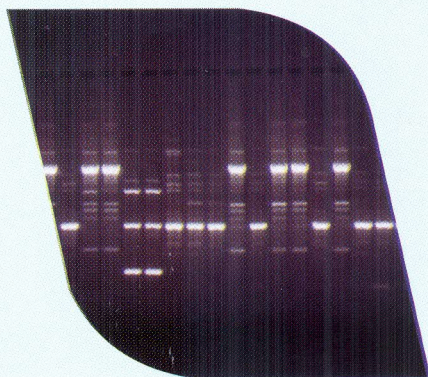




***Macrophomina phaseolina* em soja:
sistema de semeadura,
sobrevivência em restos de cultura
e diversidade genética**





República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fontes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifacio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Soja

Caio Vidor
Chefe-Geral

José Renato Bouças Farias

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Alexandre José Cattelan

Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios

Vania Beatriz Rodrigues Castiglioni

Chefe Adjunto de Administração

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas a:

Área de Negócios Tecnológicos da Embrapa Soja
Caixa Postal 231 - Distrito de Warta
86001-970 - Londrina, PR
Telefone 43 371-6000 Fax 43 371-6100

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa do Comitê de Publicações da Embrapa Soja

ISSN 1516-7860

Macrophomina phaseolina em soja: sistema de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética

Álvaro Manuel Rodrigues Almeida
Eleno Torres
José Renato Bouças Farias
Luis Carlos Benato
Mauro Caetano Pinto
Silvana R. R. Marin

Embrapa

comitê de publicações

Presidente: JOSÉ RENATO BOUÇAS FARIAS

Secretaria executiva: CLARA BEATRIZ HOFFMANN-CAMPO

Membros: ALEXANDRE LIMA NEPOMUCENO
ANTÔNIO RICARDO PANIZZI
CARLOS ALBERTO ARRABAL ARIAS
FLÁVIO MOSCARDI
JOSÉ FRANCISCO F. DE TOLEDO
LÉO PIRES FERREIRA
NORMAN NEUMAIER
ODILON FERREIRA SARAIVA

Bibliotecário: ADEMIR B. ALVES DE LIMA

Coordenador de editoração: ODILON FERREIRA SARAIVA

diagramação

HÉLVIO BORINI ZEMUNER

tiragem

2500 exemplares
julho/2001

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação
Embrapa Soja

Macrophomina phaseolina em soja: sistema de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética / Álvaro M.R. Almeida ...[et al.]- Londrina: Embrapa Soja, 2001.

47p. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860; n.34).

1.Soja-Doença-Fungo-Brasil. 2. *Macrophomina phaseolina*. I.Almeida, Álvaro M.R. II.Torres, Eleno. III.Farias, José R.B. IV.Benato, Luis Carlos. V.Pinto, Mauro Caetano. VI.Marin, Silvana, R.R. VII.Título VIII.Série.

CDD 633.3494

Apresentação

A produtividade da soja no Brasil tem atingido valores altamente satisfatórios, especialmente quando se consideram as condições de clima tropical e subtropical do País e que essa cultura está proporcionalmente mais cultivada em solos de cerrado, sabidamente deficientes em nutrientes.

Diversos fatores, observados anualmente, entretanto, contribuem para reduções de rendimento. Um desses fatores é a ocorrência de doenças.

A mancha carvão, causada por *Macrophomina phaseolina* é uma doença comumente encontrada em campos cultivados com soja, afetando as raízes das plantas e causando prejuízos ao produtor brasileiro. Um questionamento normalmente feito pelos produtores relaciona-se à incidência dessa doença nos sistemas de semeadura direta, prática em expansão no Brasil. Infelizmente, muito pouco foi ainda pesquisado, procurando comparar a ocorrência e a incidência de doenças de soja, nos dois sistemas de cultivo, direto e convencional. Além disso, nada se sabe quanto à diversidade genética desse patógeno, bem como sobre o efeito de rotações e sistemas de cultivo nessa característica. O presente estudo procurou reunir informações sobre *M. phaseolina*, analisando resultados obtidos pela Embrapa Soja, iniciando assim uma busca por soluções que eliminem ou reduzam as perdas causadas aos produtores.

José Renato Bouças Farias

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

Sumário

ABSTRACT.....	07
1. INTRODUÇÃO	09
2. CARACTERÍSTICAS DO FUNGO E SINTOMAS	12
3. MANEJO DO SOLO E SEVERIDADE DA PODRIDÃO DE CARVÃO.....	15
4. FATORES PREDISPOANTES À INFECÇÃO.....	17
5. VARIABILIDADE GENÉTICA.....	20
6. RESISTÊNCIA GENÉTICA.....	20
7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SISTEMA DE SEMEADURA SOBRE A INCIDÊNCIA EM RAÍZES DE SOJA.....	21
8. SOBREVIVÊNCIA EM RESTOS DE CULTURA.....	31
9. ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE <i>Macrophomina phaseolina</i>	32
10. AGRADECIMENTOS	40
11. LITERATURA CITADA	40

***Macrophomina phaseolina* IN SOYBEAN:
EFFECT OF TILLAGE SYSTEM, SURVIVAL ON
CROP RESIDUES AND GENETIC DIVERSITY**

ABSTRACT

Charcoal rot caused by the anamorphic fungus *Macrophomina phaseolina* Tass (Goid) is a very common disease of soybean roots around the world. It is favored by drought and no source of genetic resistance has been identified yet. In Brazil, the soybean area cultivated under no till has increased along the years. However, no research has been done to evaluate and compare the severity of this disease in the no till and the conventional systems. Isolates of the fungus from different regions exhibit differences in morphology and rate of growth in PDA suggesting the presence of genetic variability among them. In order to investigate these issues, three studies were carried out: 1) Determination of the effect of tillage systems on the fungus severity, during four growing seasons; 2) Survival on soybean debris and, 3) Evaluation of the genetic diversity among isolates from different Brazilian regions. The results showed that the infection occurred in soybean roots in all four growing seasons studied (1997/01) regardless of the no till and conventional treatments. However, in dry years, the severity was significantly different with higher values in the conventional system. Drought occurred in 1998/99 and 1999/00. In these two seasons, disease severity measured at the final stage of plant development were 22% and 25 % higher in conventional system, compared to no till. The area under disease progress curve was used to measure the disease epidemics. The results were also significantly different between both treatments in 1998/99 and 1999/00. Survival of pathogens in

soybean debris kept over the soil surface or at 10 cm depth during the fallow season (March through September) showed *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium sp.*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* as the most frequently isolated species. *M. phaseolina* survived and multiplied in soybean debris. RAPD (random amplified polymorphic DNA) tests were conducted with 55 isolates to investigate their genetic similarity. Twenty-two primers were used and the banding patterns were compared using the UPGMA method. Cluster analysis showed three distinct genetic groups. The apparent low genetic variability inside each group may be explained by the lack of a sexual stage in the fungus life cycle or by the easy and natural transmission of the fungus by seeds that spread the isolates throughout the Brazilian soybean growing regions. An interesting fact observed in this study was the presence of different haplotypes in the same root. Plant roots from the States of Mato Grosso and Rio Grande do Sul were infected by isolates classified in different cluster.

***Macrophomina phaseolina* em soja: sistema de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética**

ÁLVARO M. R. ALMEIDA¹, ELENO TORRES², JOSÉ R. B. FARIAS¹,
LUIS C. BENATO³, MAURO C. PINTO³ e SILVANA R. R. MARIN³

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid é capaz de infectar raízes, hastes, folhas e frutos de diversas espécies vegetais (Wyllie, 1988).

No Brasil, a ocorrência desse patógeno foi relatada pela primeira vez, infectando raízes de feijão (Bitancourt, 1935).

Na soja, o fungo causa a doença denominada podridão de carvão (Fig. 1), anomalia mais comumente encontrada nas raízes, no Brasil.

Por diversos anos, sua importância foi negligenciada por aparecer normalmente nos estádios finais de desenvolvimento da cultura. Num levantamento de doenças de soja, Lehman *et al* (1976) constataram que em 104 lavouras, avaliadas quanto à incidência e severidade das doenças, 5% apresentavam infecção radicular causada por *M. phaseolina*.

No entanto, os danos causados a essa cultura no Brasil foram primeiramente relatados por Ferreira *et al.* (1979), constatando que em anos secos, na região norte do Estado do Paraná, as perdas em soja das cultivares tardias Viçoja e Santa Rosa chegaram a 50%.

¹ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Embrapa Soja, Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina, PR.

² Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Embrapa Soja, Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina, PR.

³ Técnico de Laboratório, Embrapa Soja, Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina, PR.



Figura 1. Raízes de soja infectada por *Macrophomina phaseolina*, mostrando microesclerócios (pontuações escuras) que se desenvolvem abaixo da epiderme.

