

Avaliação de métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em plântulas de soja

Eduarda Pereira Magalhães¹, Micaele Rodrigues de Souza², Dalysa Maria Hilgenberg³, Fernanda Rodrigues da Silva², Rodrigo Verás da Costa².

¹ Acadêmica de Agronomia, Instituto Federal do Tocantins, IFTO, Palmas, TO. ² Embrapa Milho e sorgo, Sete Lagoas, MG. ³ Acadêmica de Engenharia Agrônômica, Centro Universitário Campo Real, Guarapuava, PR.

INTRODUÇÃO

O fungo *Macrophomina phaseolina* é capaz de infectar centenas de espécies vegetais agronomicamente importantes, como a soja, o milho, o algodão, o sorgo, o girassol, entre outras (Almeida et al., 2014), nos quais causa uma doença conhecida como podridão-cinzenta, podridão-de-carvão ou podridão-de-macrophomina em raízes, colmos e caules. No interior dos tecidos infectados é observada a presença de inúmeras estruturas de coloração escura, denominadas microescleródios (Costa et al., 2019).

Os microescleródios são estruturas de resistência formadas pela compactação de hifas, permitem ao fungo sobreviver no solo e em restos culturais por longos períodos, constituindo a principal fonte de inóculo primário no campo (Ishikawa et al., 2018). Por ser um fungo polífago, o inóculo produzido em uma cultura durante uma estação de cultivo pode infectar a cultura sucessora, como ocorre na sucessão soja-milho safrinha (Costa et al., 2019).

Na cultura da soja, este fungo tem sido um grande problema enfrentado por produtores de todo o mundo (Reznikov et al., 2018; Smith et al., 2018; Shih et al., 2022). A podridão-de-carvão é classificada como uma das doenças mais destrutivas na cultura da soja em termos de rendimento em locais como nos EUA e Canadá (Bradley et al., 2017). Os sintomas podem ser observados na fase de enchimento de grãos (R6), onde as plantas infectadas apresentam descoloração marrom do caule e das raízes, com presença de microescleródios nas raízes e no interior do caule (Shih et al., 2022).

O desenvolvimento da doença é fortemente favorecido por condições de elevada temperatura e baixa umidade no solo, ou seja, períodos quentes e secos (Doubledee et al., 2018; Tok et al., 2018). O manejo da podridão-de-carvão é dificultado pela ampla gama de hospedeiros que o fungo apresenta, tornando impraticável o uso da rotação de culturas, e também pela baixa eficiência das aplicações foliares de fungicidas para o seu controle, dada a localização do fungo no solo ou no interior dos tecidos das raízes e colmo (Nascimento et al., 2016).

O uso da resistência genética é considerado a principal estratégia de manejo dessa doença na cultura da soja. Entretanto, são escassas as informações sobre o nível de resistência de cultivares comerciais à *M. phaseolina* (Silva et al., 2019). A ausência destas informações impede que os produtores possam escolher e plantar cultivares mais resistentes em áreas e ambientes nos quais a doença ocorre de forma endêmica e em elevada incidência.

Um dos desafios na avaliação de plantas a um determinado patógeno é a disponibilidade de técnicas eficientes de inoculação, as quais permitam a produção de sintomas semelhantes aos causados pelo patógeno em condições naturais (Pickel et al., 2020). Dessa maneira, considerando a importância da podridão de carvão das raízes na cultura da soja, este trabalho teve por objetivo avaliar diferentes métodos de inoculação de *M. phaseolina* na cultura da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia, da Embrapa Pesca, Aquicultura e Sistemas Agrícolas, localizado em Palmas – TO, em parceria com a Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas – MG. O isolado de *M. phaseolina* foi obtido da coleção de microrganismos da Embrapa, cultivado em meio de cultura BDA em placas de Petri e, posteriormente mantido em câmara de crescimento, do tipo BOD, ajustada para temperatura de 26 °C no escuro.

Foram utilizadas sementes da cultivar TMG 2381. As sementes foram desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito a 1% por um minuto, seguida de tríplice lavagem com água estéril por trinta segundos e secagem em papel estéril.

Para a semeadura foram utilizados tubetes de 280 cm³, preenchidos com areia esterilizada, totalizando doze tubetes para cada tratamento. Foram realizados cinco tratamentos: T0 = Testemunha não inoculada, correspondente às sementes semeadas nos tubetes um dia após a desinfestação superficial; T1= sementes inoculadas com *M. phaseolina* por meio do contato direto por 24 h com o fungo cultivado em placas de Petri; T2= sementes inoculadas com suspensão de microescleródios de *M. phaseolina*, semeadas nos tubetes um dia após a desinfestação superficial. Para tal, adicionou-se 10 ml de água estéril em placas de Petri contendo colônias puras de *M. phaseolina* e, após a raspagem das placas, 1 ml de suspensão foi adicionada em cada tubete; T3= radículas imersas em suspensão de microescleródios. As sementes foram previamente germinadas em papel germitest e armazenadas em BOD e em seguida, inoculadas conforme o T2. Após três dias de germinação, as plântulas foram transferidas para os tubetes; T4= sementes germinadas em papel germitest e armazenadas em BOD semelhantes ao T3, porém, não houve inoculação do patógeno.

