

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**FUNGICIDAS MICROBIOLÓGICOS E FOSFITO DE POTÁSSIO NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO CINZENTA DO CAULE E NA
FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* DE SOJA**

CATIRENE FERNANDES SILVA

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL**

2021

**FUNGICIDAS MICROBIOLÓGICOS E FOSFITO DE POTÁSSIO NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO CINZENTA DO CAULE E NA
FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* DE SOJA**

CATIRENE FERNANDES SILVA

Engenheira Agrônoma

Orientadora: PROF.^a DR.^a LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Dourados
Mato Grosso do Sul

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586f Silva, Catirene Fernandes

Fungicidas microbiológicos e fosfito de potássio na indução de resistência à podridão cinzenta do caule e na fluorescência da clorofila *a* de soja [recurso eletrônico] / Catirene Fernandes Silva. - 2022.

Arquivo em formato pdf.
39f.

Orientadora: Lilian Maria Arruda Bacchi.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. *Glycine max.* 2. *Macrophomina phaseolina.* 3. agentes de controle biológico. 4. *Trichoderma* spp.. 5. *Bacillus subtilis.* I. Bacchi, Lilian Maria Arruda. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**FUNGICIDAS MICROBIOLÓGICOS E FOSFITO DE POTÁSSIO NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO CINZENTA DO CAULE E NA
FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* DE SOJA**

por

Catirene Fernandes Silva

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovada em: 25 / 11 / 2021.

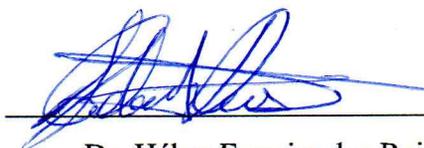


Prof.ª Dr.ª Lilian Maria Arruda Bacchi

Orientadora - FCA/UFGD



Prof. Ph.D. Walber Luiz Gavassoni
FCA/UFGD



Dr. Héber Ferreira dos Reis
Pesquisador AGRAER

DEDICO

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida
Aos meus pais Izade Fernandes Barbosa e Joana Corrêa da Silva
Ao meu noivo Jorge Ferreira Camargo Junior

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida por interceder, guiar e iluminar o meu caminho e mente.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade concedida de realizar essa pesquisa.

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

À minha orientadora Dr.^a Lilian Maria Arruda Bacchi, pela sua orientação, confiança, oportunidade e colaboração em todos os momentos de execução desse projeto.

Ao Prof. Ph.D. Walber Luiz Gavassoni pelo convite aceito, como membro da banca examinadora dessa Dissertação e, todas as orientações e sugestões realizadas.

Ao Dr. Cléberton Correia Santos por aceitar o convite de participar da banca de qualificação e contribuir com a redação da Dissertação.

Ao Engenheiro Agrônomo Paulo Fahber, da empresa Koppert por fornecer o fungicida microbiológico Trichodermil[®] SC 1306 (*Trichoderma harzianum*)

Ao Engenheiro Agrônomo Marco Aurélio, da empresa VITTIA por fornecer o fungicida microbiológico Tricho-Turbo[®] (*Trichoderma asperellum*)

Ao Engenheiro Agrônomo Me. Gilson do Mar, da empresa Talismã por fornecer adubos, corretivos, sementes de soja e inoculante para a execução desse projeto.

Ao Programa de Educação Tutorial (PET) Agronomia/UFGD que contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional, durante os anos de graduação, o qual tive a satisfação de fazer parte do grupo como membro bolsista.

Aos meus pais Izade Fernandes Barbosa e Joana Corrêa da Silva, pelo amor incondicional, confiança e palavras de alento.

Ao amigo Rodrigo Fidelis de Melo, que não mediu esforços para me ajudar com o meio de transporte à UFGD.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para que este projeto de pesquisa pudesse ser desenvolvido.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Podridão cinzenta do caule em soja – histórico e ocorrência.....	3
2.2. Epidemiologia e sintomatologia da podridão cinzenta do caule	4
2.3. Estratégias de controle de <i>Macrophomina phaseolina</i>	6
2.3.1. Resistência genética.....	6
2.3.2. Controle químico	6
2.3.3. Práticas agronômicas	7
2.3.4. Controle biológico	7
2.3.5. Elicitores de defesa de plantas	8
2.4. Efeitos de patógenos na fisiologia vegetal	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
Ensaio I	11
Ensaio II	13
3.1. Condições gerais dos experimentos	14
3.2. Isolamento e manutenção de isolado de <i>Macrophomina phaseolina</i>	16
3.3. Inoculação de <i>Macrophomina phaseolina</i> nas plantas de soja.....	16
3.4. Características avaliadas.....	18
3.5 Análise estatística.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20

4.1. FUNGICIDAS MICROBIOLÓGICOS E FOSFITO DE POTÁSSIO NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE SOJA À PODRIDÃO CINZENTA DO CAULE	20
4.2. EFEITO DA PODRIDÃO CINZENTA DO CAULE NA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DA SOJA SOB A APLICAÇÃO DE FUNGICIDAS MICROBIOLÓGICOS E FOSFITO DE POTÁSSIO	23
4.3. ASSOCIAÇÃO DE FUNGICIDAS MICROBIOLÓGICOS E FERTILIZANTE FOLIAR NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE SOJA À PODRIDÃO CINZENTA DO CAULE.....	29
4.4. EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DA SOJA, INOCULADA COM <i>Macrophomina phaseolina</i> E SOB A APLICAÇÃO ASSOCIADA DE FUNGICIDAS MICROBIOLÓGICOS E FERTILIZANTE COMERCIAL.	33
5 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
QUADRO 1. Cultivares de soja utilizadas no experimento e, suas respectivas características.....	12
QUADRO 2. Descrição dos estádios vegetativos da soja em que se realizou a aplicação dos produtos microbiológicos e fertilizante comercial em ambos os ensaios.....	13
QUADRO 3. Marcas comerciais dos fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial, ingredientes ativos, concentração, formulação, dose comercial e dose efetivamente utilizadas no primeiro ensaio.....	13
QUADRO 4. Misturas entre os produtos microbiológicos e o fertilizante comercial aplicados no segundo ensaio, em adição aos tratamentos do Quadro 3...14	
QUADRO 5. Resultado da análise química do solo antes da correção do solo.....	15
QUADRO 6. Adubação realizada por unidade experimental em ambos os ensaios.....	16
QUADRO 7. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), altura (cm) aos 20 e 50 dias após a inoculação (DAI) do fungo <i>Macrophomina phaseolina</i> e taxa de crescimento (cm.dia ⁻¹) das cultivares M 6210, M 6410, CZ 26B36 e TEC 7022. Dourados-MS, UFGD, 2021.....	20
QUADRO 8. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), altura (cm) das plantas de soja aos 20 e 50 dias após a inoculação (DAI) do fungo <i>Macrophomina phaseolina</i> e taxa de crescimento (cm.dia ⁻¹) sob a influência de diferentes fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial. Dourados-MS, UFGD, 2021.....	21