Dados mais recentes, demonstram os prejuízos causados por essa doença, no Brasil, quando Wrather *et al.* (1997) estimaram que as perdas, em 1996/97, atingiram 900 mil toneladas de grãos. Nos EUA os relatos informados por Sinclair & Gray (1972) e Wyllie (1974), indicam perdas de até 20%.

À semelhança de outras enfermidades, o método mais prático e econômico para controlar a podridão de carvão seria através do uso de cultivares resistentes. No entanto, nenhum genótipo foi identificado com resistência a essa doença, embora tolerância tenha sido relatada por Smith & Carvil (1997).

Uma alternativa de controle poderia ser através do uso de rotação de culturas. Entretanto, este fungo é polífago, sendo capaz de infectar centenas de espécies vegetais tais como algodão, amendoim, girassol, sorgo, entre outras (Ghaffar & Zentmyer, 1968; Figueiredo *et al.*, 1969; Mendes *et al.*, 1971), além de ser capaz de sobreviver e multiplicar em restos de cultura (Pearson *et al.*, 1984; Almeida *et al.*, 2001). Infelizmente, devido à capacidade desse fungo infectar centenas de espécies vegetais, o controle através de rotação de culturas torna-se uma prática inútil.

Uma outra alternativa de controle seria interferindo na biologia e na sobrevivência do patógeno, através de manejo do solo, promovendo ambiente inadequado para o desenvolvimento do patógeno (Kendig *et al.*, 2000) e/ou favorecendo organismos antagonistas (Vilich, 1993) através de rotação de culturas.

No Brasil, o manejo do solo tem sido caracterizado principalmente pela semeadura convencional. Ultimamente, constata-se acentuado aumento da área com semeadura direta (Saturnino, 1998), caracterizada pela manutenção de restos de cultura sobre a superfície do solo. Essa prática, além de reduzir a erosão, interfere nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

A contínua produção de soja em campos de semeadura direta (monocultura) pode resultar no acúmulo de palha, a qual é citada como agente favorecedor de enfermidades e como um problema ao sistema de semeadura direta. Trabalho conduzido por Saraiva & Torres (1999) demonstrou que 50% dos restos de cultura de soja são encontrados sobre o solo, cerca de seis meses após a colheita.

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

O desenvolvimento de pesquisas para conhecimento da epidemiologia e etiologia de doenças radiculares é normalmente

escasso. Muito pouca pesquisa foi feita procurando avaliar o efeito do sistema de semeadura direta nas doenças radiculares.

Foi através do trabalho de Wrather *et al.* (1998) que primeiro se avaliou o efeito do sistema de preparo do solo sobre a concentração de microesclerócios desse fungo no solo. Eles concluíram, após três anos de estudo, que o sistema de semeadura direta não afetou a incidência da podridão de carvão em raízes de soja. No Brasil, no entanto, sob condições tropicais, muito pouco é conhecido sobre o progresso da doença nos dois sistemas de preparo do solo.

2. CARACTERÍSTICAS DO FUNGO E SINTOMAS

A denominação desse patógeno foi determinada por Goidanish (1947) após revisar a taxonomia do gênero *Macrophomina*, constituído por apenas uma espécie: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Diferenças morfológicas entre isolados têm sido descritas por Pearson *et al.* (1987a) e Pearson *et al.* (1987b). No Brasil, pelo menos dois tipos distintos de morfologia têm sido isolados (Fig. 2).

O fungo tem micélio uninucleado, embora células das extremidades do micélio, região de crescimento, sejam usualmente multinucleadas (Knox-Davies, 1967).

O fungo produz picnídios em tecido vivo e também em outras partes de plantas esterilizadas (Lutrell, 1946; Machado & Kimati, 1975). No entanto, nem todos os isolados produzem picnídios. Machado (1987) observou que entre doze isolados estudados, metade produziu picnídios, quando cultivados em meio de BDA. Os picnídios são negros e globosos, com tamanho variável entre 100 a 250 μm . A variação no tamanho parece estar associada ao substrato sobre o qual o fungo se desenvolve (Dhingra & Sinclair, 1978).

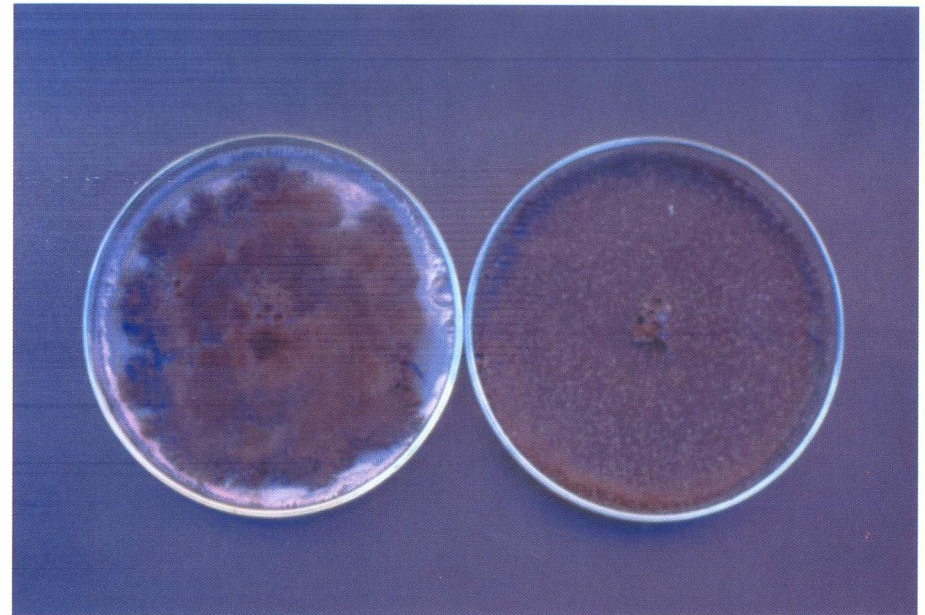


Figura 2. Diferenças morfológicas observadas entre isolados de *Macrophomina phaseolina*, obtidos de soja e cultivados em meio de batata-dextrose-agar.

Os picnidiosporos formados são unicelulares e hialinos apresentando uma razão 3:1 entre comprimento e largura.

Em tecidos infectados, o fungo produz microesclerócios em grande quantidade, os quais são a principal fonte de inóculo desse patógeno. Microesclerócios são produzidos a partir do micélio, consistindo de estrutura multicelular, duras e resistentes a condições adversas e facilmente encontrados sob a epiderme das raízes e no colo. Com a decomposição desses tecidos, os microesclerócios são liberados no solo. Em contacto com a planta as células germinam e infectam as raízes. Nem todas as células germinam na mesma época. Assim, um microesclerócio pode ter células germinando e infectando plantas em períodos diferentes.

A longevidade dos microesclerócios viáveis, no solo, varia de três meses a três anos, segundo Dhingra & Sinclair (1978). De acordo com Cook *et al.* (1973), a longevidade tende a diminuir com o tempo. Short *et al.* (1980) estudaram a sobrevivência de microesclerócios no período de maio de 1975 a outubro de 1977. A profundidade de enterro dos microesclerócios no solo não afetou a germinação dos mesmos. A população de microesclerócios germináveis avaliada no final do estudo foi maior do que aquela observada no início, demonstrando que em solo sob pousio houve aumento dessa população, devido à vida saprofítica do fungo. Esse fato foi também observado por Almeida *et al.* (2001), em restos de cultura de soja mantidos sob ou sobre o solo, demonstrando que o fungo sobrevive e se multiplica saprofiticamente.

Segundo Short *et al.* (1980) a população de microesclerócios foi proporcional ao número de anos cultivados, consecutivamente, com soja e milho. Da mesma forma, a severidade de raízes de soja infectadas foi diretamente relacionada à concentração de microesclerócios, no solo. Os autores concluíram que o rápido aumento dos microesclerócios em solos cultivados com hospedeiros suscetíveis, a persistência desses propágulos no solo e em resíduos de soja e a direta relação entre concentração de microesclerócios e redução de rendimento não permitem que esta doença possa ser controlada por rotação de cultura.

Diversos estudos têm demonstrado que *M. phaseolina* é capaz de infectar mais de 300 espécies vegetais (Young, 1949; Songa & Hillocks, 1996), sendo feijão, caupi, milho, amendoim, girassol, soja, sorgo e crotalaria, as espécies suscetíveis mais comuns no Brasil.

Estudos feitos na Embrapa Soja mostraram que esse fungo é naturalmente encontrado em solos da mata nativa ou em solos cultivados. No caso de solos de mata nativa a concentração encontrada foi de 0,42 microesclerócios/g solo seco. No entanto, em

áreas vizinhas, cultivadas com soja ou milho, por mais de cinco anos, a concentração variou de 15 a 111 microesclerócios/g solo seco.

Os sintomas variam de acordo com a idade da planta, durante a infecção. Infecção durante a emergência causa lesões de coloração marrom escura, na região do colo. A infecção tende a ser mais severa se houver baixa umidade do solo e alta temperatura. As plantas infectadas ocorrem aleatoriamente, nas fileiras, devido à desuniformidade de distribuição de microesclerócios no solo. As lesões podem ser confundidas com lesões causadas por *Rhizoctonia solani*. No entanto, as lesões de *M. phaseolina* não são profundas e nem causam estrangulamento do hipocótilo. As plantas infectadas que sobrevivem à infecção inicial vão apresentar sintomas de amarelecimento na época de formação de vagens, similar à maturação normal. O amarelecimento é progressivo, levando à murcha. Ramos ficam caídos, ao longo das hastes, mantendo as folhas aderidas às mesmas as quais tornam-se secas e de coloração marrom escura. Nessas plantas, as raízes apresentam a epiderme solta, ou facilmente destacável, deixando à mostra pontuações negras, que são os microesclerócios.

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

3. MANEJO DO SOLO E SEVERIDADE DA PODRIDÃO DE CARVÃO

Com o conhecimento da ação polífaga desse fungo, ficou claro que o sistema de rotação de cultura era uma medida inviável para o controle dessa doença (Short *et al.*, 1980). Trabalho conduzido por Singh *et al.* (1990) confirmou essa observação. Trabalhando na

região de Patancheru, Índia, os autores avaliaram diversos sistemas de rotação quanto ao efeito na produção de microesclerócios, determinada através de análise de amostras de solo. O cultivo de sorgo, seguido por caupi ou grão de bico, favoreceu o aumento da concentração de microesclerócios, no solo, em relação a outros sistemas de rotação. No entanto, sistemas de cultivo com pousio, seguindo com semeadura de sorgo ou grão de bico, estabilizou a densidade de inóculo.

Além da rotação de culturas, outra questão relacionada à concentração de microesclerócios é o sistema de preparo do solo. Em 1988, Olanya & Campbell determinaram o efeito da distribuição de microesclerócios dentro das parcelas, constatando que a agregação dos mesmos, no solo, diminuiu após revolvimento com aração. Em parcelas com alta concentração inicial de microesclerócios e com maior nível de agregação, o revolvimento causou maior distribuição na área.

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

4. FATORES PREDISPONETES À INFECÇÃO

A severidade de *M. phaseolina* tem sido associada a pelo menos dois fatores: déficit hídrico e temperatura do solo. Nos anos 60, dois pesquisadores determinaram que a severidade da podridão de carvão, em sorgo, foi maior quando as plantas foram submetidas a déficit hídrico (Hsi, 1961; Edmunds, 1964).

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

Trabalhos mais recentes procuraram avaliar o efeito do potencial hídrico no desenvolvimento de *M. phaseolina*. Segundo Olaya & Abawi (1996a), o máximo desenvolvimento micelial, em meio de BDA, foi obtido com potencial osmótico da água entre -1.220 e -1.880 J/kg. A biomassa, obtida pelo cultivo em meio de batata-dextrose, foi máxima quando o potencial osmótico esteve entre -2.030 e -3.340 J/kg.

A produção de microesclerócios não foi afetada quando o potencial osmótico ficou entre -670 e -3920 J/kg, mas foi completamente inibida com valores entre -8.270 e -12.020 J/kg. Os resultados demonstram que *M. phaseolina* pode desenvolver-se e produzir grandes quantidades de microesclerócios em condições de baixo potencial osmótico. Segundo Olaya & Abawi (1996a) essa observação pode explicar a ocorrência da doença em condições de seca.

Em outro estudo, Olaya & Abawi (1996b) procuraram avaliar o efeito do potencial da matriz do solo na sobrevivência de microesclerócios. Foram utilizados os potenciais de 0, -10, -30, -100, -300, -500 e -1.500 J/kg. É importante que se mencione que a condição ideal de umidade do solo, para a cultura da soja, é de -30 J/kg, equivalente à capacidade de campo. Duas e quatro semanas após os autores observaram que os microesclerócios das amostras

de solo, mantidas a 30°C e a potenciais osmóticos de -10 e -1.500 J/kg apresentavam viabilidade de 40% e 0% , respectivamente. No entanto, microesclerócios mantidos em solo seco ao ar apresentavam 100% de viabilidade. Os autores também avaliaram o efeito do potencial osmótico da água na colonização de fragmentos de hastes de feijão.

A colonização dos fragmentos de hastes de feijão aumentava à medida que diminuía o potencial osmótico da água, atingindo o máximo de colonização com o valor de -3.990 J/kg, decrescendo a partir desse valor. Da mesma forma, o número de microesclerócios desenvolvidos no tecido infectado seguiu a mesma resposta da colonização. Estes trabalhos demonstraram que *M. phaseolina* pode sobreviver e colonizar fragmentos de haste de feijão, mesmo em condições de baixíssimo teor de umidade.

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

níveis intermediários de microesclerócios, em comparação com aquelas sempre irrigadas e aquelas sem irrigação.

Em relação à temperatura, observou-se aumento na severidade da doença em algodão, quando a temperatura foi mantida entre 30°C e 40°C (Ghaffar & Erwin, 1969). Embora temperatura do solo tenha sido citada como um componente contribuinte de infecção, provavelmente por debilitar a planta, o trabalho de Manici *et al.* (1995) procurou avaliar o efeito de temperatura sobre o fungo.

Diferentes isolados, oriundos de regiões mais frias e de regiões quentes da Itália foram testados quanto à capacidade de se desenvolverem em diferentes temperaturas. Os autores constataram que os isolados tendem a se desenvolver melhor nas temperaturas similares àquelas das regiões onde se desenvolvem naturalmente. No entanto, vários isolados se desenvolveram em temperaturas diferentes daquelas onde são originalmente encontrados, mostrando também uma capacidade de adaptação.

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

O fato de que alta temperatura e baixa umidade do solo são os fatores mais importantes na predisposição de sorgo à infecção foi citado por Frederiksen (1986). Em soja, entretanto, não foram encontradas citações à respeito.

Essas observações, provavelmente, explicam o desenvolvimento da podridão de carvão em áreas caracterizadas por altas temperaturas e sujeitas a estiagem.

5. VARIABILIDADE GENÉTICA

Diversos trabalhos relatam diferenças em morfologia e patogenicidade entre isolados de *M. phaseolina* (Pearson *et al.*, 1987a; 1987b). Essas diferenças têm sido observadas, principalmente, com isolados cultivados em meios contendo clorato de potássio (Cloud & Rupe, 1991). Segundo Pearson *et al.* (1986), essas diferenças permitiriam identificar isolados específicos de certas espécies vegetais. Com a disponibilidade de novas técnicas em biologia molecular, como RAPD (random amplified polymorphic DNA) a identificação de isolados, geneticamente diferentes, ficou mais fácil.

O trabalho desenvolvido por Fuhlbohm *et al.* (1997) foi pioneiro no uso de RAPD na determinação de variabilidade genética entre isolados de *M. phaseolina* de caupi, na Austrália. Simultaneamente, Almeida *et al.* (1997) constataram a ocorrência de diversidade entre isolados de soja, no Brasil.

Recentemente, Su *et al.* (2001) demonstraram que isolados de *M. phaseolina* de um mesmo hospedeiro são geneticamente similares mas bem diferentes de isolados oriundos de outros hospedeiros. Além disso, provaram que isolados resistentes a clorato de potássio são diferentes daqueles considerados suscetíveis.

Esses resultados demonstram a ocorrência de variabilidade genética nesta espécie e a necessidade de maiores estudos procurando determinar possível efeito de sistemas de rotação e de preparo do solo na alteração da diversidade genética ao longo dos anos.

6. RESISTÊNCIA GENÉTICA

O controle de doenças pode envolver uma ou várias estratégias. Uma dessas estratégias é o uso de cultivares resistentes. No entanto, para que isso seja possível, é necessário que se conheçam genes que confirmam essa resistência.

No caso da podridão de carvão, em soja, infelizmente, isso não foi ainda detectado, embora Smith & Carvill (1997) comentem sobre cultivares que reagem diferentemente quando infectadas por esse fungo. Vinte e quatro cultivares pertencentes aos grupos III e IV de maturação foram cultivados em campo. Os resultados demonstraram que algumas cultivares apresentaram menor número de microesclerócios formados nas raízes, no estágio R7 de desenvolvimento, uma possível indicação de resistência. Embora todas as cultivares tenham sido infectadas, o método mostrou-se demorado, fato que sugere necessidade de mais pesquisa nessa área.

7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SISTEMA DE SEMEADURA SOBRE A INCIDÊNCIA EM RAÍZES DE SOJA.

Considerando o avanço da semeadura direta no Brasil e a falta de informações relacionadas à *M. phaseolina*, procurou-se avaliar a severidade da podridão de carvão em soja, cultivada nos sistemas convencional e direto. Todas as avaliações que compõem o presente estudo foram feitas em experimento instalado na Embrapa Soja, Londrina-PR (Tabela 1) com um histórico de 17 anos de semeaduras direta e convencional, em solo oxisol, com 67% argila, 17% silt, e 16% de areia, no horizonte Ap.

