

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DA BIODIVERSIDADE
– EDITAL N.º 01/2019/PRPI – CHAMADA PICT/FUNCAP –

1. Título do Projeto de Pesquisa

Macrophomina em cultivos de feijão-caupi no Cariri Cearense: adaptabilidade comparativa e manejo pela adubação verde

2. Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é a leguminosa alimentar mais importante da região semiárida do Nordeste brasileiro, sendo considerada a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda (SILVA; ROCHA; MENEZES JUNIOR, 2016). Anualmente, na região são cultivados cerca de 1,2 milhões de hectares com feijão-caupi, com produção de aproximadamente 434 mil toneladas de grãos (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2017). A opção dos produtores de cultivar essa leguminosa se deve à sua maior resistência ao estresse hídrico, tendo em vista os frequentes períodos de seca na região. Além disso, é produzida principalmente em unidades de agricultura familiar, desempenhando importante papel socioeconômico (SILVA; ROCHA; MENEZES JUNIOR, 2016).

O estado do Ceará se destaca como um dos maiores produtores de feijão-caupi da região Nordeste. Em 2014, a produção de feijão-caupi no Ceará foi de 108.998 toneladas. Na mesorregião do Sul Cearense, conhecida como região do Cariri, o feijão-caupi é cultivado em cerca de 63.000 ha, com produção de 30.000 toneladas, sendo uma das principais culturas de subsistência da região (INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ, 2019).

Apesar da grande adaptação às condições climáticas, a produtividade do feijão-caupi é baixa no Nordeste brasileiro. Dentre os fatores que limitam o desenvolvimento dessa leguminosa na região, destaca-se a ocorrência de doenças, principalmente da podridão cinzenta do caule, causada pelo fungo do gênero *Macrophomina* (ATHAYDE SOBRINHO, 2016; GOMES-SILVA et al., 2018).

A podridão cinzenta em feijão-caupi foi registrada pela primeira vez no Brasil em 1935, sendo considerada mais importante em regiões semiáridas (ATHAYDE SOBRINHO, 2016). Os danos causados por *Macrophomina* em feijão-caupi podem variar dependendo do órgão e do estágio de desenvolvimento da planta e das condições ambientais (KAUR et al., 2012). Os sintomas podem se manifestar em todos os estágios de desenvolvimento da planta. Em plântulas, os sintomas são observados nos cotilédones na forma de necroses com coloração escuras, que progridem para as margens dos cotilédones, coalescendo em lesões irregulares ligeiramente deprimidas no caule da planta, podendo levar a morte da mesma. Em alguns casos, durante a fase de folha unifoliolada, os sintomas típicos são caracterizados por pequenas necroses preta, em sua maioria restrita à região do hipocótilo, podendo atingir também a raiz. Essas necroses podem expandir-se e desenvolver-se em grandes lesões necróticas, levando a morte da planta (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012; NDIAYE et al., 2015). Em plantas adultas, observa-se a presença de lesões caulinares de cor acinzentada com desenvolvimento mais lento. Essas lesões levam à obstrução dos vasos do xilema resultando na morte das raízes e do caule (NDIAYE et al., 2015). Essa doença pode causar perdas de até 100% da produção de feijão-caupi na região semiárida brasileira, dependendo da estação de cultivo e da cultivar (GOMES-SILVA et al., 2018).

O gênero *Macrophomina* é constituído de somente três espécies. *Macrophomina phaseolina* é a espécie-tipo e foi descrita em 1947 (DHINGRA; SINCLAIR, 1978),

apresentando distribuição mundial e causando doenças em mais de 680 espécies de plantas hospedeiras (FARR et al., 2019). *Macrophomina pseudophaseolina* foi descrita em 2014, causando podridão cinzenta em feijão-caupi no Senegal (SARR et al., 2014) e posteriormente em mamona no Brasil (MACHADO et al., 2019). *Macrophomina euphorbiicola* foi descrita em 2019, causando doenças em mamona e pinhão-mansão no Brasil (MACHADO et al., 2019).

A identificação precisa dos agentes patogênicos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo de doenças de plantas (EIRAS; GALLETTI, 2012). Atualmente é considerada impossível a identificação das espécies de *Macrophomina* por características morfológicas, sendo essencial a utilização de ferramentas moleculares baseadas em sequenciamento de DNA e análise filogenética multilocus (SARR et al., 2014; MACHADO et al., 2018). Contudo, essas técnicas são trabalhosas, têm custo elevado, demandam tempo e conhecimento de análises filogenéticas para a identificação das espécies. Como alternativa, a utilização de iniciadores específicos proporciona a identificação das espécies com baixo custo, além de ser uma técnica rápida, prática e de fácil utilização (BOONHAM; TOMLINSON; MUMFORD, 2016). Recentemente, a equipe desse projeto desenvolveu iniciadores específicos para as três espécies de *Macrophomina* baseado em EF1- α . A validação desses iniciadores teve sucesso com a análise de 15 isolados de cada espécie de *Macrophomina*, bem como com 45 isolados de espécies fúngicas pertencentes a outros gêneros (artigo em fase de redação). Com esses iniciadores específicos, foram identificadas as três espécies de *Macrophomina* (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*) causando podridão cinzenta do feijão-caupi no Cariri cearense (artigo em fase de redação).