- QUADRO 9.** Eficiência quântica potencial fotoquímica no fotossistema II (F_v/F_m) das cultivares de soja M 6210, M 6410, CZ 26B36 e TEC 7022 aos 40 dias após a inoculação (DAI) do fungo *Macrophomina phaseolina*, sob a influência de diferentes fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial. Dourados-MS, UFGD, 2021.....24
- QUADRO 10.** Eficiência de conversão de energia absorvida (F_v/F_0) das cultivares M 6210, M 6410, CZ 26B36 e TEC 7022 aos 40 dias após a inoculação (DAI) do fungo *Macrophomina phaseolina*, sob a influência de diferentes fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial. Dourados-MS, UFGD, 2021.....26
- QUADRO 11.** Índice de clorofila (SPAD) das cultivares M 6210, M 6410, CZ 26B36 e TEC 7022 aos 10 dias após a inoculação (DAI) do fungo *Macrophomina phaseolina*, sob a influência de diferentes fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial. Dourados-MS, UFGD, 2021.....27
- QUADRO 12.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), altura (cm) aos 20 dias após a inoculação (DAI) do fungo *Macrophomina phaseolina* e taxa de crescimento (cm.dia^{-1}) das cultivares M 6410 e TEC 7022. Dourados-MS, UFGD, 2021.....29
- QUADRO 13.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), altura (cm) das plantas de soja aos 20 dias após a inoculação (DAI) do fungo *Macrophomina phaseolina* e taxa de crescimento (cm.dia^{-1}) sob a influência de diferentes fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial e suas combinações. Dourados-MS, UFGD, 2021.....30
- QUADRO 14.** Altura (cm) das cultivares M 6410 e TEC 7022 aos 50 dias após a inoculação (DAI) do fungo *Macrophomina phaseolina*, sob a influência de diferentes fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial e suas combinações. Dourados-MS, UFGD, 2021.....31

QUADRO 15. Eficiência quântica potencial fotoquímica no fotossistema II (F_v/F_m) das cultivares de soja M 6410 e TEC 7022 aos 40 dias após a inoculação (DAI) do fungo *Macrophomina phaseolina*, sob a influência de diferentes fungicidas microbiológicos, fertilizante comercial e suas associações. Dourados-MS, UFGD, 2021.....35

QUADRO 16. Eficiência de conversão de energia absorvida (F_v/F_0) das cultivares de soja M 6410 e TEC 7022 aos 40 dias após a inoculação (DAI) do fungo *Macrophomina phaseolina*, sob a influência de diferentes fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial e suas associações. Dourados-MS, UFGD, 2021.....37

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1. Casa de Vegetação (A); Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia (FCA/UFGD) (B). Dourados-MS, UFGD, 2020.....	11
FIGURA 2. Solo peneirado (A); solo acondicionados em sacos plásticos para serem esterilizados (B); autoclave - vista interna (C); vista externa (D). Dourados-MS, UFGD, 2020.....	14
FIGURA 3. Discos de micélio do patógeno <i>M. phaseolina</i> transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA, em câmara de fluxo laminar (A); discos de micélio de 3 mm (B). Dourados-MS, UFGD, 2021.....	16
FIGURA 4. Discos de micélio do patógeno <i>M. phaseolina</i> transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA, em câmara de fluxo laminar para infestação dos palitos para posterior inoculação nas cultivares de soja. Dourados-MS, UFGD, 2021.....	17
FIGURA 5. Base das plantas e ponto de inserção do palito de madeira com <i>M. phaseolina</i> nas diferentes cultivares de soja. Dourados-MS, UFGD, 2021.....	18
FIGURA 6. Fluorômetro portátil de clorofila (OS-30p; <i>Opti-Sciences Chlorophyll Fluorometer</i> , Hudson, NY, USA) – Papel alumínio envolto por 20 minutos no terceiro trifólio, para posterior avaliação (A); leitura do equipamento dos parâmetros avaliados (B). Dourados-MS, UFGD, 2021.....	19
FIGURA 7. Sintomas de planta de soja (testemunha) inoculada com o patógeno <i>M. phaseolina</i> (A); Sinais de microescleródios do fungo fitopatogênico (B). Dourados-MS, UFGD, 2021.....	22

- FIGURA 8.** Eficiência quântica potencial fotoquímica no fotossistema II (F_v/F_m) das cultivares de soja CZ26 B36 (A) e, TEC7022 (B) tratadas com FosTec 40 20 e/ou apenas inoculada com fungo *Macrophomina phaseolina*. Dourados-MS, UFGD, 2021.....23
- FIGURA 9.** Eficiência de conversão de energia absorvida (F_v/F_0) das cultivares de soja M 6410 tratada com FosTec 40 20 (A); CZ 26B36 (B) e TEC 7022 (C), somente inoculadas com fungo *Macrophomina phaseolina*. Dourados-MS, UFGD, 2021.....25
- FIGURA 10.** Eficiência quântica potencial fotoquímica no fotossistema II (F_v/F_m) da cultivar de soja M 6410 tratadas com Trichodermil[®] SC 1306 + Tricho-Turbo[®] e Trichodermil[®] SC 1306 + FosTec 4020 (A); cultivar TEC 7022 tratada com Trichodermil[®] SC 1306 + Serenade[®], Tricho-Turbo[®] + FosTec 40 20 e apenas inoculada com fungo *Macrophomina phaseolina* (B). Dourados-MS, UFGD, 2021.....33
- FIGURA 11.** Eficiência de conversão de energia absorvida (F_v/F_0) da cultivar de soja M6410 (A) tratada com FosTec 40 20, Trichodermil[®] SC 1306 + FosTec 40 20 e cultivar TEC 7022 (B), com aplicação de Tricho-Turbo[®] + FosTec 40 20 apenas inoculadas com fungo *Macrophomina phaseolina*. Dourados-MS, UFGD, 2021. Dourados-MS, UFGD, 2021.....36

FUNGICIDAS MICROBIOLÓGICOS E FOSFITO DE POTÁSSIO NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO CINZENTA DO CAULE E NA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* DE SOJA