A incidência de raízes infectadas foi determinada pela análise dos sistemas radiculares de plantas de soja cv. Embrapa 48, amostradas durante quatro anos (1997/2001) em áreas com semeaduras direta e convencional. Cinco plantas foram retiradas, ao acaso, de cada parcela, totalizando 20 plantas por tratamento (sistemas convencional e direto). As raízes foram lavadas e secas à temperatura ambiente. De cada raiz, retirou-se, aleatoriamente,

quatro fragmentos (raiz principal e outras) os quais foram esterilizados em 0,5% de hipoclorito de sódio por 1 min e depois lavados em água esterilizada. Os fragmentos foram plaqueados em meio de BDA contendo 0,1 g/l de sulfato de estreptomicina. As placas foram incubadas a 26°C no escuro e a avaliação feita sete dias após. A porcentagem de plantas infectadas foi utilizada para determinação da incidência da doença, em cada época de amostragem e os mesmos dados, em porcentagem, utilizados para a obtenção da área abaixo da curva de progresso da doença, segundo Shaner & Finney (1977).

Tabela 1. Esquema de rotação/ sucessão utilizado na Embrapa Soja, nos sistemas de semeadura direta e convencional. Embrapa Soja, Londrina, PR.

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

Legenda: AV = aveia; ML = milho; SJ = soja; TM = tremoço; TR = trigo
Ad = arado de disco; Di = semeadura direta; S = sucessão; R = rotação.

A intensidade de colonização das raízes foi feita através da contagem de microesclerócios formados. Isso foi determinado utilizando o restante do sistema radicular das plantas amostradas, o qual foi moído e uma amostra de 0,5 g foi misturada a 80 ml de meio específico segundo Mihail & Alcorn (1982) com posterior distribuição em cinco placas de petri, as quais foram incubadas a 28°C por nove dias. A contagem do número de unidades formadoras de colônias (ufc) (Fig. 3) foi feita sob microscópio estereoscópico. A mesma avaliação foi feita em amostras de solo, retiradas na

profundidade de 0 -10 cm, nos dois sistemas de preparo do solo no estádio R5 (Fehr *et al.*, 1971). As amostras, dentro de cada parcela, foram misturadas. De cada amostra composta, retiraram-se 10 g de solo peneirado em malha com 2 mm de abertura, lavado em solução de hipoclorito de sódio e misturado a meio específico, segundo Mihail & Alcorn (1982).

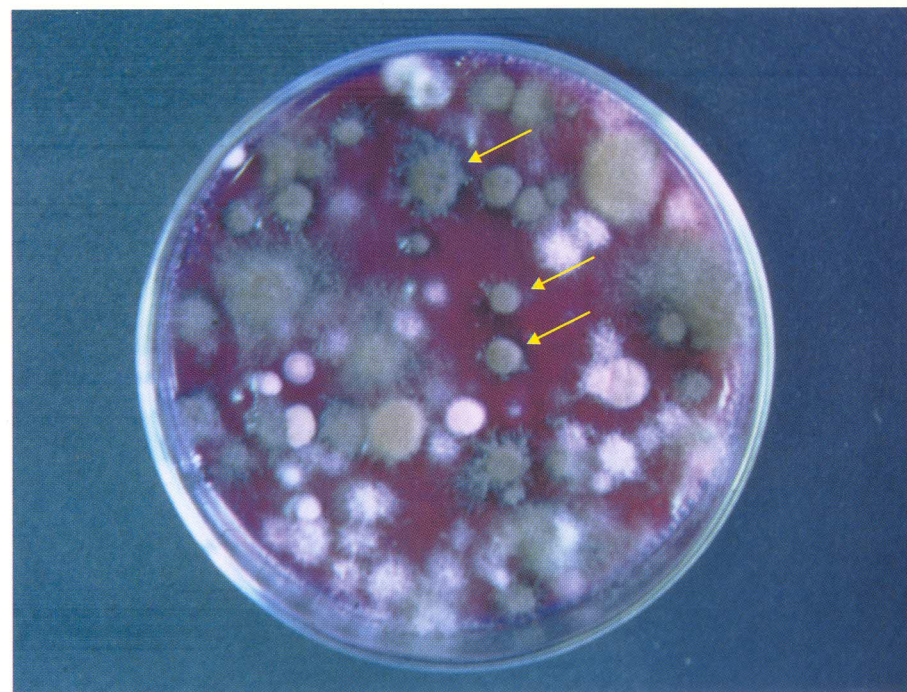


Figura 3. Desenvolvimento de *Macrophomina phaseolina* em meio específico, para determinação da população de microesclerócios em amostras de solo. Setas mostram colônias acinzentadas, típicas do fungo.

A distribuição espacial de microesclerócios foi avaliada através da amostragem no solo. Dentro de uma área com semeadura direta e outra com semeadura convencional, foram delimitados 16 quadrados contíguos, medindo 0,4 m de lado, cada um. Dentro de cada quadrado, coletaram-se cinco amostras de solo, utilizando

trado com cinco cm de diâmetro. Da amostra composta de solo, retiraram-se cinco gramas para determinação da concentração de microesclerócios, utilizando o meio de Mihail & Alcorn (1982). Os dados foram utilizados no programa Statistica versão 5.1 (StatSoft InC., Tulsa, OK, EUA) para determinação do gráfico de distribuição espacial. O gráfico foi estimado a partir das coordenadas de X e Y, de acordo com o método "Distance-weighted least squares", com ajuste da curva dos dados através de regressão polinomial de 2ª ordem, gerada pelo programa.

A infecção de raízes de soja por *Macrophomina phaseolina* ocorreu em ambos os sistemas de semeadura, em todos os anos do estudo. No entanto, pôde-se constatar que, em dois anos, houve maior severidade da doença nas parcelas com sistema de semeadura convencional (Fig. 4, B e C). Em geral, a infecção aumentou ao longo do ciclo da cultura. A doença foi mais evidente nas raízes coletadas no final de ciclo, mostrando coloração marrom escura do sistema vascular. Em raros casos, observaram-se ramos secos, caídos e aderidos às plantas, sintoma tradicionalmente visto dessa doença.

A análise da epidemia da doença, avaliada durante quatro anos agrícolas (1997/2001) através da medição da área abaixo da curva de progresso de doença, foi significativa apenas nos anos de 1998/99 e 1999/00 (Tabela 2), Esses dois anos, foram aqueles considerados secos, onde o total de chuva, no ciclo da cultura, foi menor do que 840 mm, citado por Berlato & Bergamaschi (1979) como ideal para essa cultura nas condições brasileiras.

A análise do número de microesclerócios formados nas raízes, constitui um novo parâmetro de avaliação para o efeito do sistema de semeadura e umidade do solo, na severidade da doença. Embora avaliada em apenas um ano, constatou-se maior número de microesclerócios nas raízes retiradas do sistema de semeadura convencional. Também ficou evidente o efeito de ano. A densidade de microesclerócios, formados nas raízes das plantas amostradas,

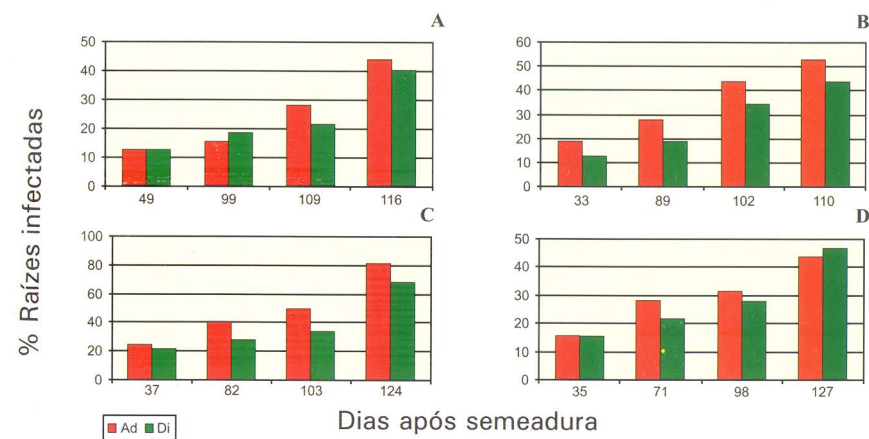


Figura 4. Efeito do sistema de semeadura (convencional e direta) sobre a porcentagem de raízes de soja cv. Embrapa 48 infectadas com *Macrophomina phaseolina*, avaliadas nos anos agrícolas 1997/01. Valores correspondem à média de 20 avaliações. Ad = sistema convencional; Di = sistema direto. A=1997/98 (876m chuva); B=1998/99 (689 mm chuva); C=1999/2000 (474 mm chuva); D=2000/01 (846 mm chuva).

Tabela 2. Área abaixo da curva de progresso de doença, determinada pela porcentagem de raízes de soja cv. Embrapa 48 infectadas por *Macrophomina phaseolina*. Plantas coletadas nos sistema de semeadura convencional e direta. Volume de chuva refere-se ao período de novembro a março de cada ano agrícola. Embrapa Soja, Londrina, PR.

