, C.; DORRANCE, A.; HUGHES, T.; MUELLER, D.; NIBLACK, T.; WISE, K. **Charcoal rot management in the north central region**. Madison: University of Wisconsin: Cooperative Extension Service, 2014. (Extension bulletin, A4037).

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

SMITH, G. S.; WYLLIE, T. D. Charcoal rot. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases and pests**. 4th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999.

SOUZA, G. A. de; CARVALHO, M. R. de O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

SPECHET, C. A.; DIRUSSO, C. C.; NOVOTNY, C. P.; ULLRICH, R. C. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 158-163, 1982.

SU, G.; SUH, S. O.; SCHNEIDER, R. W.; RUSSIN, J. S. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 120-126, 2001.

SURRETE, S. B.; MEINTS, P. D.; TREVATHAN, L. E. Evaluation of two methods to infect soybean with *Macrophomina phaseolina* (Deuteromycota) under controlled environmental condition. **Journal of the Mississippi Academy of Sciences**, v. 51, n. 2, p. 134-139, 2006.

TECNOLOGIAS de produção de soja - região Central do Brasil 2003. Londrina: Embrapa Soja; Brasília: Embrapa Cerrados; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Piracicaba: ESALQ, 2002. (Sistemas de produção, 1). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPSO/19282/1/sistemProd001.pdf>>. Acesso em: 17 mai. 2017.

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

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

VANDEMARK, G.; MARTINEZ, O.; PECINA, V.; ALVARADO, M. D. Assessment of genetic relationships among isolates of *Macrophomina phaseolina* using a simplified AFLP technique and two different methods of analysis. **Mycologia**, v. 92, p. 656-664, 2000.

VIANA, F. M. P.; SOUZA, N. L. Efeito da interação temperatura-tensão de água sobre germinação de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 268-272, 2002.

VINHOLES, P. S. **Associação genômica para resistência da soja a *Meloidogyne javanica* e *Macrophomina phaseolina***. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

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.; SHANNON, J. G.; MENGISTU, A. Impact of soybean planting date on soil population density of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Health Progress**, p. 1-5, sep. 2007.

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 Health Progress**, p. 1-5, june 2008.



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV