

ANA CLARA NOBRE SANCHES

**QUALIDADE DE SEMENTES DE PLANTAS DE SOJA INFECTADAS COM
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. EM ESTÁDIOS FENOLOGICOS
REPRODUTIVOS**

Botucatu

2020

ANA CLARA NOBRE SANCHES

**QUALIDADE DE SEMENTES DE PLANTAS DE SOJA INFECTADAS COM
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. EM ESTÁDIOS FENOLOGICOS
REPRODUTIVOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Zanin Kronka

Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Botucatu

2020

S211q

Sanches, Ana Clara Nobre

Qualidade de sementes de plantas de soja infectadas com
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. em estádios fenológicos
reprodutivos / Ana Clara Nobre Sanches. -- Botucatu, 2020
41 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientadora: Adriana Zanin Kronka

Coorientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

1. Macrophomina phaseolina. 2. Sementes Fisiologia. 3. Soja. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: QUALIDADE DE SEMENTES DE PLANTAS DE SOJA INFECTADAS
COM *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. EM ESTÁDIOS FENOLÓGICOS
REPRODUTIVOS

AUTORA: ANA CLARA NOBRE SANCHES

ORIENTADORA: ADRIANA ZANIN KRONKA

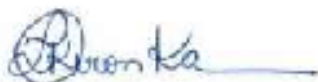
COORDINADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof.^a Dr.^a ADRIANA ZANIN KRONKA

Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP



p/

Prof.^a Dr.^a CRISTIANE DE PIERI

Prof.^a Substituta - Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu



p/

Prof.^a Dr.^a DANILA COMELIS BERTOLIN

Agronegócio / Faculdade de Tecnologia de São José do Rio Preto

Botucatu, 28 de agosto de 2020

Aos meus amados pais,

Tania e Antonio,

dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Tania Maria Nobre Sanches e Antonio Roberto Sanches, pelo apoio incondicional, amor e ensinamentos durante toda a minha vida. Serei eternamente grata.

À Profa. Dra. Adriana Zanin Kronka, pela orientação, oportunidade, ensinamentos, confiança e paciência durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pela coorientação, suporte e ensinamentos durante o projeto.

À Prof. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pelos ensinamentos e pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao meu irmão, Felipe Nobre Sanches, que sempre me motivou a ser melhor.

Aos meus queridos avós, pelo carinho, apoio, ensinamentos e sabedoria.

A minha tia, Neuza Aparecida Sanches Castrisana (*in memoriam*), por sempre acreditar em mim.

Ao meu namorado, Francisco de Sales de Souza Junior, pelo amor, compreensão, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos, Lizandra Jorgetto e Maurício Hideki, pelo companheirismo desde a graduação tornando os dias mais felizes nas atividades do dia a dia e apoio durante minha pesquisa.

À Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP de Botucatu, por todo o aprendizado adquirido durante a graduação e pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento (Processo nº 88887.204689/2018-00).

RESUMO

Macrophomina phaseolina infecta diversas espécies, entre elas a soja, produz microescleródios capazes de permanecer viáveis no solo por longos períodos, dificultando o controle desse patógeno após sua introdução na área. O fungo pode ser introduzido em novas áreas a partir de sementes obtidas de plantas infectadas, promovendo a inviabilização de sementes e de plântulas, ou originando novas plantas infectadas. Deste modo, a produção das sementes de soja deve atender aos padrões de sanidade para garantir a qualidade das sementes produzidas. Para evitar a disseminação da doença na lavoura destinada à produção de sementes, é imprescindível realizar o manejo adequado ao estágio da planta evitando perdas de qualidade das sementes. Diante do exposto, a pesquisa realizada teve o objetivo de avaliar o efeito da infecção de *M. phaseolina* em plantas de soja em estádios reprodutivos para mensurar o impacto do patógeno nos componentes de produção, qualidade fisiológica e sanitária das sementes produzidas. O experimento foi realizado em três cultivares de soja (BMX-Potência, BS 2606 IPRO, M5947 IPRO), em casa de vegetação, entre novembro de 2018 a março de 2019. As plantas foram inoculadas nos estádios R5, R6 e R7 com discos de BDA colonizados com micélio de *M. phaseolina* presos à haste. Constatada a infecção, ao atingir o estágio R9, as sementes foram colhidas manualmente e avaliadas em laboratório. A sanidade foi avaliada pelo método de papel filtro. Para avaliar a qualidade fisiológica foram realizados os testes de germinação, vigor (primeira contagem de germinação - PCG, T50, crescimento de raiz e parte aérea) e foi avaliado o teor de água. As cultivares responderam de maneira diferente ao período da inoculação. Para a cultivar BMX-Potência, a inoculação não interferiu na produtividade, germinação, PCG, T50 e comprimento na raiz. Para essa cultivar, verificou-se menor comprimento da parte aérea quando as plantas foram inoculadas no estágio R7. Para a cultivar BS 2606 IPRO, não houve interferência na germinação e PCG, sendo os piores resultados de T50 e comprimentos de raiz e parte aérea obtidos com a inoculação em R7, sem diferir de R6. A menor produção para esta cultivar foi observada com a inoculação em R6, sem diferir de R7. Na cultivar M5947 IPRO, a inoculação em R6 resultou em menor porcentagem de germinação, seguida de R7. A inoculação não interferiu na produção e no vigor (PCG e T50) dessa cultivar, mas resultou menor comprimento de planta com a inoculação em R7, sendo que os estádios de inoculação não diferiram entre si. Quanto à sanidade das sementes, a inoculação em R6 resultou em maior incidência de *M. phaseolina*, seguida de R7. Os resultados evidenciam que a infecção de *M. phaseolina* nos estádios R6 e R7 compromete, em maior dimensão, a qualidade das sementes de soja produzidas.

Palavras-chave: sanidade de sementes; germinação; vigor.

ABSTRACT

Macrophomina phaseolina infects many species, including soybean, and produces microesclerotia capable of remaining viable in soil for long periods, making it difficult to control this pathogen after its introduction in an area. The fungus can be introduced in new areas through seeds obtained from infected plants, promoting seeds and seedlings death, or originating new infected plants. This way, soybean seeds production must follow sanitary standards in the fields to assure seed sanitary quality. To avoid dissemination of the disease in the seed production fields, it is essential to manage it according to the plant stages avoiding seed quality losses. Therefore, this research aimed at evaluating the effect of *M. phaseolina* infection in soybean plants in reproductive stages to measure the impact of the pathogen on production components, as well as physiological and sanitary quality of the produced seeds. The experiment was performed with three soybean cultivars (BMX-Potência, BS 2606 IPRO, M5947 IPRO), in greenhouse, between November/2018 and March/2019. The plants were sowed in autoclaved soil and inoculated with PDA disk containing *M. phaseolina* mycelium, attached to the stem in R5, R6 and R7 stages. After the infection was confirmed, as it reached the R9 stage, the seeds were manually harvested and evaluated in the lab. The sanitary quality was evaluated with blotter test method. To evaluate physiological quality, germination, vigor (first count of germination - FCG, T50, root and stem growth) and water content tests were performed. The cultivars had different reaction to the inoculation. Regarding BMX-Potência, the inoculation did not interfere with productivity, germination, FCG, T50 and root growth. Smaller stem growth was verified when the plants were inoculated in R7. Concerning cultivar BS 2606 IPRO, there was no interference in germination nor FCG. The worst T50 and root and stem growth were observed in inoculation in R7, which did not differ from R6. The lowest yield to this cultivar was observed in R6, without differing from R7. In cultivar M5947 IPRO, the inoculation in R6 resulted in the lowest germination, followed by R7. The inoculation did not interfere with production and vigor (FCG and T50) of this cultivar, but resulted in smaller height in R7 inoculation, the inoculated stages did not differ. Regarding seed sanitary quality, inoculation in R6 resulted in higher incidence of *M. phaseolina*, followed by R7. The results highlight that *M. phaseolina* infection in stages R6 and R7 severely compromise the quality of soybean seeds produced.