Ano	Convencional	Direta	Chuva (mm)
1997/98	935.94* a	940.63 a	876,3
1998/99	1118.75 a	850.00 b	689,9
1999/00	2189.06 a	1764.06 b	474,3
2000/01	1637.50 a	1518.75 a	846,9

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

mostrou que, dependendo do ano, há diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tabela 3). Esse fato necessita de maior número de anos para confirmação dos resultados obtidos.

Nos mesmos anos, a população de microesclerócios foi maior no sistema convencional. Os dados estão de acordo com observações de Kendig *et al.* (2000) os quais detectaram menor infecção em plantas de soja irrigadas. Os resultados mostraram que a umidade do solo tem efeito significativo na infecção das raízes de soja e indica que infecções precoces acontecem com maior intensidade em solos com baixa umidade.

Tabela 3. Densidade de microesclerócios de *Macrophomina phaseolina* em amostras de solo e raízes, coletadas nas parcelas com sistema de semeadura direta e convencional. Embrapa Soja, Londrina, PR.

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

¹CFU/g, avaliados em 0,25 g de raízes moídas.

²CFU/g solo, avaliados em 5 g solo.

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

Outra avaliação deste trabalho foi a determinação da concentração de microesclerócios no solo. Constataram-se diferenças entre os anos e entre os tratamentos. As maiores

concentrações foram detectadas no sistema convencional. No ano 2000/01 a concentração de microesclerócios foi maior do que no ano de 1999/00. Entretanto, esse fato não se relacionou à infecção. Esse dado, difere da observação de Short *et al.* (1980), mas está de acordo com Wrather *et al.* (1998). No trabalho de Zambolim *et al.* (1983), os autores constataram que houve aumento na porcentagem de raízes de soja infectadas por *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani* quando houve aumento do inóculo no solo. Estudos adicionais poderão esclarecer essa observação, visto que Bruton *et al.* (1987), trabalhando com cantaloupe não detectou correlação entre o número de microesclerócios e o número de plantas infectadas.

Com relação ao aumento do número de microesclerócios, os dados obtidos confirmam importante relato de Dhingra & Sinclair (1978) os quais determinaram que o cultivo de soja e milho aumentaram a quantidade de microesclerócios no solo.

Um fato interessante, determinado neste estudo, foi a presença de *M. phaseolina* em solo de mata, sem histórico de cultivo anterior e também em solo cultivado com café. Embora encontrado em baixíssima concentração, essa presença demonstra ser o patógeno nativo do solo e cuja população deve ter aumentado após a introdução de culturas anuais ou perenes (Tabela 4). Nesse mesmo estudo, as parcelas em sistema convencional apresentavam maior densidade de microesclerócios do que em sistema de semeadura direta.

As evidências deste estudo permitem concluir que no período estudado e nas condições climáticas da região de Londrina, o sistema de semeadura convencional promoveu maior infecção de raízes de soja por *M. phaseolina*, embora não se tenham observado diferenças em rendimento.

Como houve variação entre os anos do estudo e a severidade foi maior em anos secos, acredita-se que a umidade seja mais

importante do que a temperatura, para que esse patossistema tenha maior sucesso. Isso pode ser observado pela leitura da temperatura na superfície do solo, nas parcelas com semeaduras direta e convencional. A temperatura da superfície do solo foi levemente mais alta no sistema convencional, enquanto que a reflectância foi maior no solo com semeadura direta (Tabela 5).

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

Quadrado	SD	LDB*	SC-LDB	SD-CM	SC-CM	Café	Mata
1	8.16	5.20	77.59	68.96	0,42	0,00	
2	3.04	8.25	56,00	66.78	0,79	0,00	
3	10.11	10.88	84.83	43.46	0,00	0,76	
4	10.40	6.12	86.28	60.77	0,58	0,00	
5	0.42	10.75	72.40	56.75	0,00	0,00	
6	6.26	13.41	88.28	69.63	0,79	0,26	
7	3.68	10.86	90.34	67.52	0,58	0,00	
8	7.49	17.67	90.14	104.86	0,00	0,25	
9	7.66	34.53	83.21	53.44	0,35	0,00	
10	10.55	16.58	77.05	69.73		0,00	
11	13.47	11.53	78.08	68.73		0,00	
12	14.74	18.40	84.40	79.33		0,64	
13	4.61	19.54	80.70	98.06		1,17	
14	4:95	13.54	76.34	64.20		0,26	
15	5.66	14.38	59.99	51.84		0,51	
16	15.11	16.56	72.14	68.52		0,77	
Média	7,89	14,25	68,52	61,28	0,39	0,29	

*SD-LDB = semeadura direta, Londrina;
 SC-LDB = semeadura convencional, Londrina;
 SD-CM = semeadura direta, Campo Mourão;
 SC-CM = semeadura convencional, Campo Mourão.

Tabela 5. Temperatura (°C) da superfície do solo e albedo, medidas nos sistemas de semeadura convencional e direta. Embrapa Soja, Londrina, PR.

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

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

A avaliação da distribuição de microesclerócios no solo, nos dois sistemas de semeadura, mostra que em ambos os sistemas, tanto em Londrina quanto em Campo Mourão, os microesclerócios são distribuídos irregularmente, embora a maior média de microesclerócios, por grama de solo seco, fosse observada nas amostras do solo retirada de semeadura convencional. Em nenhum dos dois locais analisados há uniformidade na distribuição. A demonstração dessa desuniformidade na distribuição dos microesclerócios no solo pode ser observada na figura 5.

Esses resultados permitiram as seguintes conclusões:

- ✧ a infecção das raízes de soja por *M. phaseolina*, sob condições de déficit hídrico, foi favorecida sob semeadura convencional;
- ✧ solo de mata virgem, sabidamente sem histórico de cultivo de plantas anuais ou perenes, pode conter estruturas do patógeno;
- ✧ os microesclerócios são distribuídos irregularmente dentro das parcelas, havendo claramente manchas com maior concentração;
- ✧ a distribuição espacial de microesclerócios é maior no solo sob semeadura convencional.

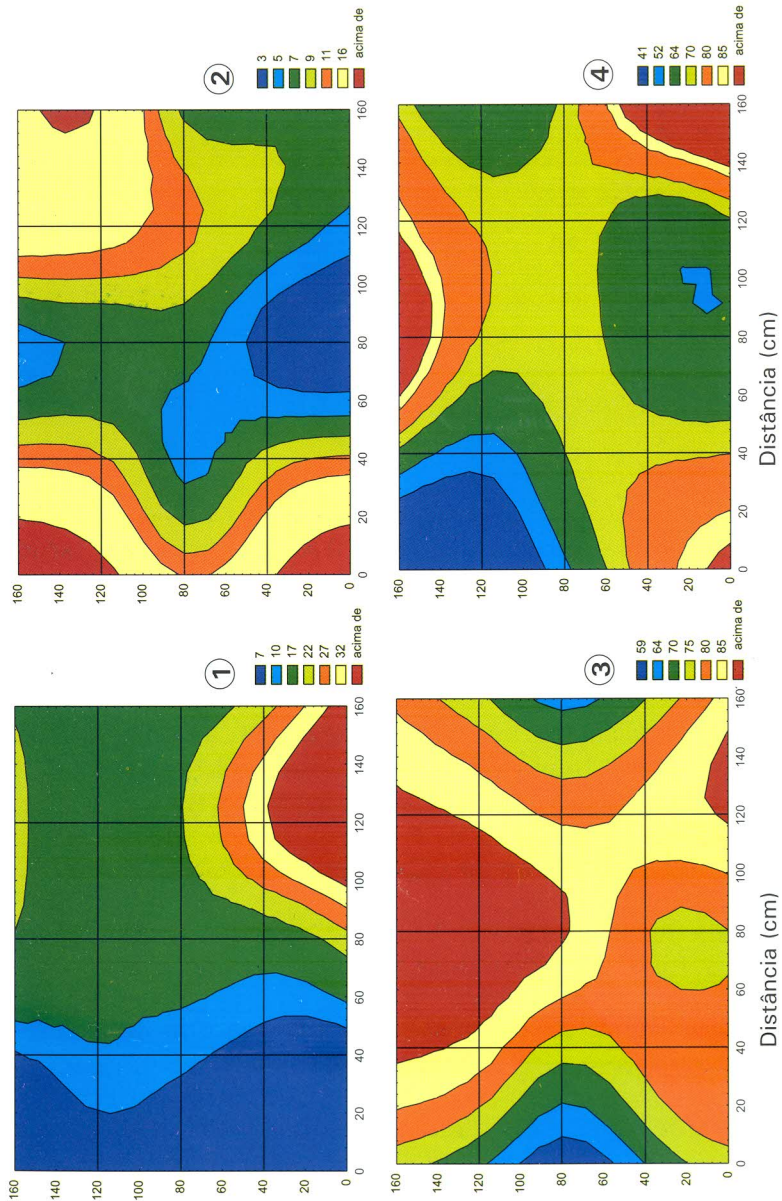


Figura 5. Distribuição espacial de microesclerócios de *Macrophomina phaseolina*, em amostras de solo com semeadura direta (1 e 3) e convencional (2 e 4), coletadas em quadrados vizinhos com área de 0,016 m² (0,4 m x 0,4 m), nos municípios de Campo Mourão (1 e 2) e Londrina (3 e 4). As médias de microesclerócios/g solo seco em cada área de 2,56 m² são: área 1 = 7,9; 2 = 14,3; 3 = 68,3 e, 4 = 79,3.