RESUMO: A podridão cinzenta do caule pode reduzir significativamente o rendimento da soja e outras culturas, principalmente em condições ambientais de baixa umidade e altas temperaturas. Devido à diversidade de hospedeiros desse patógeno, à dificuldade de controle da doença e a possibilidade da utilização de agentes de controle biológico ser promissora para a soja, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de fungicidas microbiológico e suas misturas na eficiência fotoquímica e controle de *M. phaseolina* em plantas de soja. Foram conduzidos dois ensaios independentes, em casa de vegetação e no laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia, da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados-MS. Ensaio I: Realizaram-se 24 tratamentos em fatorial 4 x 6 (cultivares de soja x tratamentos controle da doença) com 4 repetições. Foram utilizadas duas testemunhas, sendo uma sem inoculação e sem tratamento e, outra inoculada com o patógeno e sem a realização de tratamento. As cultivares utilizadas foram M 6210, M 6410, CZ 26B36 e TEC 7022. Os produtos microbiológicos comerciais utilizados foram Trichodermil® SC 1306 (*Trichoderma harzianum*), Tricho-Turbo® (*Trichoderma asperellum*) e Serenade® (*Bacillus subtilis*). O fertilizante comercial, composto por fosfito de potássio, foi o FosTec 40 20®. A inoculação do patógeno se deu por meio do método do palito. Ensaio II: composto por 24 tratamentos, em fatorial 2 x 12 (cultivares x tratamentos controle da doença) com 4 repetições. As cultivares utilizadas foram M 6410 e TEC 7022. Os tratamentos consistiram os mesmos produtos microbiológicos e o fertilizante comercial, utilizados no Ensaio I, adicionando-se os tratamentos de misturas/combinções entre esses produtos. Não foi detectado o controle da podridão cinzenta da soja com a utilização dos fungicidas microbiológicos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum*, *B. subtilis* e do fertilizante foliar de fosfito de potássio. A inoculação do patógeno provocou um decréscimo na eficiência quântica potencial fotoquímica no fotossistema II (F_v/F_m) e na eficiência de conversão de energia absorvida (F_v/F_0) em plantas não tratadas.

PALAVRES-CHAVE: *Glycine max*, *Macrophomina phaseolina*, agentes de controle biológico, *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis*.

**MICROBIOLOGICAL FUNGICIDES AND POTASSIUM PHOSPHITE IN THE
INDUCTION OF RESISTANCE TO GRAY STEM ROT AND IN THE
FLUORESCENCE OF CHLOROPHYLL *a* SOYBEAN**

ABSTRACT: Gray stem rot can significantly reduce the yield of soybeans and other crops, particularly in low-humidity, high-temperature environmental conditions. Due to the diversity of hosts of this pathogen, the difficulty of controlling the disease, and the possibility of using biological control agents to be promising for soybean, the objective of this work was to evaluate the effect of microbiological fungicides and their mixtures on the photochemical efficiency and control of *M. phaseolina* in soybean plants. In a greenhouse and the Laboratory of Agricultural Microbiology and Phytopathology, two independent assays were carried out at the Federal University of Grande Dourados, in Dourados-MS. Assay I: 24 treatments were carried out in 4 x 6 factorial (soybean cultivars x disease control treatments) with 4 replications. Two controls were used, one without inoculation and treatment and the other inoculated with the pathogen and without treatment. The cultivars used were M 6210, M 6410, CZ 26B36, and TEC 7022. The commercial microbiological products used were Trichodermil[®] SC 1306 (*Trichoderma harzianum*), Tricho-Turbo[®] (*Trichoderma asperellum*) and Serenade[®] (*Bacillus subtilis*). The commercial fertilizer, composed of potassium phosphite, was FosTec 40 20[®]. The inoculation of the pathogen was carried out using the toothpick method. Assay II comprises 24 treatments in 2 x 12 factorial (cultivars x disease control treatments) with 4 replications. The cultivars used were M 6410 and TEC 7022. The treatments consisted of the same microbiological products and the commercial fertilizer used in Assay I, adding the treatments of mixtures/combinations between these products. Control of soybean gray rot was not detected with the use of microbiological fungicides based on *T. harzianum*, *T. asperellum*, *B. subtilis*, and potassium phosphite foliar fertilizer. The inoculation of the pathogen caused a decrease in photochemical potential quantum efficiency in photosystem II (F_v/F_m) and the efficiency of absorbed energy conversion (F_v/F_0) in untreated plants.

KEYWORDS: *Glycine max*, *Macrophomina phaseolina*, biological control agents, *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis*.

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill, Fabaceae] é uma oleaginosa com origem do noroeste da China. Ao final do século XVIII foi inserida ao continente americano (CUNHA et al., 2015), local em que se adaptou devido às condições ambientais, respondendo favoravelmente a produção. Atualmente, Brasil, E.U.A. e Argentina representam cerca de 86,83% da produção mundial da cultura (364,07 milhões de toneladas). A China é a quarta produtora mundial e maior consumidor mundial da oleaginosa (CONAB, 2021).

Na safra de soja 2020/2021, foram cultivados 38,50 milhões de hectares, com produtividade média de 3.529 kg.ha⁻¹, com produção de 135,9 milhões de toneladas. O Brasil foi o maior exportador da cultura do mundo, com 74,7 milhões de toneladas (CONAB, 2021). Entre os fatores limitantes ao aumento da produtividade da cultura estão as doenças. A podridão cinzenta do caule, doença causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., é uma delas, e frequentemente presente nas raízes (ALMEIDA, 2001).

A podridão cinzenta do caule é apontada como uma das mais importantes doenças causadas por fungo na cultura da soja, podendo acarretar perdas de até 50% de rendimento da cultura, sob as condições de estresse hídrico e temperatura, conforme estimativa realizada na safra 2009/2010 no Estado do Paraná (REIS et al., 2014).

Esse patógeno possui uma ampla gama de espécies hospedeiras e abrangência em diversas regiões geográficas. Estudos conduzidos por Jana et. al. (2003) sobre a caracterização molecular de isolados da *M. phaseolina*, oriundas da América do Norte, Índia e outras regiões, demonstram que a variabilidade genética dos isolados é condizente ao local de origem e à especificidade do hospedeiro.

Em razão da diversidade de hospedeiros de *M. phaseolina*, o controle desse patógeno se torna difícil por meio da rotação de culturas (ALMEIDA et al., 2008). No tocante, ao controle químico, para a cultura da soja, não há fungicidas registrados no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que constam no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT, 2021).

Diante da diversidade de hospedeiros da *M. phaseolina*, aliada a dificuldade de controle químico e cultural, a utilização de agentes de controle biológico (BCAs) é uma forma alternativa de controle deste fitopatógeno. Em estudos *in vitro*, a utilização de três isolados de *Trichoderma harzianum* inibiu o crescimento do patógeno, através de hiperparasitismo, com lise celular posterior as interações com os micélios de *T. harzianum* T12. (KHALILI et al., 2016).

Hashem et al. (2017), realizaram estudos através da aplicação de *Bacillus* spp. de forma isolada e em associação para controle de *M. phaseolina*, em feijão mung, e as plantas apresentaram menor crescimento e indução de doenças, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica, no entanto, a aplicação de *Bacillus subtilis* em plantas doentes propiciou o aumento de atividades de clorofila, ácidos ascórbicos, superóxido dismutase, catalase, peroxidase e inibiu H₂O₂ e peroxidação lipídica. Além disso, a associação de *B. subtilis* nas plantas mitigou a infecção do patógeno.