Keywords: seed sanitary quality; germination; vigor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Cultura da soja	16
2.2 Podridão cinzenta da raiz	17
2.2.1 Importância econômica da doença	17
2.2.2 Taxonomia, etiologia e sintomatologia	18
2.2.3 Manejo de <i>M. phaseolina</i> na soja	20
2.3 Qualidade de sementes	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Local do experimento	22
3.2 Obtenção do isolado de <i>M. phaseolina</i> e método de inoculação	22
3.3 Produção de sementes de plantas de soja inoculadas com <i>M. phaseolina</i>	22
3.4 Avaliação das plantas e estimativa de produtividade	23
3.5 Avaliação da qualidade das sementes	24
3.5.1 Determinação do teor de água	24
3.5.2 Determinação da massa fresca e massa seca das sementes	24
3.5.3 Teste de sanidade	24
3.5.4 Teste de germinação	25
3.5.4.1 Primeira contagem de germinação (PCG)	25
3.5.4.2 Tempo médio para ocorrência de 50% de germinação (T50)	25
3.5.5 Comprimento e Massa Seca de Plântulas	26
3.6 Delineamento experimental e análise estatística	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das leguminosas de maior importância econômica mundial. Atualmente, o Brasil é o maior produtor desta “comoditie”, tendo superado os Estados Unidos na última safra (USDA, 2020). Os grãos de soja são bastante utilizados para a alimentação de animais e humanos, por serem fonte de proteínas. Um dos fatores limitantes na produção desta cultura é a presença de patógenos que reduzem a produtividade e a qualidade dos grãos e das sementes.

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, causador da podridão cinzenta da raiz, tem a capacidade de infectar muitas espécies vegetais de interesse econômico. Está presente em todas as áreas de soja do Brasil (ALMEIDA et al., 2003) e pode causar grandes perdas na produção. Outro fator importante é que este patógeno produz microescleródios, que podem permanecer viáveis no solo por longos períodos e são formas de sobrevivência do fungo. Na soja, este fungo representa risco à produção devido à falta de produtos para realizar controle eficiente, à falta de cultivares resistentes lançados no mercado, à ampla gama de hospedeiros e por poderem ser disseminados através de sementes.

O uso de sementes livres de patógenos é o controle preventivo mais indicado para evitar a introdução de doenças em novas áreas. No entanto, agricultores destinam parte da sua produção de grãos ao plantio de novas safras, aumentando o risco de disseminação do patógeno, criando novos ciclos de doença principalmente para soja. Portanto, a utilização da tecnologia de produção de sementes é fundamental para garantir sementes de boa qualidade.

M. phaseolina, quando presente na cultura, além de causar perdas de produção, também pode infectar as sementes, reduzindo a qualidade sanitária e fisiológica destas. Diante do exposto, a pesquisa realizada teve o objetivo de avaliar o efeito da infecção de *M. phaseolina* em plantas de soja em estádios reprodutivos para mensurar o impacto do patógeno nos componentes de produção, qualidade fisiológica e sanitária das sementes produzidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da soja

A soja [*G. max* (L.) Merrill] é uma planta arbustiva da família Fabacea, popularmente conhecida como leguminosa. É uma planta herbácea, autógama, anual, de crescimento morfológico determinado ou indeterminado, variando de 0,3 a 2,0 metros de altura, com ciclo entre 75 a 200 dias, dependendo das condições ambientais e cultivar (SEDIYAMA, 2013).

A China é o seu centro de origem genético, onde é cultivada desde 2838 a.C. No Brasil, começou a ser introduzida em 1882 pelo Professor Gustavo D'Utra, da Escola Agrícola da Bahia, mas somente a partir de 1940, seu cultivo começou a ser difundido pela região Sul, e a partir de 1970, pela região Central e Norte (KLAUS, 2005).

O Brasil ocupa o primeiro lugar entre os maiores produtores de soja no mundo, ficando à frente dos Estados Unidos. Na safra 2019/2020, o Brasil produziu 124 milhões de toneladas de soja, enquanto os Estados Unidos produziram 96,79 milhões de toneladas de soja (USDA, 2020). No Brasil, a área cultivada foi de 36 milhões de hectares e produtividade média, de 3,2 t/ha (CONAB, 2020).

Os grãos de soja são compostos de aproximadamente 40% de proteínas e 20% de óleo. É uma das fontes alimentares mais importantes no mundo, destinada principalmente para o consumo animal e para alimentação humana, com ampla utilização comercial e exploração na indústria de processamentos (SEDIYAMA, 2013).

Para identificar a fase de desenvolvimento da soja, Fehr e Caviness (1977) propuseram a divisão deste em estádios vegetativos, designados pela letra V, e estádios reprodutivos, designados pela letra R (Quadro 1). Os estádios têm início com a emergência da soja (VE). Com a abertura dos cotilédones, inicia-se o estágio VC, que se estende até que haja o surgimento da primeira folha trifoliada, identificando o estágio V1. A partir de então, a cada nova folha, vai se denominando o número do estágio vegetativo. O tempo para surgir uma nova folha entre VC e V5, demora cerca de cinco dias, após V5 demora três dias.

Os estádios reprodutivos iniciam com o florescimento da soja em R1. Em R2, é o florescimento pleno; R3 é o início da frutificação das vagens; R4 são formadas

as vagens; R5, início do enchimento do grão; R6, granação plena; R7, início da maturação; R8, maturação plena; e R9, 95% das vagens com cor amarela, que também marca o momento de colheita da soja.

Quando no campo, as plantas estão sujeitas ao ataque de pragas e doenças que reduzem a produtividade direta ou indiretamente. Segundo Koenning e Wrather (2010), as perdas foram de 13 milhões de toneladas de soja nos Estados Unidos, no ano de 2009, devido à presença de nematoides, doenças fúngicas e bacterianas.

2.2 Podridão cinzenta da raiz

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid é o patógeno causador da doença conhecida como podridão cinzenta da raiz, podridão preta das raízes, podridão de carvão, podridão negra da raiz ou murcha de clima seco. É um patógeno de soja que ocorre com bastante frequência em condições de clima seco podendo afetar cerca de 500 espécies de plantas, dentre elas amendoim, feijão comum, feijão caupi, milho, soja e sorgo (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012).

M. phaseolina foi detectado pela primeira vez no Brasil em 1935 infectando raízes de feijoeiro (BITANCOURT, 1935). Em 1979, ocorreu o primeiro relato de podridão cinzenta da raiz na cultura da soja no Brasil (FERREIRA et al., 1979). Atualmente, é comum verificar a doença em lavouras de soja em todo território nacional.

2.2.1 Importância econômica da doença

M. phaseolina foi relatado nas áreas de soja dos Estados Unidos e do Brasil, causando perda de 0,39% da produção e acima de US\$35 milhões em 16 estados norte-americanos (GANGOPADHYAY; WYLLIE; LUEDDERS, 1970; FRANCL et al., 1988; ALMEIDA et al., 2003; ALLEN et al., 2018). Na safra 1975/76, no Paraná, houve a redução de 50% da produção de soja das cultivares Viçoja e Santa Rosa (FERREIRA; LEHMAN; ALMEIDA, 1979). Já na Argentina, Brasil, Canadá, Paraguai e Estados Unidos, foram estimadas perdas de 1,23 milhões de toneladas de soja na safra de 1994 (WRATHER; KENDING, 1998).

As plantas infectadas pelo fungo exibem maturação desuniforme e em casos severos pode causar a morte de plantas. O agente causal ocorre frequentemente associado a outros fungos causadores de podridões radiculares na soja, dificultando

estudos específicos. As cultivares de soja suscetíveis ao patógeno apresentam tamanho de planta reduzido em relação às plantas normais (ISHIKAWA et al., 2018).