Os tubetes foram mantidos em temperatura ambiente (entre 26 e 35 °C) e regados duas vezes ao dia. As avaliações foram realizadas a partir do 13º dia, totalizando quatro avaliações, uma por semana. Foram avaliados: presença de lesões nas raízes e no caule, a extensão das lesões (mm) e a presença de microescleródios. Os dados foram submetidos a análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas os tratamentos T1 e T2 foram eficientes em induzir infecção de *M. phaseolina* em plântulas de soja, diferindo dos demais tratamentos (Figura 1). Os primeiros sintomas foram observados a partir da segunda avaliação no caso do T1, e desde a primeira avaliação no T2. Os sintomas observados foram lesões superficiais de coloração marrom-escuro, tanto na região do colo quanto das raízes. As lesões estão de acordo com os relatos de Gupta et al. (2012) e Shih et al. (2022). Posteriormente, houve o amarelecimento das plantas. O amarelecimento pode ser consequência da produção de toxinas pelo patógeno e pela obstrução dos vasos condutores, pelo crescimento de hifas

nos tecidos vasculares com bloqueio dos feixes vasculares, que resultou na redução da absorção de água e nutrientes pela planta (Gupta et al., 2012; Kaur et al., 2012).

Quanto ao comprimento das lesões e a produção de microescleródios, a partir da terceira avaliação o T2 apresentou comprimento significativamente maior do que o T1, e a produção de microescleródios foram detectados só a partir da terceira avaliação no T1, enquanto que para o T2 a presença de microescleródios foi observada da segunda à última avaliação.

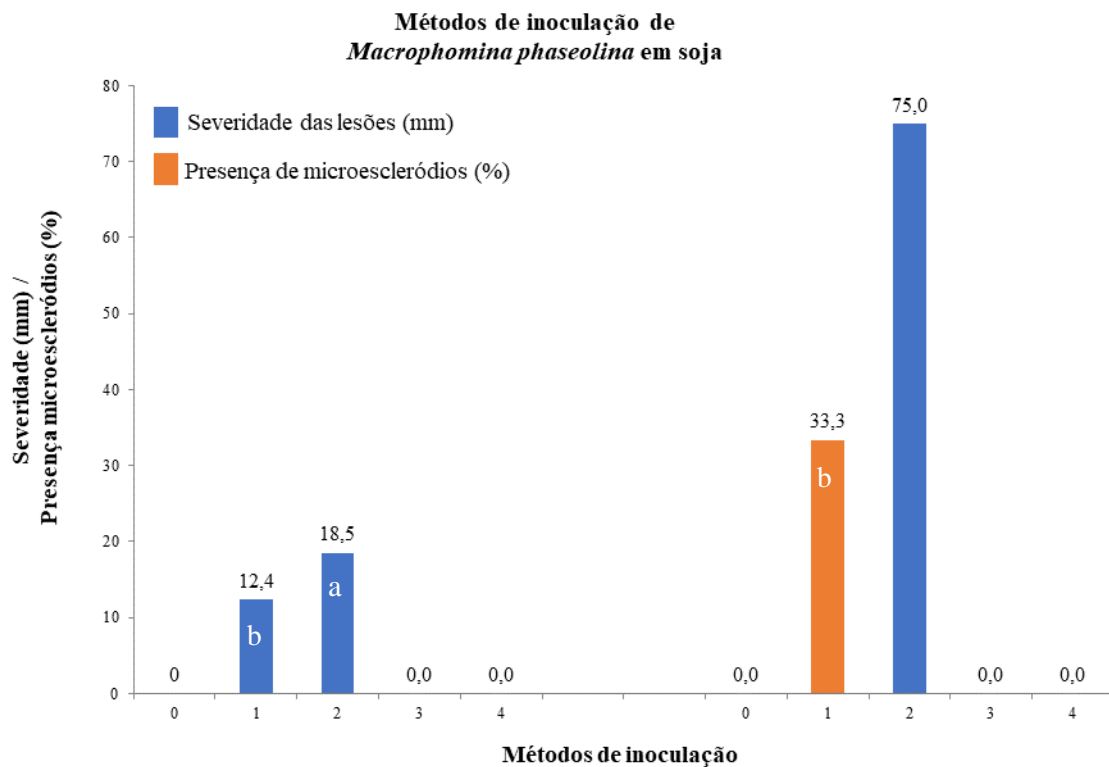


Figura 1. Comprimento de lesões (cm) e presença de microescleródios em plântulas de soja submetidas a diferentes métodos de inoculação com *M. phaseolina*. Eixo x corresponde aos cinco métodos de inoculação e o eixo y a extensão das lesões (mm) e a quantidade de microescleródios (%).