Considerando a ausência da utilização de fungicidas contra a *Macrophomina phaseolina*, experiências científicas com meios alternativos e promissores para o controle do patógeno tem sido fomentadas. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de fungicidas microbiológicos e suas misturas na eficiência fotoquímica e controle de *M. phaseolina* em plantas de soja.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Podridão cinzenta do caule em soja – histórico e ocorrência

Ferreira et. al., (1978) foram os primeiros autores a realizarem o levantamento que apontou a doença causada por *Macrophomina phaseolina* como responsável por expressivas perdas em lavouras de soja no Brasil, constatando que na Região Norte do Paraná, em anos secos e quentes, ocorreram perdas de até 50% em cultivares tardias de soja.

Wrater et al. (1997), ao realizarem estimativas de perdas por doenças para os 10 principais países produtores de soja em 1994, constataram que o ataque de *Macrophomina phaseolina* na cultura da soja, causou perdas estimadas em 1,23 milhões de toneladas de grãos nos Estados Unidos, Canadá, Paraguai, Argentina e Brasil, esse último apresentou um prejuízo avaliado em 0,93 milhões de toneladas. Entre os anos de 2010 e 2014, a *M. phaseolina* acarretou estimativas de perdas para a soja em 5,9 milhões de toneladas, nos E.U.A. e Ontário, no Canadá (ALLEN et al., 2017).

Consequentemente, a podridão cinzenta do caule é uma doença que apresenta grande importância econômica em países da América do Norte, América do Sul, África, Ásia e parte do continente Europeu (JANA et al., 2003).

Os primeiros levantamentos desse patógeno foram realizados, em Missouri nos E.U.A., em 1963 (FRANCIL et al., 1988). No México, a doença ocorre em distintas regiões de clima árido e tropical, onde se pode observar a cultura do feijoeiro com sintomas de infecção de *Macrophomina phaseolina*. (MAYÉK-PÉREZ et al., 2001). Na Venezuela, foi possível observar a infestação de microescleródios na cultura do gergelim (MARTÍNEZ-HILDERS e LAURENTIN, 2012).

No continente Asiático, Watanabe (1972) recuperou 28 isolados de *M. phaseolina*, das regiões de Negano, Nishigara, Hachijo e Okinawa, no Japão. Por sua vez, Meyer et al. (1973), ao coletar isolados do fungo na Índia, constataram a alta capacidade de sobrevivência desse patógeno em distintas condições ambientais, pelo fato de ter observado a ampla ocorrência de *M. phaseolina* em diferentes culturas hospedeiras, tipo de solo e regime hídrico proveniente das regiões da Índia.

Em estudos realizados por Allen et al., (2017), demonstrou estimativas de perdas de rendimento de soja devido a doenças nos E.UA. e Ontário, no Canadá entre os anos de 2010 e 2014, nematoide de cisto da soja (*Heterodora glycines*) - (16.803.294 t) tombamentos (*Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* e/ou *Phomopsis* spp.) – (6.580.719 t), síndrome da morte súbita (*Fusarium virguliforme*) – (5.707.276 t), podridão do caule (*Phytophthora sojae*) - (4.558.435 t) e podridão do carvão (*Macrophomina phaseolina*) – (5.976.769 t), sendo que esta, estavam quase sempre entre as cinco doenças principais que causavam maiores perdas de rendimento da cultura.

No Brasil, safra 2009/2010, a severidade da doença causada por *M. phaseolina*, em plantas de soja próximas ao início do estágio de maturação, em propriedades da região Sul do país, em condições de estresse hídrico e altas temperaturas, acarretaram perdas de até 50% de rendimento na cultura no Estado do Paraná (REIS et al., 2014).

2.2. Epidemiologia e sintomatologia da podridão cinzenta do caule

O patógeno pertence ao filo Ascomycota, classe dos Ascomycetes, família Botryosphaeriaceae (MYCOBANK, 2013), caracterizada por hifas hialinas com parede fina e marrom claro ou marrom escuro com septos (MARQUEZ et al., 2021). Existe uma enorme heterogeneidade morfológica que pode ser resultado de respostas do fungo às condições ambientais e espécies hospedeiras (PANDEY et al., 2020).

Macrophomina phaseolina é um fungo polífago, infectando inúmeras espécies vegetais, com abrangência para 500 espécies inseridas em 100 distintas famílias (DHINGRA e SINCLAIR, 1978; GHOSH et al., 2018). A infecção pode se dar, em culturas anuais e perenes de interesse econômico, como também em plantas daninhas.

O fungo pode infectar as seguintes culturas de importância econômica: leguminosas como a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), o feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.)), o amendoim (*Arachis hipogea* (L.)); gramíneas como o milho (*Zea mays* (L.)), o trigo (*Triticum aestivum* (L.)), o sorgo (*Sorghum bicholor* (L.) Moench.), e demais culturas como o girassol (*Helianthus annuus* (L.)) e o algodão (*Gossypium hirsutum* (L.)) (ALMEIDA et al., 2003).

Espécies de plantas daninhas, como caruru (*Amaranthus viridis*), picão preto (*Bidens pilosa*), balãozinho/chumbinho (*Cardiospermum halicacabum*), leiteiro

(*Euphorbia heterophylla*), Corda de viola (*Ipomoea* sp.), poaia (*Richardia brasiliensis*) são espécies assintomáticas que abrigam *M. phaseolina* (REIS et al., 2014).

Recentemente, duas novas espécies de *Macrophomina* foram relatadas no Brasil. *Macrophomina pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*, nas culturas do algodão (*Gossypium hirsutum*), amendoim (*Arachis hipogaeae* L.) e mamona (*Ricinus communis* L) (MACHADO, et al., 2018). Anteriormente, ambas espécies haviam sido relatadas no Senegal (SARR et al., 2014).

Em plantas infectadas por *Macrophomina phaseolina* é possível observar lesões negras e deprimidas essencialmente em hastes e raízes, as quais podem evoluir para murcha, desfolha e perda em produtividade, tombamento e morte precoce (SINGH et al., 1990).

Na cultura da soja, em fase de plântula, a infecção se dá por meio do contato das raízes secundárias com os microescleródios presentes no solo. Por conseguinte, o patógeno penetra a rizoderme e a colonização se estende até a raiz principal, e a manifestação secundária da doença se dá em estágio reprodutivo. Com o desenvolvimento da doença, ocorre o amarelecimento, a murcha, e queda dos folíolos, como consequência, há maturação desuniforme, enchimento imperfeito de grãos e morte da cultura (SINGH et al., 1990).