Em solos contaminados por *M. phaseolina*, as cultivares suscetíveis e as sementes infestadas causam redução de estande de germinação (WENDLAND et al., 2016).

As sementes infectadas é o principal meio de transmissão e disseminação deste patógeno (ALMEIDA et al., 2014; WENDLAND et al., 2016). Para reduzir a transmissão e a disseminação dos patógenos via sementes, é necessário utilizar sementes certificadas livres de patógenos ou com padrões de tolerância adequados. (GOULART, 1998). Porém, parte dos grãos produzidos é salva pelos agricultores para novo plantio, fato que pode proporcionar a disseminação de patógenos devido à falta de tecnologia de produção de sementes utilizada no cultivo da cultura, comprometendo não só a qualidade fisiológica como a qualidade sanitária da semente (SCHEEREN et al., 2010).

2.2.2 Taxonomia, etiologia e sintomatologia

O patógeno *M. phaseolina* é classificado no reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Botryosphaerales e família Botryosphaeriaceae. O fungo é polífago, cosmopolita, sendo observado em regiões tropicais e subtropicais (SINGH; NENE; REDDY, 1990).

O crescimento do fungo é favorecido por baixa umidade do solo associado a altas temperaturas, sendo disseminado por sementes infectadas (GOMES et al., 2008).

O fungo *M. phaseolina* possui micélio uninucleado, com micélio multinucleado na região de crescimento. Produz picnídios marrom-escuros isolados ou agregados com 100-200 µm de diâmetro (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970). A variação no tamanho dos picnídios está associada ao substrato no qual o fungo se desenvolve (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Porém, nem todos os isolados produzem picnídios, pois há casos em que apenas escleródios foram produzidos em meio de cultura (SUTTON, 1980). Os conídios são hialinos, elipsoides a ovóides, medindo 14-30 µm x 5-10 µm (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970).

As colônias do fungo se desenvolvem em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e em meios seletivos, compostos de arroz e ágar e 1,4-dichloro-2,5-

dimethoxybenzene (WATANABE, 1972; PAPAVIZAS; KLAG, 1975). O crescimento do micélio é rasteiro e rápido, aproximadamente 7 cm em 7 dias, e as colônias apresentam coloração branca nas primeiras 24 horas de crescimento, tornando-se negra com 60 horas, devido à alta concentração de microescleródios formados no meio. Os microescleródios são negros e lisos, com aproximadamente 100 µm de diâmetro (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970).

A colonização de tecidos de soja por *M. phaseolina* possui duas fases distintas, uma fase micelial (parasítica), e uma fase microesclerodial (não parasítica). O micélio do fungo foi considerado sensível à concentração de 0,5% de hipoclorito de sódio, sendo inviabilizado após 15 segundos em contato com a solução, todavia o mesmo não foi observado para microescleródios, capazes de manter viabilidade mesmo após 10 minutos na solução (SHORT; WYLLIE; AMMON, 1978).

Os microescleródios são a principal forma de sobrevivência de *M. phaseolina*. São estruturas de resistência que permitem a permanência do patógeno em condições adversas no solo por aproximadamente 157 dias (ALMEIDA et al., 2014; REIS et al., 2014). Além disso, o patógeno sobrevive por um longo período devido à sua ampla gama de hospedeiros, mantendo, aumentando e substituindo o inóculo no solo. Também pode sobreviver em sementes na forma de micélio ou microescleródios (KUNWAR et al., 1986; BEGUM; LOKESH; KUMAR, 2005).

Ao infectar as plantas, o fungo produz microescleródios a partir dos micélios. Estes microescleródios são constituídos por uma estrutura multicelular, com característica dura e resistente às condições adversas. Os microescleródios são encontrados sob a epiderme das raízes e no colo das plantas, e, com a decomposição dos tecidos, ficam livres no solo, infectando novas sementes e plantas (ALMEIDA et al., 2014).

Os sintomas variam de acordo com a idade da planta durante a infecção. Quando a infecção ocorre durante a emergência, observam-se lesões de cor marrom escura no colo, sendo os sintomas mais severos com baixa umidade do solo e altas temperaturas. As lesões podem ser confundidas com as causadas por outras podridões, no entanto, não são profundas e não causam estrangulamento do hipocótilo. As plantas que sobrevivem à infecção inicial apresentam sintomas de amarelecimento na época de formação de vagens. O amarelecimento progride levando ao sintoma de murcha, pois os ramos ficam caídos, e as folhas aderidas ficam secas e marrom escura. Essas plantas apresentam epiderme solta com

pontuações negras, que são os microescleródios (ALMEIDA et al., 2014). Em sementes, não há sintomas nem sinais aparentes da infecção, pois o micélio e microescleródio se desenvolvem dentro do tegumento (KUNWAR et al., 1986).

2.2.3 Manejo de *M. phaseolina* na soja

A podridão cinzenta da raiz apresenta grande dificuldade de controle e erradicação, principalmente por ser causada por um patógeno de solo. O manejo desta doença pode ser feito através do uso do controle cultural, do controle químico e do controle biológico. O controle principal da podridão cinzenta da raiz é o cultural, realizando-se o preparo de solo adequado, com tempo de pousio na área, devido à ampla gama de hospedeiros (PEREZ-BRÁDAN et al., 2012).

Ao se detectar a presença do fungo na área de cultivo, não é recomendado fazer rotação de culturas, mas o pousio, para estabilizar a densidade de inóculo (SHORT; WYLLIE; BRISTOW, 1980; SINGH; NENE; REDDY, 1990; ALMEIDA et al., 2008). Os microescleródios podem ser controlados através do preparo de solo, pois têm baixa habilidade de competição com outros microrganismos saprofíticos, sendo facilmente suprimido por antagonistas presentes no solo (SHORT; WYLLIE; BRISTOW, 1980; DHINGRA; SINCLAIR, 1978). A irrigação é ineficiente quando as condições ambientais são favoráveis ao patógeno, mas, em outros casos, é uma estratégia de manejo para prevenir o estresse hídrico, reduzir a temperatura do solo e promover a atividade microbiana do solo. Há outras práticas de controle cultural, como evitar alta densidade de plantas e a fertilização do solo, que são estratégias promissoras para minimizar os danos causados pelo patógeno (FRANCL et al., 1988).

Para o controle biológico da doença, pode ser utilizado o fungo *Trichoderma* spp. (JAVOID; AFZAL; SHOAIB, 2017; AGROFIT, 2018). O uso de variedades resistentes ainda não é utilizado no Brasil por falta de cultivares resistentes no mercado (ALMEIDA et al., 2014).

O controle químico da podridão cinzenta da raiz, nas décadas de 70 e 80, consistia nos métodos de fumigação do solo com produtos à base de brometo de metila, e aplicação de benomyl e captan (BARNARD; GILLY, 1986). Contudo, estes produtos foram proibidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Brasil. O uso de produtos com base na inibição do crescimento micelial

do fungo, como carbendazim e penflufen + trifloxystrobin (TONIN et al., 2013), é estudado para o controle da doença, mas não há produtos registrados para esta finalidade.

2.3 Qualidade de sementes

As sementes devem apresentar boa qualidade genética, física, fisiológica e sanitária, garantindo o melhor desempenho da soja. Existe um grande número de doenças que utilizam as sementes como meio de disseminação do patógeno, entre os quais podem ser mencionados: *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Phomopsis* spp., *Colletotrichum* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *M. phaseolina* (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Plantas e sementes infectadas com patógenos podem resultar na redução da germinação, vigor e sanidade das sementes. A redução pode ser direta, devido à presença de enzimas ou toxinas, afetando as sementes, ou indireta, impedindo o desenvolvimento normal das plantas e das sementes devido à redução do potencial fisiológico (MACHADO et al., 2001). As doenças fúngicas podem prejudicar a produção de sementes durante o desenvolvimento das plantas, maturação dos grãos, após a maturação e após a colheita (DORNBOS JR., 1995).