8. SOBREVIVÊNCIA EM RESTOS DE CULTURA

Uma constante questão feita pela assistência técnica e pelos produtores é com relação à sobrevivência desse fungo em sistemas de semeadura direta e convencional.

Um estudo foi estabelecido com o propósito de responder a essa questão.

Após a colheita de soja cv. Embrapa 37, coletaram-se cem gramas de resíduos de vagens, de hastes e de raízes de soja. Cada um desses tipos de tecidos foi acondicionado em sacos de tela de náilon (mesh 4 mm²), os quais foram colocados sobre o solo e também a 10 cm de profundidade.

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

Os patógenos mais frequentemente identificados foram *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis sojae*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium sp.*, *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. Com relação a *M. phaseolina*, constatou-se que a recuperação do fungo a partir dos fragmentos analisados de vagens e hastes, aumentou com o período de enterramento, enquanto que com os fragmentos mantidos sobre o solo houve diminuição de sobrevivência (Fig. 6 e 7). Fragmentos de hastes e raízes mantiveram a mesma taxa de sobrevivência, com aumento nos meses de agosto e setembro.

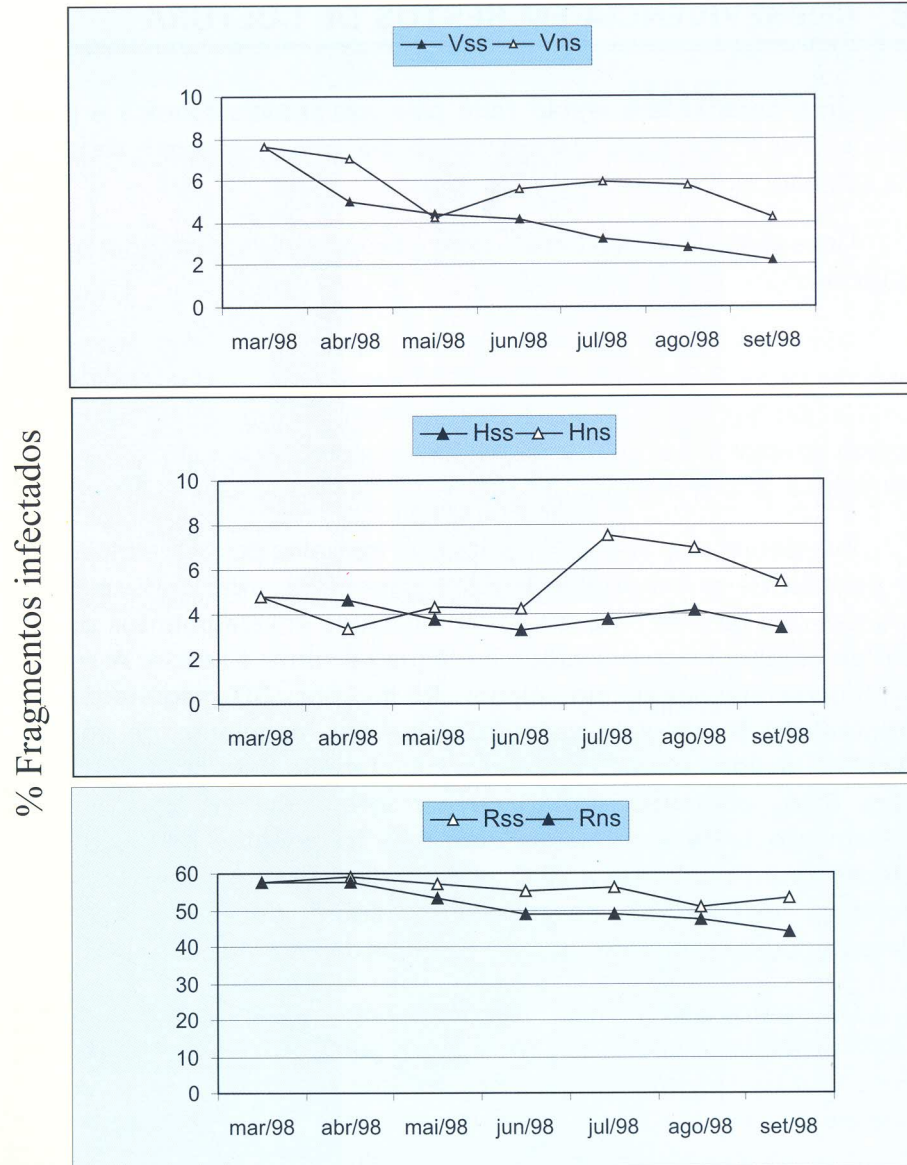


Figura 6. Porcentagem de incidência de *Macrophomina phaseolina* em fragmentos de soja mantidos sobre (ss) ou enterrados a 10 cm de profundidade (ns). V = vágem; H = haste; R = raiz. Embrapa Soja, Londrina, 1998.

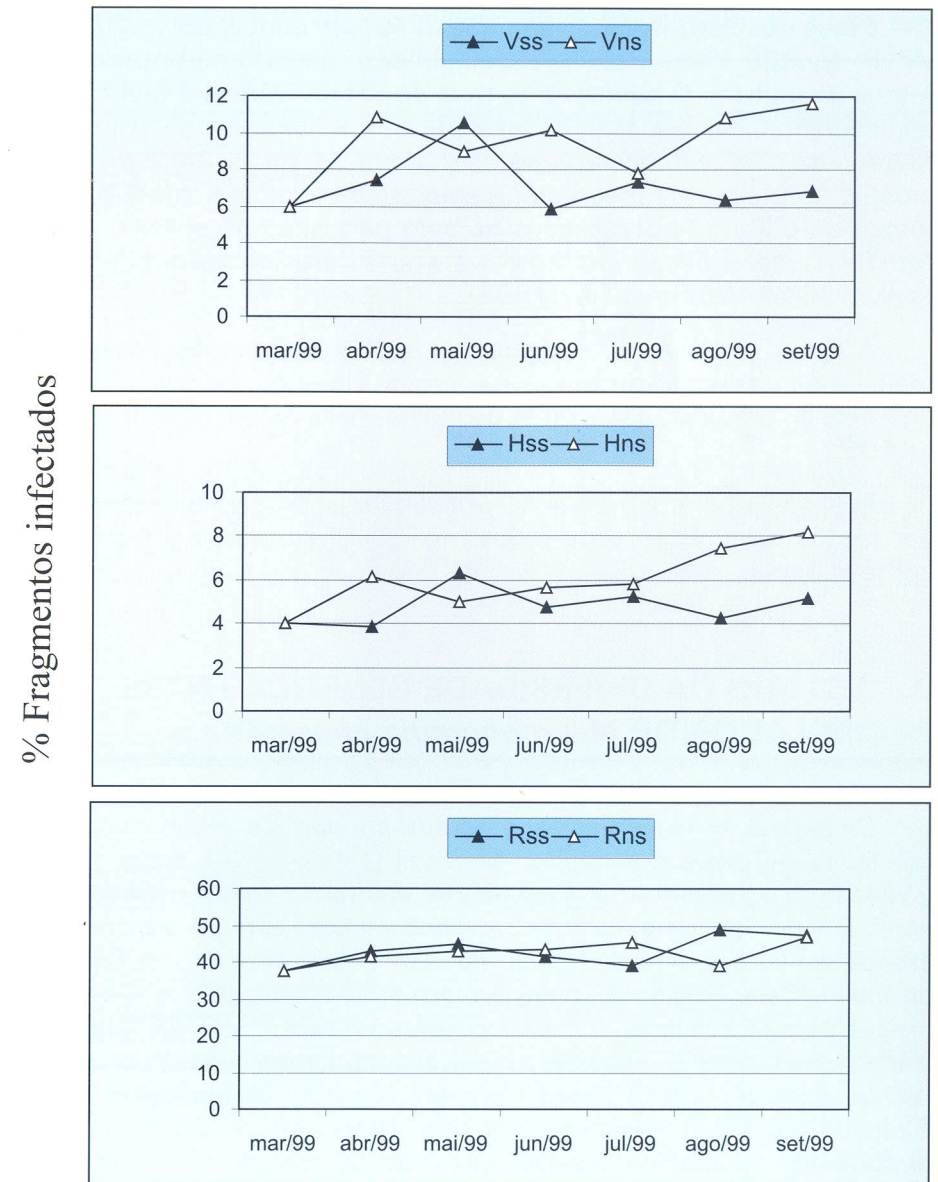


Figura 7. Porcentagem de incidência de *Macrophomina phaseolina* em fragmentos de soja mantidos sobre (ss) ou enterrados a 10 cm de profundidade (ns). V = vágem; H = haste; R = raiz. Embrapa Soja, Londrina, 1999.