Em tecidos vegetais infectados, verifica-se a formação de microescleródios, que compõem a fonte de inóculo primário. Essas estruturas podem ser observadas interna e externamente. Esse processo também pode acontecer em tecidos mortos do hospedeiro até que este fique completamente seco. Isso posto, os microescleródios são disseminados ao solo, dando início a um novo ciclo do patógeno (SHORT et al., 1980).

Também são caracterizados como fonte de inóculo, os solos naturalmente infestados, onde o aumento da podridão do caule está associado à alta densidade de microescleródios, o inverso também é plausível (SINGH et al., 1990). No entanto, Wraeter et al. (1998), ao realizarem estudos para determinar se sistemas de plantio direto, disco e arado de aiveca afetariam a incidência e a severidade de *M. phaseolina*, observaram nos sistemas, maior densidade populacional do patógeno em camadas de 0 a 7,5 cm em relação as camadas de 7,5 a 15 cm, mas, não houve correlação significativa entre a produtividade da soja e a densidade de *M. phaseolina*.

Por sua vez, a disseminação desse patógeno pode ocorrer via sementes infestadas (KUNWAR et al., 1986; SINGH et al., 1990), através da movimentação do

solo naturalmente infestado pelo tráfego de máquinas e implementos agrícolas e pelo fluxo de água das enxurradas (BIANCHI et al., 2005).

A doença causada por este patógeno é resultado da interação planta hospedeira e com grande influência nas condições ambientais. Danos mais severos são causados, principalmente, sob altas temperaturas (30 – 35 °C) e baixa umidade do solo (MARQUEZ et al., 2021).

2.3. Estratégias de controle de *Macrophomina phaseolina*

2.3.1. Resistência genética

Até o presente momento, não existe um gene R que confere resistência a esse patógeno que inibe ou impede a infecção, observa-se apenas uma resistência parcial que apenas minimiza os danos e, conseqüentemente as adequações da planta (MARQUEZ et al., 2021).

Em uma pesquisa realizada por Reznikov et al. (2018), sobre a diversidade genética e patogênica de uma coleção de sete isolados de *M. phaseolina*, oriundos da Argentina e Paraguai, e a fenotipagem *in vitro* para avaliar quatro genótipos de soja, os resultados demonstram que uma determinada cultivar de soja (Munaska RR) apresentou resposta superior quando comparada com a cultivar DT 97-4290 (moderadamente resistente), demonstrando assim, a existência de interações específicas entre os isolados do patógeno e os genótipos de soja.

2.3.2. Controle químico

Em um estudo conduzido por Tonin et al. (2013), sobre a sensibilidade micelial *in vitro* de *M. phaseolina* para fungicidas sistêmicos e não sistêmicos (carbendazim, metalaxil, fluquinconazol, iprodione, penflufen + trifloxistrobina, piraclostrobina, tiram, tolifluanida) em seis concentrações do ingrediente ativo, demonstraram que carbendazim foi o mais eficiente para o controle do patógeno. O isolado de *M. phaseolina*, ainda demonstrou insensibilidade aos ingredientes ativos fluquinconazol, metalaxil, tiram e tolifluanida.

É importante salientar, que existem poucos fungicidas para o controle de *M. phaseolina*. No Brasil, apenas a cultura do feijão possui três registros de defensivos no MAPA, cujos ingredientes ativos perfazem carboxina + tiram, fludioxonil e difenoconazol. Por sua vez, quatro defensivos microbiológicos constam no banco de

dados do AGROFIT, para todas as culturas com ocorrência do alvo *Macrophomina phaseolina*. Constituem os ingredientes ativos desses produtos, os agentes de controle biológico *T. harzianum* cepa T-22, *T. harzianum* Isolado IBLF 006 e *Trichoderma afroharzianum* cepa ThRI99.

2.3.3. Práticas agronômicas

Existem certas práticas agrícolas com a finalidade de minimizar a densidade de inóculo presente na área, pois, encontra-se uma relação entre a densidade do inóculo de *M. phaseolina* no solo e a intensidade da doença e rendimento e perdas (MARQUEZ et al., 2021).

Esse manejo cultural, com a biosolarização (biofumigação e solarização), vem se mostrando eficiente na redução ou na estabilização da população do patógeno no solo, com redução da incidência da doença, para a produção do morango (CHAMORRO et al., 2015). Pode se destacar ainda que, a irrigação, com alta umidade do solo (níveis superiores de 60%), pode reduzir a gravidade da doença (KENDIG et al., 2000; JORDAAN et al., 2019).

Em estudo realizado por Francl et al. (1988), a prática da rotação de culturas não se mostrou eficiente para o controle do fungo *M. phaseolina*, embora tenha reduzido as densidades de inóculo do patógeno na cultura da soja, quando não cultivada conforme essa prática agronômica.

2.3.4. Controle biológico

Nas últimas décadas, os agentes de controle biológico (BCAs) têm recebido atenção especial, por impactarem os fungos fitopatogênicos de forma direta e indireta, inibindo o crescimento do patógeno ou até mesmo provocando vias de defesa da planta hospedeira (MARQUEZ et al., 2021).

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) produzem alterações nas plantas hospedeiras, com redução da incidência de várias pragas e doenças. Em estudo realizado por Doley e Jiti (2013), sobre a eficácia do FMA *Glomus fasciculatum* inoculado na raiz do amendoim para controle de biológico de *M. phaseolina*. Como resultado, ocorreu a colonização desses fungos micorrízicos e, uma menor infecção do patógeno nas raízes e redução na gravidade dos sintomas, apresentando aumento dos

mecanismos de resposta de defesa, como o aumento total de fenol e prolina e atividade da superoxidase, com inoculação de plantas com *M. phaseolina*.

Para Bastakoti et al. (2017) e Hyder et al. (2017), os fungos *Trichoderma* spp. são BCAs eficazes para muitos fungos fitopatogênicos, incluindo a *M. phaseolina*. Esses agentes de controle apresentam antagonismo, como competição por nutrientes, produção de antibióticos e micoparasitismo.

Gajera et al. (2012) observaram a inibição do crescimento de *M. phaseolina*, antagonismo correlacionado o supercrescimento de *Trichoderma* spp. e degradação do micélio do patógeno. Foi observada ainda, a produção e quitinase, β -1, 3 glucanase, enzimas que atuam na parede celular do fitopatógeno, e compostos fenólicos, por algumas espécies de *Trichoderma* spp.

As bactérias também têm sido amplamente estudadas quanto aos seus efeitos antagônicos para o controle de *M. phaseolina*. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas *Bacillus amyloquefaciens* e *Bacillus siamensis* demonstraram atividades antifúngicas por meio da excreção de compostos da classe dos lipopeptídeos-surfactina para a inibição de crescimento de *M. phaseolina*, em teste de placa ou filtrado de culturas. Por sua vez, *Bacillus subtilis* não gerou efeito tóxico, mas efeito fungistático, possivelmente pela competição por espaço e/ou nutrientes (TORRES et al., 2016).