A ocorrência de doenças nos campos altera as propriedades físicas, como volume, peso e densidade de sementes, e as propriedades fisiológicas, como germinação e vigor, e a qualidade sanitária. Por isso, o controle de doenças fúngicas é recomendado a partir do estágio R1, para diminuir a incidência na cultura da soja (SEDIYAMA, 2013). No entanto, não há estudos até o momento que quantifiquem a perda da qualidade das sementes de acordo com o momento de infecção do patógeno nas plantas.

Diante do exposto, a pesquisa realizada teve como objetivo avaliar o efeito da infecção de *M. phaseolina* em plantas de soja em estádios reprodutivos para mensurar o impacto do patógeno nos componentes de produção, qualidade fisiológica e sanitária das sementes produzidas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

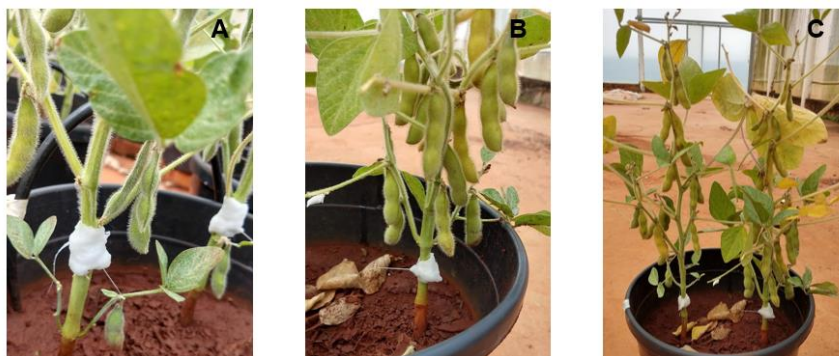
Os experimentos foram conduzidos em estufa e laboratório na Faculdade de Ciências Agrônômicas, Câmpus de Botucatu, SP, nos Departamentos de Proteção Vegetal (DProt), Produção Vegetal (DPV) e Ciência Florestal, Solos e Ambiental (DCFSA), durante os anos de 2018 e 2019.

3.2 Obtenção do isolado de *M. phaseolina* e método de inoculação

Os isolados do patógeno utilizados nos experimentos estão depositados na Micoteca "Mário Barreto Figueiredo", Instituto Biológico, São Paulo, SP, sob os números MMBF 11/18 (Botucatu, SP) e MMBF 12/18 (Maringá, PR). Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-água (BDA), a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ em fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Após esse período, discos de meio de cultura (5 mm de diâmetro) foram retirados da colônia fúngica e repicados para meio BDA.

A inoculação foi feita utilizando-se discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura com colônia fúngica, posicionando-se o micélio em contato com a planta fixado por um alfinete entomológico.

Figura 1 – Inoculação das plantas. A) Estádio R5 B) Estádio R6 C) Estádio R7



3.3 Produção de sementes de plantas de soja inoculadas com *M. phaseolina*

Foram utilizadas três cultivares de soja de crescimento determinado e ciclo semiprecoce, sendo elas BMX-Potência, BS 2606 IPRO e M 5947 IPRO. As sementes da cultivar BMX-Potência foram obtidas da Fazenda Experimental da

Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP de Botucatu e as sementes das cultivares BS 2606 IPRO e M 5947 IPRO foram adquiridas de revenda agrícola. As plantas foram inoculadas com *M. phaseolina* nos estádios fenológicos: R5 (início granação), R6 (granação plena) e R7 (início maturação fisiológica), segundo Fehr e Caviness (1977). Também foram conduzidas plantas sem a inoculação do patógeno como controle.

Antes da semeadura, foi realizada análise de solo e, de acordo com as recomendações para São Paulo (RAIJ et al., 1997), foi feita a adubação. As sementes foram tratadas com fungicida thiram, na dose 250 mL para 100 kg de sementes, inseticida tiametoxan, na dose 200 mL para 100 kg de sementes, e em seguida, inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na proporção de 100 mL do inoculante para 100 kg de sementes.

A semeadura foi realizada em 14 de novembro de 2018, em solo esterilizado por autoclavagem, contido em vasos de cinco litros, sendo distribuídas quatro sementes por vaso. Após formarem as primeiras folhas verdadeiras, foi realizado o desbaste, mantendo-se duas plantas por vaso, em casa de vegetação.

As inoculações foram realizadas aos 97, 104 e 110 dias após o plantio (DAP), quando se iniciaram os estádios reprodutivos R5, R6 e R7, respectivamente. A avaliação foi realizada 120 dias após a semeadura.

A irrigação foi realizada por sistema de gotejamento instalado em cada vaso. Durante a condução do experimento, não foram aplicados tratamentos fitossanitários, devido à ausência de insetos-pragas e doenças. As plantas foram conduzidas até a maturação plena. As vagens foram colhidas manualmente e debulhadas no estágio reprodutivo R9.

3.4 Avaliação das plantas e estimativa de produtividade

Após a colheita, foram avaliados: tamanho de planta, altura de inserção da primeira vagem, número de vagens por planta, número de sementes por planta, peso de cem sementes e produtividade da soja. A produtividade foi obtida a partir da pesagem de toda soja colhida por tratamento. Os dados foram convertidos de gramas para quilogramas por hectare e corrigido pelo teor de água 13%.

3.5 Avaliação da qualidade das sementes

Para avaliar o efeito da inoculação do patógeno nos diferentes estádios fenológicos da soja na qualidade das sementes, foram avaliados a sanidade e o potencial fisiológico, empregando-se os métodos descritos a seguir.

3.5.1 Determinação do teor de água

O teor de água das sementes foi determinado logo após a colheita pelo método de estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, seguindo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009a), composto por duas repetições de 20 sementes por tratamento. As sementes foram pesadas em balança de precisão (0,0001g) antes e após a secagem na estufa. Os valores obtidos foram calculados pela fórmula a seguir:

$$U\% = \frac{100 (P - p)}{P - t} \quad (1)$$

Onde $U\%$ é o teor de água, P é o peso das sementes úmidas e a lata, p é o peso das sementes secas e a lata e t é o peso da lata vazia.

Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.5.2 Determinação da massa fresca e massa seca das sementes

As sementes foram pesadas em balança de precisão para obtenção da massa fresca, utilizando duas repetições de 20 sementes por tratamento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Em seguida, as sementes foram colocadas em estufas de circulação de ar a 60°C até a estabilização da massa, sendo então pesadas para a obtenção da massa seca dessas sementes. O resultado, para as duas variáveis, foi expresso em gramas (g).

3.5.3 Teste de sanidade

A qualidade sanitária das sementes foi avaliada pelo *blotter test*, no qual as sementes foram distribuídas sobre três discos de papel filtro umedecidos com água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel, contidos em placas de Petri, e

incubadas em BOD, a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. A incidência do fungo foi avaliada em microscópio estereoscópico (BRASIL, 2009b). Foram distribuídas 10 sementes em 20 placas de Petri, totalizando 200 sementes por tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com o fungo.

3.5.4 Teste de germinação

A germinação foi avaliada pelo método rolo de papel, com quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes foram dispostas sobre duas folhas de papel do tipo germitest, umedecidas com água destilada em quantidade correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco, e cobertas por uma terceira folha. Os rolos foram mantidos dentro de sacos plásticos fechados e colocados no germinador regulado à temperatura de 25°C (BRASIL, 2009a). As leituras foram realizadas ao 5º e 8º dia sendo contadas ao 5º dia, apenas as plântulas normais e ao 8º dia, as plântulas normais, anormais e mortas. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.5.4.1 Primeira contagem de germinação (PCG)

A primeira contagem de germinação é considerada um teste de vigor, realizado junto ao teste de germinação. Ao 5º dia de duração do teste de germinação, foi realizada a contagem de plântulas normais em cada repetição (BRASIL, 2009a).