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

A maior sobrevivência observada em 1998 pode ser devido ao maior inóculo inicial desse ano e provavelmente, devido à maior umidade do período, decorrente de maior precipitação do que no ano de 1999.

Este trabalho mostra que *M. phaseolina* sobrevive e desenvolve em restos de cultura enterrados, os quais contribuem para sua sobrevivência.

9. ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *Macrophomina phaseolina*.

Cinquenta e cinco isolados foram obtidos de raízes de soja, coletadas em diferentes regiões do Brasil (Tabela 6). As raízes foram lavadas em água corrente. Fragmentos das raízes foram esterilizados em 2,5 % de hipoclorito de sódio, lavados em água estéril e transferidos assepticamente para placas contendo BDA e estreptomicina (0,1 mg/ml de meio). Cada isolado foi cultivado em meio líquido (BD) e o micélio produzido, após lavado, foi utilizado para extração do DNA segundo Harlton *et al.* (1995). Todas as amostras foram amplificadas por RAPD (Williams *et al.*, 1990) usando primers (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA, USA). Reações foram conduzidas num volume final de 25 µl contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 100 M de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP and dCTP), 0.4 M do primer, uma unidade de Taq polymerase e 20 ng de DNA. A amplificação foi programada para 45 ciclos, em termociclador Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA). Cada ciclo consistiu de uma etapa de

Tabela 6. Isolados de *Macrophomina phaseolina* obtidos de diferentes raízes de soja coletadas em diferentes locais do Brasil. Embrapa Soja, Londrina, PR.

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

*P_/F_-ZZ: P_ = No. da raiz da planta usada; F_ = No. do fragmento de cada raiz isolada; ZZ = Estado de coleta (MS = Mato Grosso do Sul; MG = Minas Gerais; PR = Paraná; RS = Rio Grande do Sul).

desnaturação a 94° C por 30 seg, anelamento do primer a 35° C por 30 seg, e uma etapa de extensão a 72° C por 1 min. Os fragmentos amplificados foram separados em electroforese em gel de agarose a 1,3% corado com brometo de etídium e a seguir, fotografado. Sob luz UV a 302 nm. O resultado dos padrões das bandas observadas foi utilizado para análise com o programa NTSYS versão 2.02j (Exeter Software, Setauket, NY, USA). Coeficientes de similaridade para todas as possíveis combinações de pares de isolados foi estimada pelo método de DICE. O dendograma foi construído a partir dos coeficientes de similaridade, usando o método da média das distâncias (Unweighted pair-group method using an arithmetic average-UPGMA) recomendado por Sneath & Sokal (1973).

Para avaliar a robustez dos agrupamentos formados o conjunto de dados binários foi usado no programa WinBoot (Yap & Nelson, 1996) com 1000 repetições. Análise bi e tri-dimensional de coordenadas principais foi feita com a rotina EIGEN, do programa NTSYS.

Resultados preliminares basearam-se em 74 bandas polimórficas, obtidas com 22 primers. Cinquenta e cinco isolados forma agrupados em três grupos distintos (Fig. 8). A média de similaridade dentro dos grupos 1, 2 e 3 foi de 99%, 85% e 75%, respectivamente. O primeiro grupo foi composto de apenas três isolados (P1/F1-MS, P5/F5-MS e P1/F2-MS). Dois isolados (P1/F1-MS e P1/F2-MS) não ficaram no mesmo grupo dos isolados P1/F3-MS, P1/F4-MS e P1/F5-MS, todos originários da mesma raiz de soja. Isso mostra que uma mesma raiz está infectada por pelo menos dois isolados geneticamente diferentes. O mesmo caso aconteceu com o isolado P5/F5-MS, incluído no grupo 1 e que não se agrupou com os isolados P5/F1-MS, P5/F2-MS, P5/F3-MS e P5/F4-MS, oriundos da mesma planta P5.

O grupo 2 é o maior deles, agrupando 33 isolados com similaridade de 85%. O terceiro grupo é constituído por 19 isolados e similaridade de 75%.

A comprovação desses resultados foi obtida pelo uso da análise de coordenadas principais, mostrando que os dois vetores explicam 87% da variância total (Fig. 9). O gráfico de dupla dimensão mostra que os isolados se distribuem em três grupos.

A adição de um terceiro vetor não aumentou esse valor.

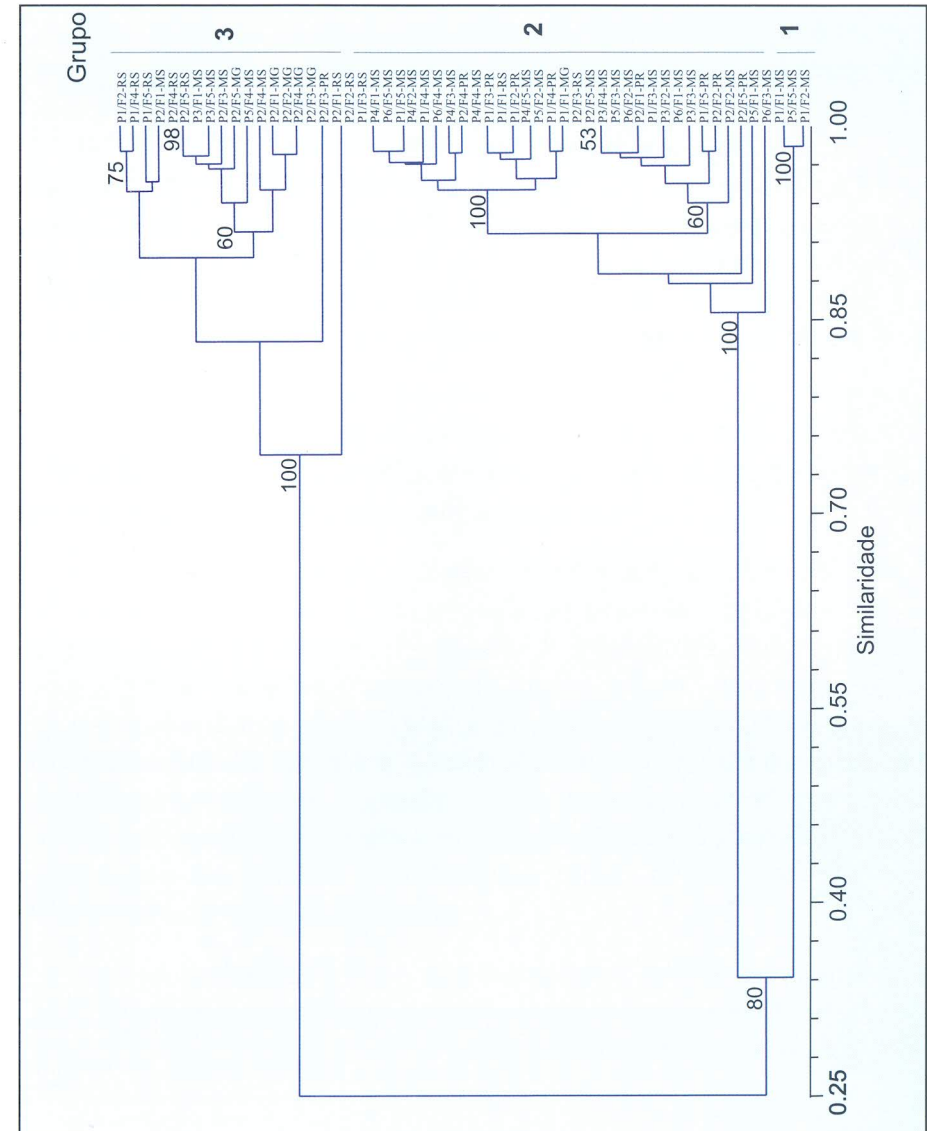


Figura 8. Dendrograma obtido pelo método de UPGMA utilizando os coeficientes DICE oriundos de análise de RAPD, de 55 isolados de *Macrophomina phaseolina*. Números nos nós representam resultados de 1000 repetições da análise de bootstrap, usando o programa WinBoot (Yap & Nelson, 1996). Apenas valores iguais ou maiores que 50% são mostrados.