2.3.5. Elicitores de defesa de plantas

As plantas possuem um sistema de defesa que retarda e impede a penetração de fitopatógenos (fungos, bactérias, vírus, nematoides, insetos), que pode ser induzida, em função do ataque de patógenos ou ao início de estresse abióticos (estresse hídrico, variações de temperatura). Dessa maneira, o resultado de sucessivos sinais faz com que a planta ative barreiras físicas e químicas frente aos ataques do patógeno. Como respostas, as plantas produzem uma resposta de hipersensibilidade (HR), resistência sistêmica adquirida (SAR), indução de proteínas relacionadas à patogênese (RR-Proteínas), ácido salicílico e peróxido de hidrogênio. (FERNANDES, et al., 2009).

Diante do exposto, em função da HR, ocorre a indução da produção de RR-Proteínas, com destaque as peroxidases (POX), quitinases e β -1,3-glucanases, produção de fenilalanina amônia liase (PAL) (VERBENE et al., 2000).

A resposta das plantas pode ocorrer pelo acúmulo de fitoalexinas que têm ação protetora contra-ataques de fungos fitopatógenos. Os mecanismos de resistência são genéticos e sua efetividade depende da expressão dos genes de defesa presentes nas plantas que atuam em defesa contra os patógenos que causam doenças (FRANZENER et al., 2018).

A indução de resistência ocorre durante todos os estágios de desenvolvimento da planta, o que afeta o desenvolvimento de diversos fungos, biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos devido à ação de diferentes mecanismos de resistência (CASTROAGUDÍN et al., 2015).

Os mecanismos de resistência, em potencial, do hospedeiro, são ativados em resposta a um tratamento com produtos bióticos ou abióticos, microrganismos viáveis ou inativados (FEITOSA et al., 2016).

Alguns compostos naturais ou sintéticos, quando aplicados nas plantas induzem resistência sistêmica adquirida (SAR) e impedem a infecção por fungos, bactérias e vírus (MARQUEZ et al., 2021). Com a finalidade de controlar os patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora sojae* e *Sclerotinia sclerotiorum*, realizou-se a aplicação em folhas de soja, de elicitores benzotiadiazol, quitosana, ácido salicílico e fenilalanina. A eficácia variou em conformidade com os patógenos, os elicitores, os genótipos de soja e as condições ambientais. Plantas de variedade suscetível a *Macrophomina phaseolina* apresentaram menor tamanho de lesão provocada pela doença quando tratadas com ácido salicílico. (PAWLOWSKI et al., 2016).

Em estudos realizados por Pereira et al. (2010), sobre o efeito de doses de duas formulações de fosfitos de potássio contra o fungo *Plasmopora viticola* comparados com fertilizante foliar e fungicidas, constatou-se que a aplicação com fosfitos, a partir das brotações, em intervalos semanais, com 12 aplicações no total, propiciou maior proteção nas folhas e nos cachos. Dessa forma, a aplicação de fosfito de potássio é um método alternativo a utilização de fungicidas para o controle do míldio da videira, além de propiciar a cultura da uva, aumento do teor de sólidos solúveis total e do pH e não reduzir o teor de antocianinas.

Em estudo realizado por Camochena et al. (2020) sobre a utilização de fosfito de potássio para o controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) na cultura da soja, aplicado em diferentes estádios fenológicos da cultura, resultou que todos os

fosfitos avaliados, aumentaram a atividade da síntese da PAL e da POX com maior controle efetivo da doença em campo.

2.4. Efeitos de patógenos na fisiologia vegetal

No que diz respeito ao processo de infecção e colonização do tecido vegetal por patógenos, ocorre interferência nas condições metabólicas e fisiológicas das plantas, envolvendo a fotossíntese, respiração, transpiração e translocação de água e nutrientes. Diante dessa perspectiva, a análise da fluorescência da clorofila “a” pode constatar efeitos de estresse e injúrias decorrentes de fatores bióticos e abióticos. (YUSUF et al., 2010; BAKER e ROSENQVIST, 2004).

Dentre os inúmeros parâmetros de fluorescência da clorofila “a” que podem ser mensurados, o máximo rendimento quântico fotoquímico do FSII (F_v/F_m) tem sido utilizado para comparar tecidos vegetais saudáveis daqueles afetados por fatores bióticos (ROUSSEAU et al., 2013).

Para Klughammer e Schreiber, (2008), os valores desse parâmetro que estiverem entre 0,80 a 0,65, apresentam folhas saudáveis, diferentemente daquelas que apresentam valores inferiores, os quais conferem os centros de reação do FSII danificados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois ensaios independentes, em casa de vegetação e no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia (Figura 1), da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de outubro de 2020 a abril de 2021.



FIGURA 1. Casa de Vegetação (A); Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia – (FCA/UFGD) (B). Dourados-MS, UFGD, 2020. Fonte: Da autora.

Ensaio I

Realizaram-se 24 tratamentos em fatorial 4 x 6 (cultivares de soja x tratamentos de controle da doença) com 4 repetições. Foram utilizadas duas testemunhas, sendo uma sem inoculação e sem tratamento, e inoculada com o patógeno e sem tratamento.

As cultivares utilizadas foram M 6210, M 6410, CZ 26B36 e TEC 7022, (Quadro 1), associadas a três tratamentos microbiológicos, um abiótico (fertilizante) e dois tratamentos testemunha. As sementes da cultivar M 6210 receberam tratamento *on farm* de Standak[®] Top (fipronil + piraclostrobina + tiofanato-metílico), as demais cultivares foram tratadas com 300 mL por 100 kg de sementes com o produto Derosal Plus[®] (carbendazim e tiram) e, no dia da semeadura, inoculadas com 100 mL para 50 kg de sementes com *Bradyrhizobium japonicum*.

QUADRO 1. Cultivares de soja utilizadas no experimento e suas respectivas características.