3.5.4.2 Tempo médio para ocorrência de 50% de germinação (T50)

O tempo médio para ocorrência de 50% de germinação é outro teste de vigor que foi realizado concomitantemente ao teste de germinação. As avaliações foram realizadas a cada doze horas, realizando-se a contagem do número de sementes com protrusão radicular com mais de 2 mm de comprimento. O T50 foi calculado através dos dados obtidos, usando-se o módulo de ajuste de curva do software Germinator (JOONSEN et al., 2010).

3.5.5 Comprimento e Massa Seca de Plântulas

Foi traçada uma linha no terço superior do papel germitest no sentido longitudinal. As folhas foram umedecidas com água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel. As sementes foram então dispostas sobre a linha marcada, de forma que a micrópila ficasse voltada para a parte inferior do papel. Os rolos foram colocados dentro de sacos plásticos transparentes e posicionados verticalmente dentro da BOD por sete dias a 25°C. Após os sete dias, foi medido o comprimento da raiz e do hipocótilo das plântulas normais com uma régua. Os resultados foram expressos em centímetros. Em seguida, as plântulas foram segmentadas em raiz e parte aérea com bisturi, colocadas dentro de saco de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação de ar a 60°C por 72 horas. Após a secagem, as sementes foram pesadas em balança de precisão (0,0001g), medindo-se a massa seca (NAKAGAWA, 1999). Os resultados, para as duas variáveis, foram expressos em gramas.

3.6 Delineamento experimental e análise estatística

Para a obtenção das sementes avaliadas, os experimentos foram realizados, de maneira independente para cada cultivar, no delineamento experimental inteiramente casualizado. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, em dez vasos, cada um contendo duas plantas, totalizando vinte plantas por tratamento. As sementes colhidas constituíram as amostras de trabalho e foram analisadas conforme mencionado anteriormente, sendo adotadas as repetições descritas em cada teste. Dados de sanidade foram transformados para $\arcsin\sqrt{(x/100)}$ para a análise estatística. Os resultados de todas as variáveis foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise dos componentes principais (ACP) foi utilizada para estudar a diversidade de patógenos encontrados nas sementes além da *M. phaseolina*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a inoculação, foi possível observar que as plantas inoculadas apresentavam sintomas típicos da podridão cinzenta da raiz, tais como pontuações negras na haste e murcha das plantas para as três cultivares estudadas e em todos os estágios que ocorreu a inoculação.

Os resultados dos componentes de produção estão expostos na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a altura de planta e o número de vagens, nas três cultivares, sugerindo que a infecção por *M. phaseolina* não altera essas características das plantas para esta forma de inoculação e nos estádios R5, R6, R7 e R8. Gomes (2014) relatou que plantas de feijão infectadas em diferentes estádios de desenvolvimento afetam os componentes de produção. A inserção da primeira vagem diferiu apenas para a cultivar M5947 IPRO, sendo inferior na inoculação no estágio R6, porém sem diferir da inoculação em R7, que por sua vez foi semelhante ao controle e a inoculação em R5. A altura de inserção de vagem é caracterizada principalmente pelo hábito de crescimento da planta (LAZARINI et al., 2000). Segundo Finoto et al. (2011), a altura de inserção da primeira vagem permite que a colheita mecanizada tenha o mínimo de perdas, sendo a altura mínima desejada de dez a 12 cm, portanto, quando infectadas com *M. phaseolina*, as cultivares estudadas não apresentaram diferença estatística que permita relacionar às perdas na colheita.

O número de sementes por planta e o peso de sementes variaram entre os tratamentos apenas para a cultivar BS 2606 IPRO, sendo inferiores quando a infecção ocorreu na inoculação no estágio R6, evidenciando que, para esta cultivar, a infecção neste estágio impacta a produtividade. Quanto à produtividade, também se verificou diferença significativa entre os tratamentos, apenas na cultivar BS 2606 IPRO, que apresentou menor produtividade quando houve infecção no estágio R6, sem diferir da produtividade obtida quando a infecção ocorreu na inoculação em R7. Segundo Khan et al. (2018), a infecção de *M. phaseolina* em genótipos suscetíveis de feijão moyashi reduziu o peso de sementes, resultado que se assemelha ao obtido nesta pesquisa com a cultivar BS 2606 IPRO.

Apesar de a altura da planta ser uma característica do material genético, variando entre as cultivares, quando há alta concentração de inóculo no solo, pode haver a redução do porte das plantas (CLAUDINO, 2013; ISHIKAWA, et al., 2019). A infecção de *M. phaseolina*, oriunda do inóculo presente no solo, causou a redução do porte das plantas da maioria das cultivares de soja testadas, incluindo BMX Potência, principalmente quando inoculadas com 10g/kg de inóculo no solo (ISHIKAWA, et al., 2019). Em mamona, quando em alta concentração de inóculo, foi observada a redução na altura das plantas inoculadas com *M. phaseolina* (CLAUDINO, 2013). No entanto, no presente estudo, as plantas foram inoculadas na haste e em baixa concentração de inóculo, não ocorrendo a redução no porte das cultivares testadas.

Tabela 1 – Componentes de produção de plantas de soja das cultivares BMX-Potência, BS 2606 IPRO e M5947 IPRO inoculadas com *M. phaseolina* em diferentes estádios fenológicos reprodutivos

Componentes de produção e produtividade						
Estádio de Infecção	Altura da planta (cm)	Inserção 1 ^a Vagem (cm)	Número de Vagens	Número de Sementes /Planta	Peso de 100 Sementes (g)	Produtividade (sacas/ha)
BMX-Potência						
Controle	43,93 a	10,10 a	24,90 a	48,45 a	5,07 a	11,87 a
R5	42,22 a	9,38 a	21,15 a	42,80 a	4,77 a	10,74 a
R6	41,95 a	9,68 a	21,90 a	44,10 a	5,01 a	12,52 a
R7	41,93 a	10,83 a	21,75 a	39,85 a	4,17 a	9,11 a
BS 2606 IPRO						
Controle	42,15 a	10,85 a	29,45 a	66,95 a	8,77 a	27,49 a
R5	43,53 a	10,78 a	26,30 a	56,90 a	7,82 a	20,80 a
R6	40,25 a	10,29 a	23,50 a	43,60 b	5,10 b	11,40 b
R7	44,13 a	10,00 a	28,15 a	56,40 a	7,45 a	19,64 ab
M5947 IPRO						
Controle	50,58 a	13,10 a	26,65 a	55,85 a	6,80 a	18,17 a
R5	49,00 a	12,40 a	26,20 a	58,50 a	7,99 a	22,64 a
R6	46,05 a	9,88 b	23,05 a	48,95 a	6,62 a	17,01 a
R7	49,03 a	11,63 ab	26,10 a	55,55 a	7,08 a	19,07 a

Para cada cultivar, médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O teor de água avaliado não diferiu significativamente na cultivar BMX-Potência. Já para a BS 2606 IPRO, o menor valor obtido foi para a inoculação no estágio R7 e nas sementes oriundas das plantas sem infecção, sem diferença significativa entre eles. A cultivar M5947 IPRO teve menor teor de água para os tratamentos inoculados em R6 e R7 (Tabela 2). Goulart (1997) observou que o teor de água presente nas sementes de soja, principalmente em regiões quentes e úmidas, deve ser abaixo de 13,5%, assim, evitando infestação de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Já Carvalho e Nakagawa (2012) mencionaram que os teores devem estar entre 12 e 14% evitando perdas de germinação. Deste modo, todas as cultivares e tratamentos atenderam os padrões fisiológicos e sanitários propostos.