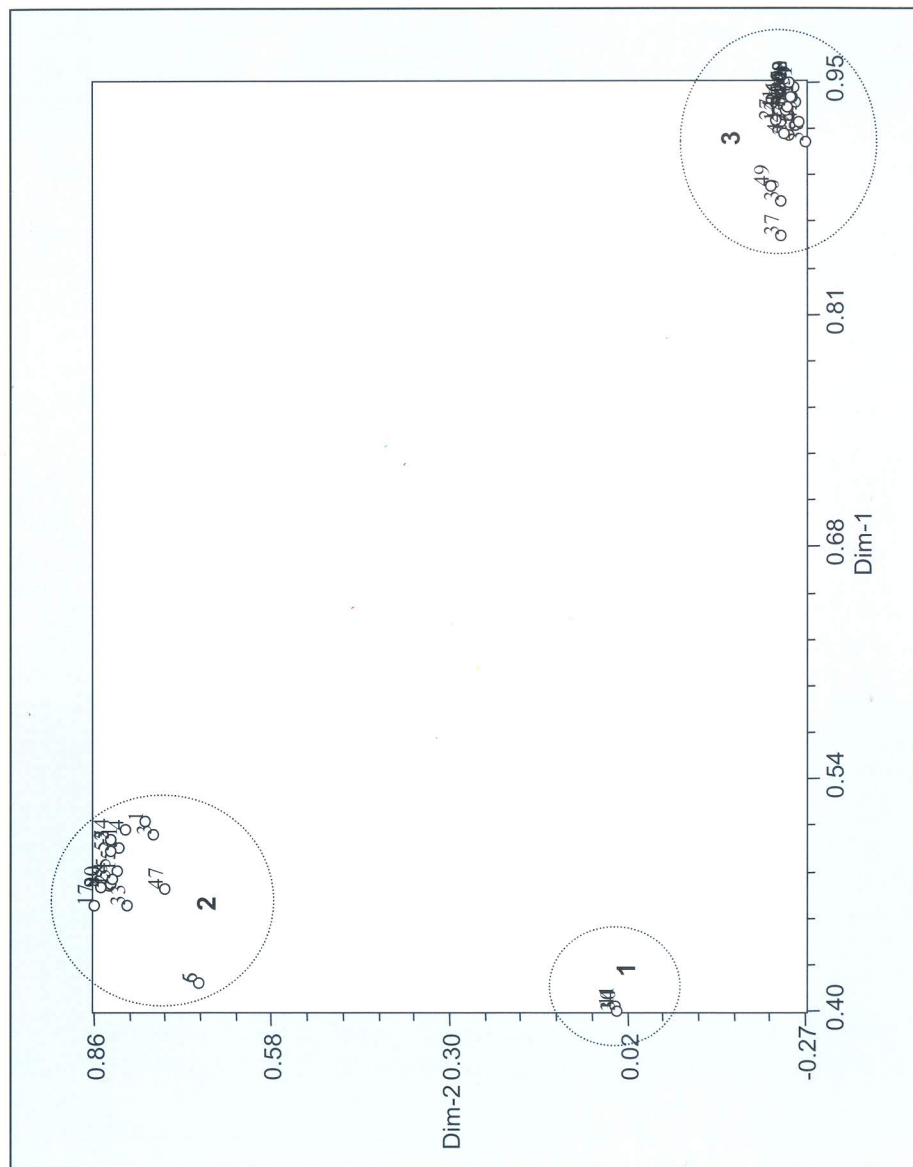


Figure 9. Gráfico bi-dimensional obtido por análise de coordenadas principais, utilizando dados de RAPD, referente a 55 isolados de *Macrophomina phaseolina*, mostrando a formação de três grupos.

Este trabalho mostrou que isolados geneticamente distintos podem infectar a mesma raiz de soja. O fato foi observado em amostras de MS e RS. Fragmentos de raízes das plantas P1 e P2, do Estado do Rio Grande do Sul, foram classificados em dois grupos distintos. A mesma análise pode ser feita com os isolados de Mato Grosso, obtidos da raiz da planta P5, os quais foram classificados em três diferentes grupos (A, B e C). Pelos resultados obtidos e considerando que apenas cinco plantas de cada local e 15 fragmentos de raízes foram analisadas, pode-se afirmar que o fato não é casual.

O dendrograma obtido foi suportado tanto pela análise de bootstrap quanto pela análise cofenética, com um coeficiente de 0,98, considerado valor adequado ao estudo.

Os resultados deste trabalho confirmam análise de 1997 (Almeida *et al*, 1997), mostrando diversidade genética entre isolados de *M. phaseolina*, no Brasil. A diversidade encontrada foi baixa, entre isolados, dentro de cada grupo. No entanto, a divergência entre os grupos foi alta, permitindo formar três grupos. A baixa diversidade genética é comum entre organismos que não possuem reprodução sexuada, como parece ocorrer com este patógeno. Entretanto, existe a probabilidade de parasexualismo, ou seja, fusão de células de diferentes hifas, contribuindo para a diversidade genética encontrada.

Os resultados confirmam que marcadores RAPD são adequados para avaliar diversidade genética da população de fungos, constituindo ferramenta auxiliar no estudo da biologia e ecologia de patógenos.

10. AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos a Nilson Valentin pela coleta e processamento de amostras; ao Dr. L. P. Ferreira pela revisão do manuscrito.

11. LITERATURA CITADA

ALMEIDA, A.M.R.; ABDELNOOR, R.V. Variabilidade genética de isolados de *Macrophomina phaseolina* (TASSI) Goid, coletados em diferentes regiões do Brasil.

In: ENCONTRO PARANAENSE DE BIOTECNOLOGIA APLICADA A AGROPECUARIA, 1., 1985, Londrina. **Palestras e resumos...** Londrina: Embrapa Soja / IAPAR / UEL, 1998. p.97

ALMEIDA, A .M.R., SARAIVA, O .F., FARIAS, J.R.B., GAUDÊNCIO, C. A., TORRES, E. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília,DF, v.36, n.10, p.1231-1238, 2001.

BERLATO, M. A., BERGAMASCHI, H. Water consumption by soybeans: I- Seasonal evapotranspiration in conditions of optimal water availability in soil. *In*: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 1., 1979, Londrina. **Anais...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1979. p.53-58

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

BRUTON, B.D., JEGER, M.J., REUVENI, R.M. *Macrophomina phaseolina* infection and vine decline in cantaloupe in relation to planting date, soil environment, and plant interaction. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, n.3, p.259-263, 1987.

CLOUD, G.L., RUPE, J.C. Morphological instability on a chlorate medium of isolates of *Macrophomina phaseolina* from soybean and sorghum. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.8, p.892-895, 1991.

COOK, G.E., BOOSALIS, M.G., DUNKLE, L.D., ODOVODY, G.N. Survival of *Macrophomina phaseolina* in corn and sorghum stalk residue. **Plant Disease Report**, v.57, p.873-875, 1973.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: UFV, 1978. 166p.

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

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

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. **Doenças da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1979. 42 p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular técnica, 1).

FIGUEIREDO, M.B.; TERANISHI, J.; CARDOSO, E.R.M.G. Incidência de *Macrophomina phaseolina* em feijoeiro e outras plantas cultivadas. **O Biológico**, São Paulo, v.35, p.105-109, 1969.

FREDERIKSEN, R. A. **Compendium of sorghum diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1986. 106p.

FUHLBOHM, M. Genotypic diversity among Australian isolates of *Macrophomina phaseolina*. *In*: BIENNIAL AUSTRALIAN PLANT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REUVENI, R.; KRIKUN, J.; NACHMIAS, A.; SHELVIN, E. The role of *Macrophomina phaseolina* in a collapse of melon plants in Israel. **Phytoparasitica**, v.10, p.51-56, 1982.

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

SATURNINO, H.M. O plantio direto como promotor da qualidade

ambiental e prosperidade na agricultura. *In*: AGUIAR, D.R.D.; PINHO, J.B. (Ed.). **O agronegócio brasileiro: desafios e perspectivas**. Brasília: SOBER, 1998. P. 105-115. Trabalho apresentado no XXXVI Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural.

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

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

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

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

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

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

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

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

VILICH, V. Crop rotation with pure stands and mixtures of barley and

wheat to control stem and root diseases. **Crop protection** , v.12, p.373-379, 1993.

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

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

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

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

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

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

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

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

YOUNG, D.J.; ALCORN, S.M. Latent infection of *Euphorbia lathyris* and weeds by *Macrophomina phaseolina* and propagule populations in Arizona field soil. **Plant Disease**, St. Paul, v.68, n.7, p.587-589, 1984.

ZAMBOLIM, L., SCHENCK, N.C., MITCHELL, D.J. Inoculum density, pathogenicity, and interactions of soybean root-infecting fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n.10, p.1398-1402, 1983.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa de Soja

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Caixa Postal, 231 - CEP: 86001-970 - Londrina - Paraná

Telefone: (43) 371 6000 - Fax: (43) 371 6100

<http://www.cnpso.embrapa.br> - E-mail: sac@cnpso.embrapa.br

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

The logo for the Government of Brazil, consisting of three vertical bars: a yellow bar on the left, a blue bar in the middle, and a yellow bar on the right. The words "GOVERNO" and "FEDERAL" are written in bold, blue, sans-serif capital letters across the blue bar.
**GOVERNO
FEDERAL**
Trabalhando em todo o Brasil