Características agrônômicas	M 6210 IPRO	M 6410 IPRO	CZ 26B36 IPRO	TEC 7022 IPRO
Hábito de crescimento	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado
Grupo de maturação	6.2	6.4	6.3	7.0
Cor da flor	Roxa	Roxa	Roxa	Branca
Cor da pubescência	Cinza	Cinza	Cinza	Cinza
Cor do hilo	Preto imperfeito	Preto imperfeito	Preto imperfeito	Marrom-claro
Altura média da planta	96 cm	86 cm	-	-
Fertilidade do solo	Alta	Média/Alta	-	-
Época de semeadura	Setembro- Novembro	Setembro- Novembro	Setembro- Novembro	Setembro-Novembro
Regiões indicadas	PR-SP-MS	PR-SP-MS	Centro-Norte PR, Grande Dourados, Centro-Norte	Norte PR / Sul SP, Fronteira, Grande Dourados, Centro- Norte do Brasil
Reação a <i>M. phaseolina</i>	Sem informação	Sem informação	Sem informação	Sem informação

Os tratamentos de controle da doença consistiram de três produtos microbiológicos, um fertilizante foliar formulado com fosfito, além de duas testemunhas. Para a classe de produtos microbiológicos foram utilizados os produtos comerciais Trichodermil[®] SC 1306 (*Trichoderma harzianum*), Tricho-Turbo[®] (*Trichoderma asperellum*) e Serenade[®] (*Bacillus subtilis*). O fertilizante comercial é composto por FosTec 40 20 (fosfito de potássio). A pulverização foi realizada no estágio fenológico V2-V3 (Quadro 2), conforme recomendação técnica da época de aplicação dos produtos, pois, a pulverização foliar quando iniciada a partir do estágio V2 da cultura, possibilita que os produtos atinjam o caule e o solo.

No que se refere as doses estabelecidas, essas foram aplicadas em função da média da dose recomendada de cada produto comercial para fungos de solo (Quadro 3).

QUADRO 2. Descrição dos estádios vegetativos da soja em que se realizou a aplicação dos produtos microbiológicos e fertilizante comercial em ambos os ensaios.

Estádio	Denominação	Descrição
V2	Segundo nó	Primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida
V3	Terceiro nó	Segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida

- Nó cotiledonar não é considerado.

- Uma folha é considerada completamente desenvolvida, quando os bordos dos trifólios da folha seguinte não se tocam mais.

QUADRO 3. Marcas comerciais dos fungicidas microbiológicos e fertilizante comercial, ingredientes ativos, concentração, formulação, dose comercial e dose efetivamente utilizadas no primeiro ensaio.

Produto comercial	Ingrediente ativo (i. a.)	Concentração i. a.	Formulação	Dose comercial (L.ha ⁻¹)	Dose (L.ha ⁻¹)
Trichodermil® SC 1306	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai, cepa ESALQ-1306	48 g.L	SC	0,50 – 1,00	0,75
	<i>Trichoderma asperellum</i> BV10	200 g.L	EC	0,10 – 0,40	0,25
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i> linhagem QST 713	13,68 g.L	SC	2,00 – 4,00	3,00
FosTec 40 20	Fosfito de potássio	P ₂ O ₅ :40% K ₂ O: 20%	-	0,50 – 1,00	0,75

SC: Suspensão Concentrada; EC: Concentrado Emulsionável.

Ensaio II

O segundo ensaio foi composto por 24 tratamentos, cujo fatorial é expresso por 2 x 12 (cultivares de soja x tratamentos controle da doença) com 4 repetições. As cultivares utilizadas foram M 6410 e TEC 7022. Os tratamentos decorreram dos mesmos produtos microbiológicos e fertilizante comercial, adotados no ensaio I (Quadro 3), acrescentados os tratamentos de misturas/combinções entre esses produtos (Quadro 4).

QUADRO 4. Misturas entre os produtos microbiológicos e o fertilizante comercial aplicados no segundo ensaio, em adição aos tratamentos do Quadro 3.

Misturas	Doses (L.ha ⁻¹)	Total dose (L.ha ⁻¹)
Trichodermil [®] SC 1306 + Tricho-Turbo [®]	0,75 + 0,25	1,00
Trichodermil [®] SC 1306 + Serenade [®]	0,75 + 3,00	3,75
Trichodermil [®] SC 1306 + FosTec 40 20	0,75 + 0,75	1,50
Tricho-Turbo [®] + Serenade [®]	0,25 + 3,00	3,25
Tricho-Turbo [®] + FosTec 40 20	0,25 + 0,75	1,00
Serenade [®] + FosTec 40 20	3,0 + 0,75	3,75

3.1. Condições gerais dos experimentos

Para a instalação de ambos os experimentos, o solo e a areia utilizados foram peneirados, acondicionados em sacos plásticos autoclaváveis e, esterilizados a 120 °C/1atm/1 hora, separadamente (Figura 2).



FIGURA 2. Solo peneirado (A); solo acondicionado em sacos plásticos para ser esterilizado (B); autoclave - vista interna (C); vista externa (D). Dourados-MS, UFGD, 2020. Fonte: Da autora.

Após o solo ser autoclavado, foi obtido o resultado da análise química do solo (Quadro 5), realizada no Laboratório Agro Tec Solo Análises Agronômicas e Consultoria e, feito o cálculo da necessidade de correção e adubação do Latossolo Vermelho Distroférrico, de textura argilosa (SANTOS, et al., 2018).

QUADRO 5. Resultado da análise química do solo antes da correção do solo.

pH		P			Complexo Sortivo (cmol./dm ³)						
CaCl	SMP	MO g/dm ³	Mehlich mg/dm ³	Rem. Mg/L	K	Ca	Mg	Al	H + Al	Soma de Bases (SB)	CTC pH 7,0
4,69	6,21	9,79	5,57	-	0,10	2,91	0,85	0,3	4,44	3,86	8,30
mg/dm ³					Saturações (%)						
Enxofre S	Boro B	Ferro Fe	Cobre Cu	Manganês Mn	Zinco Zn	Bases V%	Al M%	Ca	Mg	K	
7,65	0,25	41,60	2,40	16,50	1,45	46,5	6,3	35,1	10,2	1,2	

Por meio da interpretação do laudo da análise de solo, foi realizada a correção do solo para a cultura da soja, em que: V2 = 70% (saturação por bases desejada), onde a necessidade de calagem resultou em 2,16 toneladas por ha⁻¹, utilizando-se de calcário dolomítico, com PRNT de 90% com período de reatividade de 35 dias.

Posterior a esse período, realizou-se a mistura do solo e da areia anteriormente autoclavados, e substrato comercial não autoclavado, para compor as unidades experimentais dispostas em vasos de 5,0 L (v1:1:1), sendo posteriormente representadas por seis plantas cultivadas.

A adubação foi realizada, considerando as doses de 60 kg ha⁻¹ de N; 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 50 kg ha⁻¹ de K₂O. Foram utilizados sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), fosfato monoamônico (MAP) e cloreto de potássio (KCl), todos aplicados e, incorporados manualmente ao solo (Quadro 6), um dia antes da semeadura das cultivares soja nos vasos.

QUADRO 6. Adubação realizada por unidade experimental em ambos os ensaios.

Adubação	kg.ha ⁻¹	g.kg ⁻¹ de solo
(NH ₄) ₂ SO ₄	236,55	0,099
MAP	115,00	0,048
KCl	83,35	0,035

3.2. Isolamento e manutenção de isolado de *Macrophomina phaseolina*

O patógeno *M. phaseolina* foi isolado a partir de plantas de soja naturalmente infectadas e sintomáticas, oriundas de lavoura comercial da região de Dourados, MS.