Tabela 2 – Teor de água (gramas de H₂O/gramas de peso seco) e germinação (%) de sementes das cultivares de soja BMX-Potência, BS 2606 IPRO e M5947 IPRO provenientes de plantas inoculadas com *M. phaseolina* em diferentes estádios fenológicos reprodutivos

Estádio de Infecção	Germinação	Teor de Água
BMX-Potência		
Controle	92,50 a	12,73 a
R5	93,98 a	13,04 a
R6	94,50 a	12,53 a
R7	85,33 a	12,18 a
BS 2606 IPRO		
Controle	96,00 a	11,51 b
R5	98,00 a	12,33 a
R6	91,00 a	12,13 a
R7	91,01 a	11,49 b
M5947 IPRO		
Controle	98,50 a	12,51 a
R5	94,56 ab	12,80 a
R6	82,87 c	11,88 b
R7	91,44 b	11,58 b

Para cada cultivar, médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto à germinação das sementes, não houve diferença estatística entre os tratamentos para as cultivares BMX-Potência e BS 2606 IPRO. No entanto, na cultivar M5947 IPRO a inoculação das plantas no estágio R6 reduziu a germinação das sementes (Tabela 2). Em sementes de feijão, foi observada redução da qualidade fisiológica quando infectadas por *M. phaseolina* após a colheita das

sementes (NADALETO, 2004), o que está de acordo com o observado na germinação da cultivar M5947 IPRO. A germinação é correlacionada positivamente com o vigor das sementes e negativamente com a infestação de patógenos de sementes (HAMAWAKI et al., 2002). A presença de alguns patógenos de sementes de soja, como *C. kikuchii*, *Phomopsis lonciolla* e *Fusarium* spp., resultou em menores porcentagens de germinação em cultivares que apresentaram maior infecção do que em cultivares sem infecção (BRINGEL et al., 2001; HAMAWAKI et al., 2002; MENGISTU; HEARTHERLY, 2006; RAEISI et al., 2011).

O vigor das sementes teve resultados diferentes de acordo com cada variável avaliada. A primeira contagem de germinação (PCG) não diferiu entre os tratamentos para as três cultivares estudadas. A cultivar BMX-Potência teve menor comprimento de parte aérea na inoculação no estágio R7, sem diferir estatisticamente da inoculação em R5, e menor matéria de massa seca da raiz também na inoculação no estágio R7, sem diferir do controle e da inoculação no estágio R6 (Tabela 3). Para a cultivar BS 2606 IPRO, a variável T50, que corresponde ao menor tempo necessário para a germinação de 50% das sementes, foi inferior na inoculação no estágio R7, em relação à testemunha, ambos os tratamentos não diferindo dos resultados obtidos das inoculações em R5 e R6. Os comprimentos de raiz e de parte aérea das plantas inoculadas no estágio R7 foram inferiores àqueles de plantas inoculadas em R5, ambos sem diferir do obtido na testemunha e em R6. Quanto à massa seca de raiz, houve diferença significativa entre as inoculações nos estádios R5 (maior massa seca) e R7 (menor). Não houve diferença para a matéria seca da parte aérea entre os tratamentos. Para a cultivar M5947 IPRO, não houve diferença de PCG, T50 e MMS raiz entre os tratamentos. O menor comprimento de raiz foi observado com a inoculação em R7. Quanto ao comprimento da parte aérea, houve diferença apenas entre a testemunha e a inoculação em R7, ambos não diferindo dos demais tratamentos. Para a massa seca de parte aérea, o tratamento controle resultou em menor vigor e não houve diferença entre os demais tratamentos.

A incidência de *Aspergillus ochraceus* em sementes de soja resultou em redução do vigor, quanto à massa seca da parte aérea e raiz quando comparados ao controle (ROCHA et al., 2014). Diversos patógenos, ao infectarem a semente, contribuem para a redução da germinação e vigor (HENNING, 2005). Apesar de ter

diferença entre o vigor com a inoculação nos diferentes estádios, nas cultivares BMX-Potência e BS 2606 IPRO as plantas testemunhas e plantas infectadas não diferiram quanto a essas variáveis. Já os resultados da cultivar M5947 IPRO discordaram daqueles obtidos por Rocha et al. (2014), observando-se menor massa de matéria seca da parte aérea para a testemunha.

Tabela 3 – Vigor das sementes de soja das cultivares BMX-Potência, BS 2606 IPRO e M5947 IPRO provenientes de plantas inoculadas com *M. phaseolina* em diferentes estádios fenológicos reprodutivos

Estádio de Infecção	PCG (%)	T50 (h)	Comprimento Raiz (cm)	Comprimento Parte Aérea (cm)	MMS Raiz (g)	MMS Parte Aérea (g)
BMX-Potência						
Controle	89,00 a	35,89 a	10,06 a	12,81 a	0,05 ab	0,75 a
R5	84,00 a	37,80 a	6,48 a	10,16 ab	0,05 ab	0,81 a
R6	92,00 a	35,12 a	9,75 a	11,20 a	0,07 a	0,82 a
R7	76,50 a	35,20 a	7,02 a	7,40 b	0,03 b	0,74 a
BS 2606 IPRO						
Controle	95,50 a	41,77 a	8,91 ab	10,30 ab	0,04 bc	1,00 a
R5	95,50 a	37,94 ab	10,00 a	11,83 a	0,06 a	0,99 a
R6	89,50 a	40,18 ab	9,42 ab	10,10 ab	0,05 ab	0,94 a
R7	85,00 a	35,85 b	7,72 b	9,55 b	0,03 c	0,98 a
M5947 IPRO						
Controle	95,50 a	30,17 a	9,68 a	9,96 a	0,05 a	0,83 b
R5	89,50 a	32,48 a	8,43 a	8,09 ab	0,06 a	0,98 a
R6	72,50 a	32,18 a	8,42 a	9,28 ab	0,24 a	1,01 a
R7	88,00 a	32,23 a	4,41 b	6,98 b	0,06 a	1,03 a

PCG: primeira contagem de germinação; T50: tempo de germinação de 50% das sementes; MMS raiz: massa de matéria seca de raiz; MMS Parte Aérea: massa de matéria seca da parte aérea.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O teste de sanidade revelou a presença de *M. phaseolina* nas sementes oriundas de plantas infectadas com o patógeno (Tabela 4). Quanto aos tratamentos, a inoculação no estágio R6 resultou em maior incidência de *M. phaseolina* que os outros estádios, para a cultivar BS 2606 IPRO. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as outras cultivares. Além de *M. phaseolina*, foram detectados outros patógenos de sementes, como *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora kikuchii* e *Phomopsis* sp.. Apesar da inoculação das plantas com *M. phaseolina*, o fungo predominante em todos os tratamentos foi *Fusarium* sp., indicando uma alta infecção natural das sementes por este patógeno.

Devido à baixa incidência, os dados dos patógenos *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora kikuchii* e *Phomopsis* sp. não foram submetidos à análise estatística. Não houve diferença estatística na incidência de *Fusarium* sp. para as cultivares BMX-Potência e BS 2606 IPRO. A cultivar M5947 IPRO apresentou alta infestação de *Fusarium* sp. na inoculação no estágio R7, diferindo estatisticamente apenas do tratamento na inoculação no estágio R5. Segundo Ishikawa et al. (2019), a cultivar BMX-Potência apresentou infestação de 16 a 20% das sementes avaliadas, enquanto no presente estudo, a mesma cultivar apresentou incidência de 1% do patógeno ocorrendo diferença na porcentagem de infestação entre os dois estudos. As cultivares de soja, apresentaram comportamento diferente sob os mesmos tratamentos, sugerindo que os genótipos estudados têm níveis de resistência ao patógeno diferentes.