Os resultados de severidade das lesões e a presença de microescleródios indicam que o método de inoculação mais adequado para inoculação de *M. phaseolina* foi o de infestação do solo. Esta metodologia resultou em um aumento de 2,2 vezes (T2 = 75 %)

na quantidade de microescleródios nas plantas ao se comparar com o método de inoculação pelo contato direto das sementes com o patógeno ainda *in vitro* (T1=33,3%). O método de inoculação por imersão das radículas na suspensão de microescleródios (T3) não resultou em nenhum tipo de lesão e a presença de microescleródios não foi detectada, semelhante ao observado para as testemunhas (T0 e T4), nos quais não houve inoculação do patógeno (Figura 1). Pickel et al. (2020) ao avaliarem diferentes métodos de inoculação de *M. phaseolina* na cultura do morango, chegaram a resultados semelhantes a este, indicando como o método mais promissor para inoculação da *M. phaseolina* a infestação do solo, por ser menos invasiva que os demais métodos. Assim, de acordo com os resultados deste trabalho, este método de inoculação pode ser aplicado em estudos de avaliação de resistência genética de plantas de soja, auxiliando na seleção de genótipos resistentes a *M. phaseolina*.

CONCLUSÃO

O método mais eficiente em reproduzir os sintomas da podridão carvão em plântulas de soja foi o de infestação do solo.

REFERÊNCIAS

BRADLEY, C. A.; ALLEN, T. W.; SISSON, A. J.; BERGSTROM, G. C.; BISSONNETTE, K. M.; BOND, J.; BYAMUKAMA, E.; CHILVERS, M. I.; COLLINS, A. A.; DAMICONE, J. P.; DORRANCE, A. E.; DUFAULT, N. S. et al. Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. **Plant Health Progress**, v. 18, n. 1, p. 19-27, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHP-01-21-0013-RS>.

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M.; GAUDÊNCIO, C. A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55 p. (Embrapa Soja. Documentos, 346).

COSTA, R. V. da; SILVA, D. D. da; COTA, L. V.; CAMPOS, L. J. M.; ALMEIDA, R. E. M. de; TUBIANA, D.; EVANGELISTA, B. A.; RIBEIRO, I. L. **Macrophomina phaseolina em milho safrinha**: levantamento da incidência e perdas na produtividade

no estado do Tocantins. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 202).

DOUBLEDEE, M. D.; RUPE, J. C.; ROTHROCK, C. S.; BAJWA, S. G. Effect of root infection by *Macrophomina phaseolina* on stomatal conductance, canopy temperature and yield of soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 40, n. 2, p. 272-283, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1450292>.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 4, p. 167-180, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01884.x>.

ISHIKAWA, M. S.; RIBEIRO, N. R.; OLIVEIRA, E. C.; ALMEIDA, A. A.; BALBIPEÑA, M. I. Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 38-44, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/178653>.

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. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841x.2011.640977>.

NASCIMENTO, S. R. C.; SILVA, F. H. A.; CRUZ, B. L. S.; DANTAS, A. M. M.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SENHOR, R. F. Sobrevivência de estrutura de resistência de *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em solo tratado biologicamente. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 10, n. 1, p. 50-56, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v10i1.2947>.

PICKEL, B.; DAI, N.; MAYMON, M.; ELAZAR, M.; TANAMI, Z.; FRENKEL, O.; TOAMY, M. A.; MOR, N.; FREEMAN, S. Development of a reliable screening technique for determining tolerance to *Macrophomina phaseolina* in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, n. 4, p. 707-718, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02051-4>.

REZNIKOV, S.; VELLICCE, G. R.; MENGISTU, A.; ARIAS, R. S.; GONZALEZ, V.; DE LISI, V.; GABRIELA, G. M.; LOURDES, R. C. M.; PARDO, E. M.; CASTAGNARO, A. P.; PLOPER, L. D. Disease incidence of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on soybean in north-western Argentina and genetic characteristics of the pathogen. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 40, n. 3, p. 423-433, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1484390>.

SHIH, P.-T.; CHANG, T.-D.; LIU, H.-A.; CHANG, H.-X.; LIN, Y.-H. *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot on soybean (*Glycine max*) in Taiwan. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 17, n. 1, article 11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13314-022-00454-2>.

SILVA, M. P. da; KLEPADLO, M.; GBUR, E. E.; PEREIRA, A.; MASON, R. E.; RUPE, J. C.; BLUHM, B. H.; WOOD, L.; MOZZONI, L. A.; CHEN, P. QTL mapping of charcoal rot resistance in PI 567562A soybean accession. **Crop Science**, v. 59, n. 2, p. 474-479, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.02.0145>.

SMITH, J. R.; RAY, J. D.; MENGISTU, A. Genotypic differences in yield loss of irrigated soybean attributable to charcoal rot. **Journal of Crop Improvement**, v. 32, n. 6, p. 781-800, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/15427528.2018.1516262>.

TOK, F. M.; DERVIS, S.; ARSLAN, M. Host selective virulence, temperature response and genetic diversity in *Macrophomina phaseolina* isolates from sesame and peanut in southern Turkey. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 7374-7380, 2018.