O isolamento foi feito com fragmentos de tecido da região da haste da soja, com sintomas, desinfestados em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1%, lavados em água esterilizada e posteriormente colocados na superfície de meio de cultura BDA.

As placas de Petri foram vedadas com plástico filme, identificadas e incubadas em B.O.D., com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após uma semana de incubação, em uma câmara de fluxo laminar, foram retirados, das bordas das colônias, três discos de micélio de 3 mm, e transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA, já vertido (Figura 3). Os isolados foram identificados e armazenados em refrigerador a 5 °C.

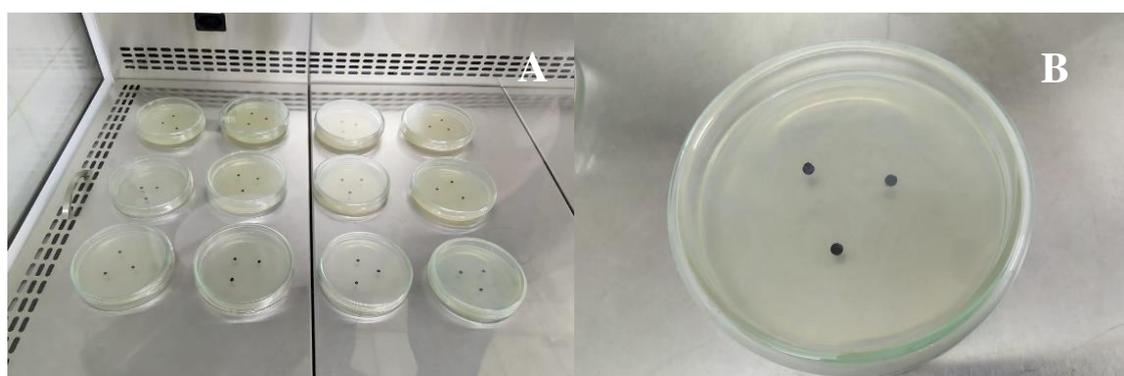


FIGURA 3. Discos de micélio do patógeno *M. phaseolina* transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA, em câmara de fluxo laminar (A); discos de micélio de 3 mm (B). Dourados-MS, UFGD, 2021. Fonte: Da autora.

3.3. Inoculação de *Macrophomina phaseolina* nas plantas de soja

A inoculação do patógeno se deu por meio do método do palito de madeira (GASPERI, 2000). O método consiste do preparo do inóculo, com segmentos de palitos

de dente com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, acondicionados em posição vertical em papel de filtro perfurado em placas de Petri e autoclavados a 121 °C/1 atm/20'.

Os segmentos de palitos foram transferidos de forma asséptica à câmara de fluxo laminar para que o BDA fosse vertido e, após a solidificação do meio, três discos de micélio do patógeno de *Macrophomina phaseolina* foram inseridos em cada placa contendo os palitos para crescimento do patógeno em B.O.D. a temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas (Figura 4).



FIGURA 4. Discos de micélio do patógeno *M. phaseolina* transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA, em câmara de fluxo laminar para infestação dos palitos para posterior inoculação nas cultivares de soja. Dourados-MS, UFGD, 2021. Fonte: Da autora.

Após 25 dias da semeadura (estádio V2-V3), e três dias posterior a aplicação dos tratamentos, realizou-se a inserção de um palito (infestado com *M. phaseolina*) em cada uma das 6 plantas de soja, de cada unidade experimental (Figura 5). Para as testemunhas absolutas (plantas de soja sem inoculação e sem pulverização), efetuou-se a inserção de palitos somente esterilizados.

No que diz respeito aos tratamentos estabelecidos, efetuou-se a pulverização, com um borrifador para cada um dos fungicidas microbiológicos e o fertilizante comercial, conforme doses estabelecidas para o ensaio I (Quadro 3) e para o ensaio II (Quadro 4). Para ambas as testemunhas, não inoculada e inoculada, não foi executada a aplicação dos tratamentos controle.



FIGURA 5. Base das plantas e ponto de inserção do palito de madeira com *M. phaseolina* nas diferentes cultivares de soja. Dourados-MS, UFGD, 2021.
Fonte: Da autora.

3.4. Características avaliadas

A cada 10 dias, do tempo zero, momento da inoculação de *M. phaseolina*, até 50 dias, após a inserção do patógeno nas cultivares de soja, foram avaliadas as seguintes características:

a) Crescimento: a altura de plantas (cm) foi realizada por meio de régua graduada. Através deste parâmetro, calculou-se a taxa de crescimento absoluto (TCA) (cm.dia^{-1}) (BENINCASA, 2003), entre os 20 e 50 dias.

$$*TCA = M2 - M1 / T2 - T1$$

em que:

M2 = medição final da altura ou diâmetro;

M1= medição inicial da altura ou diâmetro;

T2 – T1 = intervalo de tempo.

b) Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD): realizou-se a mensuração do comprimento de lesão (cm) e, por meio deste, procedeu-se com o cálculo da AACPD (CAMPBELL E MADDEN, 1990).

$$*AACPD = \Sigma [(y_i + y_{i+1}) / 2] \times (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

y_i = severidade inicial da doença

y_{i+1} = severidade final da doença

$t_{i+1} - t_i$ = intervalo de tempo entre as leituras inicial e final

c) Fluorescência da clorofila *a*: foi determinada fisiologia da planta utilizando o fluorômetro portátil de clorofila (OS-30p; *Opti-Sciences Chlorophyll Fluorometer*, Hudson, NY, USA) (Figura 6), sempre no terceiro trifólio de cima para baixo da planta, em folhas completamente expandidas, e submetidas a condição de escuro r, utilizando cliques foliares por 20 minutos e determinou-se a fluorescência máxima da clorofila *a* e a eficiência quântica potencial fotoquímica no fotossistema II (F_v/F_m). Posteriormente, foi calculada a eficiência de conversão de energia absorvida (F_v/F_0).



FIGURA 6. Fluorômetro portátil de clorofila (OS-30p; *Opti-Sciences Chlorophyll Fluorometer*, Hudson, NY, USA) – Papel alumínio envolto por 20 minutos no terceiro trifólio, para posterior avaliação (A); leitura do equipamento dos parâmetros avaliados (B). Dourados-MS, UFGD, 2021. Fonte: Da autora.

d) Teor de clorofila: de forma indireta através do medidor SPAD-502. Cada medida foi apresentada por três leituras no folíolo central do trifólio amostrado. As amostras foram realizadas no dossel da soja (terço inferior) em todas as plantas da parcela.

3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativos pelo teste F ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, Scott Knott e análise de regressão, para cultivares, controle de *M. phaseolina* e períodos de avaliação, respectivamente, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2019).