Tabela 4 – Incidência de *M. phaseolina* e *Fusarium* sp. em sementes de soja das cultivares BMX-Potência, BS 2606 IPRO e M5947 IPRO provenientes de plantas inoculadas em diferentes estádios fenológicos reprodutivos

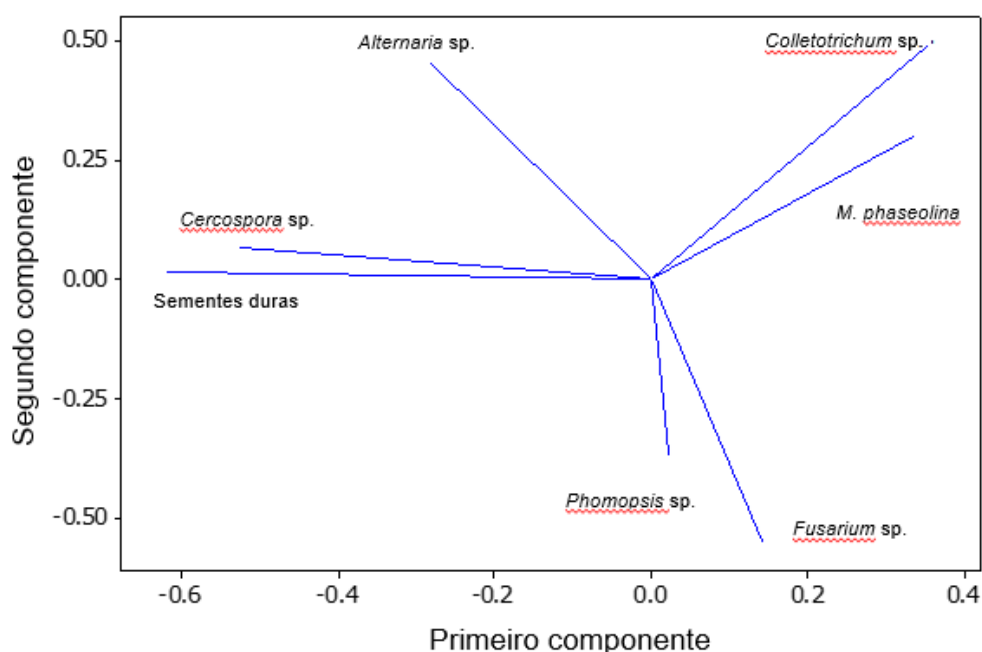
BMX-Potência				
Estádio de Infecção	<i>M. phaseolina</i>		<i>Fusarium</i> sp.	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹
Controle	1,84 a	1,00	71,42 a	83,00
R5	0,00 a	0,00	60,58 a	70,00
R6	1,84 a	1,00	64,33 a	74,00
R7	0,00 a	0,00	77,68 a	91,00
BS 2606 IPRO				
	<i>M. phaseolina</i>		<i>Fusarium</i> sp.	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹
Controle	0,00 b	0,00	76,65 a	91,00
R5	0,00 b	0,00	84,32 a	93,00
R6	6,34 a	4,00	64,99 a	75,00
R7	0,00 b	0,00	77,46 a	92,00
M5947 IPRO				
	<i>M. phaseolina</i>		<i>Fusarium</i> sp.	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹
Controle	0,00 a	0,00	68,89 ab	83,00
R5	1,84 a	1,00	59,46 b	72,00
R6	6,34 a	4,00	72,00 ab	82,00
R7	6,34 a	4,00	80,34 a	93,00

¹Dados originais

Para cada cultivar, médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Na Figura 2, é possível visualizar o padrão de relação dos principais componentes dos patógenos de sementes encontrados no teste de sanidade das sementes de soja inoculadas com *M. phaseolina* e a relação de sementes duras. Os patógenos *M. phaseolina* e *Colletotrichum* sp. tiveram padrão similar, dispostos no mesmo quadrante da figura, evidenciando comportamento similar, no entanto, estão em sentido oposto à *Cercospora* sp. em relação às sementes duras. Já os fungos *Phomopsis* sp. e *Fusarium* sp. obtiveram comportamento similar entre si e estão em sentido inverso à *Alternaria* sp., mostrando que possuem comportamento distinto. Portanto, podemos entender que *Fusarium* sp. não se comportou de forma oposta ao patógeno de estudo *M. phaseolina*. *Fusarium* sp., assim como *M. phaseolina*, causa danos ao sistema radicular com capacidade de sobreviver no solo por vários anos (SOUSA, 2016), inferindo que ambos podem infectar plantas ao mesmo tempo. Atualmente, não há trabalhos que relatam a interação entre os patógenos em sementes de soja.

Figura 2 – Análise de componentes principais (ACP) mostrando a relação entres os patógenos de sementes presentes nas sementes de soja em relação ao primeiro e segundo componentes



Durante a maturação, a semente adquire a capacidade de germinar (BLACKMAN et al., 1992). Portanto, neste período é necessário que as plantas tenham seu desenvolvimento sem estresses. A colonização de plantas de soja por

M. phaseolina teve desenvolvimento lento entre os estádios R5 e R6, obtendo rápido aumento das unidades formadoras de colônias (UFC) em R6 e pico no estágio R7, quando se iniciou a senescência das plantas e se encerrou o acúmulo de matéria seca. Ao atingir o estágio R8, a colonização se torna saprofítica, alcançando altos níveis de infecção para todas as cultivares estudadas (MENGISTU et al., 2011). O presente trabalho observou maior infestação de *M. phaseolina* com a inoculação de plantas de soja em estágio R6, porém, apenas para a cultivar BS 2606 IPRO, concordando parcialmente com os resultados obtidos por Mengistu et al (2011) e Smith, Ray e Mengistu (2018).

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nas condições em que os experimentos foram conduzidos, pode-se concluir que a inoculação de *M. phaseolina* em diferentes estádios reprodutivos interfere de maneira diversa sobre os componentes de produção e a qualidade fisiológica e sanitária das sementes, dependendo da cultivar estudada.

Para a cultivar BMX-Potência, a inoculação de *M. phaseolina* não interfere nos componentes de produção, na produtividade, na germinação e na sanidade das sementes. No entanto, a inoculação no estágio R7 reduz o vigor quanto ao comprimento de parte aérea e à matéria de massa seca de raiz.

Para a cultivar BS 2606 IPRO, a inoculação no estágio R6 acarreta em perdas no número de sementes por planta e peso de 100 sementes, refletindo em menor produtividade. Não há interferência na germinação das sementes. A inoculação em R7 interfere negativamente em T50, comprimento de raiz e parte aérea e matéria de massa seca de raiz. Há maior incidência de *M. phaseolina* nas sementes com a inoculação das plantas em R6.

Para a cultivar M5947 IPRO, a inoculação no estágio R6 reduz a altura de inserção da primeira vagem, sem interferência da inoculação nos demais componentes de produção e produtividade. A germinação das sementes das plantas inoculadas nos estádios R6 e R7 é prejudicada. Plantas inoculadas no estágio R7 têm redução nos comprimentos de raiz e parte aérea, sem haver interferência da inoculação nas demais variáveis indicativas de vigor. A inoculação de *M. phaseolina* nos estádios reprodutivos estudados não interfere na qualidade sanitária das sementes dessa cultivar.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 14/6/2020.
- ALLEN, T.W.; BISSONNETTE, K.; BRADLEY, C.A.; DAMICONE, J.P.; DUFAULT, N.S.; FASKE, T.R.; ISAKEIT, T.; KEMERAIT, R.C.; KOEHLER, A.; MEHL, H.L.; MUELLER, J.D.; PADGETT, G.B.; PRICE, P.P.; SIKORA, E.J.; THIESSEN, L.; YOUNG, H. Southern United States soybean disease loss estimates for 2017. **SSDW Proceedings**, p.3-9, 2017.
- 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**, São Paulo, v.28, n.3, p.279-285, 2003.
- ALMEIDA, A.M.R.; SOSA-GOMEZ, D.R.; BINNECK, E.; MARIM, 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**, Brasília, v.33, n. 4, p.257-264, 2008.
- 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 de 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.
- 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**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Londrina: Embrapa Soja, 55 p., 2014.
- BARNARD, E.L.; GILLY, S.P. Charcoal root rot of pines. **Plant Pathology**, n. 290, 1986.
- BEGUM, M.; LOKESH, S.; KUMAR, T. Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium verticilloides* in Okra. **Integrative Biosciences**. v.9, n.1, p. 37-40, 2005.
- BITANCOURT, A.A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, v. 1, n. 2, p. 41, 1935.
- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant physiology**, v. 100, n. 1, p. 225-230, 1992.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009a. 399 p.

BRASIL. **Manual de análise sanitária de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009b. 200 p.

BRINGEL, J.M.M.; MORAES, M.H.D.; MENTEN., J.O.M.; BEDENDO, I.P. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja produzidas na Região de Balsa, Maranhão. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.4, p. 438 – 441, 2001.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: Funep, 2012. 590 p.

CLAUDINO, M.R. **Métodos de inoculação de *Macrophomina phaseolina* em mamoneira visando à seleção de genótipos resistentes**. 2013. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Série histórica – Soja. 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?limitstart=0>>. Acesso em: 7/6/2020.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa, MG: Imprensa Universitária - Universidade Federal de Viçosa, 166p. 1978.

DORNBOS JR, D.L. Production environment and seed quality. In: BASRA, A.S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products Press, 1995. p.119-152.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and technology, 1977, 12 p.

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. **Doenças da soja no Brasil**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1979. 42 p.

FINOTO, E.L.; CARREGA, W.C.; SEDIYAMA, T.; ALBUQUERQUE, J.A.A.; CECON, P.R.; REIS, M.S. Efeito da aplicação de fungicida sobre caracteres agrônômicos e severidade das doenças de final de ciclo na cultura da soja. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 5, n. 1, p. 44-49, 2011.

FRANCL, L.J.; WYLLIE, T.D.; ROSENBROCK, S.M. Influence of crop rotation on population density of *Macrophomina phaseolina* in soil infested with *Heterodera glycines*. **Plant Disease**, v.72, p.760-764, 1988.

GANGOPADHYAY, S.; WYLLIE, T.D.; LUEDDERS, V.D. Charcoal rot disease of soybean transmitted by seeds. **Plant Disease**, v.54, p.1088-1091, 1970.

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

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

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: detecção e importância**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. 58p.

GOULART, A.C.P. Tratamento de sementes com fungicidas. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste. Algodão. **Infomações técnicas**. Dourados: EMBRAPA-CPAO: Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1998. p.71-84.

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

HAMAWAKI, O.T.; JULIATTI, F.C.; GOMES, G.M.; RODRIGUES, F.A.; SANTOS, V.L.M. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de genótipos de soja do ciclo precoce/ médio em Uberlândia, Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.2, p.201-205, 2002.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. 2.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52 p.

HOLLIDAY, P.; PUNITHALINGAM, E. *Macrophomina phaseolina*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**. v.275, p.1-2, 1970.

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.

ISHIKAWA, M.S.; RIBEIRO, N.R.; ALMEIDA, A.A.; BALBI-PEÑA, M.I. Identification of Soybean Genotypes Resistant to Charcoal Rot by Seed Inoculation With *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Agricultural Science**, v.11, n.7, 2019.

JAVOID, A.; AFZAL, L.; SHOAIB, A. Biological control of charcoal rot of mungbean by *Trichoderma harzianum* and shoot dry biomass of *Sisymbrium irio*. **Planta Daninha**, v.35, p.1-12, 2017.

JOOSEN, R.V.; KODDE, J.; WILLEMS, L.A.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L.H.; HILHORST, H.W. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. **The Plant Journal**, v.62, n.1, p.148-159, 2010.

KHAN, K.A.; SHOAIB, A.; AWAN, Z.A.; BASIT, A.; HUSSAIN, M. *Macrophomina phaseolina* alters the biochemical pathway in *Vigna radiata* chastened by Zn²⁺ and FYM to improve plant growth. **Journal of Plant Interactions**, v.13, n.1, p.131-140, 2018.

KLAUS, W. **Soja**: sua fantástica história. Porto Alegre: Imprensa Livre, 2005. 464 p.

KOENNING, S.R.; WRATHER, J.A. Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009. **Plant Health Progress**, v.10, 2010.

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

LAZARINI, E.; SÁ, M.E.; FERREIRA, R.C. Acúmulo de matéria seca em plantas de soja durante os estádios reprodutivos e qualidade fisiológica de sementes colhidas em diferentes fases do desenvolvimento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, p.153-162, 2000.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C.; ALVES, M.C Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.

MENGISTU, A.; HEATHERLY, L.G. Planting date, irrigation, maturity group, year, and environment effects on *Phomopsis longicolla*, seed germination, and seed health rating of soybean in the early soybean production system of the midsouthern USA. **Crop Protection**, v.25, p.310–317, 2006.

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, 2011.

NADALETO, C.E.S. **Efeito de *Macrophomina phaseolina* sobre a qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro**. 2004. 41f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, v.1, p.1-24, 1999.

PAPAVIZAS, G.C.; KLAG, N.G. Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. **Phytopathology**, v.65, p.182-187, 1975.

PEREZ-BRADÁN, C.; ARZENO, J.L.; HUIDOBRO, J.; GRÜMBERG, B.; CONFORTO, C.; HILTON, S.; BENDING, G.D.; MERILES, J.M.; VARGASGIL, 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.

RAEISI, S.; PUTEH, A.B.; SIJAM, K.B.; ABDULLAH, N.A.P. Seed Quality of Soybean in Relation to Phomopsis Seed Decay in Malaysia. **Asian Journal of Plant Pathology**, v.5, n.1, p.28-36, 2011.

RAIJ, B.V. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1997. p.29 (Boletim técnico, 100).

REIS, E.M.; SEGALIN, M.; MORAES, N. L.; GHISSI, V.C. *Macrophomina phaseolina*: density and longevity of microesclerotia in soybean root tissues and free on the soil, and competitive saprophytic ability. **Summa Phytopathol**, vol.40, n. 2, p. 128-133. 2014.

ROCHA, F.S.; CATÃO, H.C.R.M.; BRANDÃO, A.A.; GOMES, L.A.A. Danos causados por diferentes potenciais de inóculo de *Aspergillus ochraceus* no vigor de sementes de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.6, p.2895-2903, 2014.

SCHEEREN, B.R.; PESKE, S.T.; SCHUCH, L.O.B.; BARROS, A.C.S.A. Qualidade fisiológica e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.32, n.3, p.35-41, 2010.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção de sementes de soja**. Londrina: Mecenias, 2013.

SHORT, G.E.; WYLLIE, T.D.; AMMON, V.D. Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. **Phytopathology**, v.68, p.736-741, 1978.

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

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

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.

SOUSA, E. S. **Novos agentes etiológicos de doenças do feijão-fava no Brasil**. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em engenharia agrônoma) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

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

TONIN, R.F.B.; AVOZANI, A.; DANELLI, A.L.D.; REIS, E.M.; 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.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). World Agricultural Production. Foreign Agricultural Service. (Circular Service WAP 5-20). Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>> Acesso em: 7/6/2020.

WATANABE, T. Pycnidium formation by fifty different isolates of *Macrophomina phaseoli* originated from soil or kidney bean seed. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.38, n.2, p.106-110, 1972.

WENDLAND, A.; MOREIRA, A.S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN. J.S.; LOBO JUNIOR, M. Doenças do Feijoeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 5. ed. São Paulo: Ceres. v. 2, p. 383–390. 2016.