Na evolução dos organismos, a seleção natural é uma força poderosa que age e ocorre por conta da quantidade de descendentes capazes de sobreviver. Essa sobrevivência não é aleatória, sendo muitas vezes dependente da adaptabilidade (“fitness”) dos indivíduos (MILGROOM, 2015). A adaptabilidade biológica de um patógeno de planta é descrita como a habilidade relativa para persistir em um ambiente por um longo período de tempo (NELSON, 1979). Como a adaptabilidade é relativa, pode ser estimada pela mensuração de caracteres que propiciam alguma vantagem adaptativa entre os indivíduos (MILGROOM, 2015). Vários marcadores fenotípicos têm sido utilizados para avaliar a adaptabilidade em patógenos das plantas, com destaque para taxa de crescimento micelial, potencial reprodutivo, sensibilidade a fungicidas e agressividade (ANTONOVICS; ALEXANDER, 1989; LANNOU, 2012; MILGROOM, 2015).

Apesar da importância da podridão cinzenta do feijão-caupi em nível mundial, até o momento não foi investigada a adaptabilidade das diferentes espécies de *Macrophomina* associadas a essa leguminosa sob diferentes condições de temperatura, pH, salinidade, potencial hídrico, fungicida e planta hospedeira, o que pode gerar informações importantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo da doença.

O controle da podridão cinzenta do feijão-caupi é muito difícil, pois o patógeno possui elevada agressividade, combinada com capacidade de sobrevivência no solo na ausência da planta hospedeira, transmissibilidade pelas sementes e ampla gama de hospedeiros (ATHAYDE SOBRINHO, 2004; GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012; KAUR et al., 2012). Não existem cultivares/variedades comerciais de feijão-caupi com níveis aceitáveis de resistência à podridão cinzenta, a rotação de culturas é pouco eficiente e o controle químico é ineficiente, inviável economicamente e de elevado impacto ambiental (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012; ISLAM et al., 2012; KAUR et al., 2012). Diante disso, para evitar a doença, os agricultores abandonam as áreas infestadas, gerando grandes perdas econômicas devido à desvalorização das áreas abandonadas (MICHEREFF; PERUCH; ANDRADE, 2005).

As medidas utilizadas no controle da podridão cinzenta do caule do feijão-caupi incluem tratamento de sementes, utilização de sementes sadias e certificadas, plantio em áreas livre do patógeno e eliminação de restos de cultura infectados (ATHAYDE SOBRINHO, 2016). No entanto, essas medidas de controle ainda são insuficientes para a redução aceitável dos níveis da doença. A indução da supressividade do solo é um aspecto fundamental a ser investigado no

desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo de doenças radiculares (STONE et al., 2004; BETTIOL; GHINI, 2005). A supressividade do solo pode ser induzida de várias maneiras, dentre as quais, pela adubação verde (PALTI, 1981; ABAWI; WIDMER, 2000; STONE et al., 2004; GHORBANI et al., 2008; LARKIN, 2015; YADAV et al., 2015). No entanto, até o momento não foi investigado o potencial de manejo da podridão cinzenta do feijão-caupi pela utilização da adubação verde.

Diante do exposto, o presente projeto se justifica pela importância do feijão-caupi para a agricultura familiar no Cariri Cearense e pela necessidade da investigação da adaptabilidade das diferentes espécies de *Macrophomina*, o que pode influenciar diretamente a resposta em relação às medidas de manejo adotadas. Adicionalmente, como as medidas atualmente adotadas ainda são insuficientes para o sucesso no controle da doença nas áreas de produção, a busca de tecnologias sustentáveis para agregar ao manejo da doença, como a utilização da adubação verde, deve ser priorizada e constitui um importante aspecto desse projeto.

3. Objetivos e Metas

3.1. Objetivo Geral

- Comparar a adaptabilidade das espécies de *Macrophomina* causadoras da podridão cinzenta do feijão-caupi na região do Cariri Cearense e avaliar a eficácia da adubação verde no manejo da doença.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar a adaptabilidade biológica e patogênica das espécies de *Macrophomina* causadoras da podridão cinzenta do feijão-caupi na região do Cariri Cearense sob diferentes condições de temperatura, pH, salinidade, potencial hídrico, fungicida e planta hospedeira;
- Avaliar a eficácia da utilização de adubos verdes incorporados ao solo no controle podridão cinzenta do feijão-caupi;
- Identificar os fatores edáficos de natureza biótica associados à eficácia no controle da podridão cinzenta do feijão-caupi com a utilização da adubação verde;
- Redigir artigos científicos abordando as informações geradas pelos estudos;
- Divulgar os resultados em evento científico nacional;
- Orientar estudantes de graduação no tema do projeto.

3.3. Metas

- Comparação da adaptabilidade de 30 (trinta) isolados das três espécies de *Macrophomina* causadoras da podridão cinzenta do feijão-caupi na região do Cariri Cearense sob diferentes condições de temperatura, pH, salinidade, potencial hídrico, fungicida e planta hospedeira;
- Avaliação da eficácia da utilização de 10 (dez) espécies de adubos verdes incorporados ao solo no controle podridão cinzenta do feijão-caupi;
- Análise de no mínimo 04 (quatro) fatores edáficos de natureza biótica associados à eficácia no controle da podridão cinzenta do feijão-caupi com a utilização da adubação verde;

- Redação de pelo menos 02 (dois) artigos científicos a serem submetidos à publicação em periódicos classificados como A1 e/ou A2 pela CAPES;
- Divulgação dos resultados obtidos em evento científico de nível nacional;
- Orientação de 02 (dois) estudantes de graduação de Agronomia em atividades de iniciação científica.

4. Metodologia

Os experimentos propostos nesse projeto serão desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias – CCAB, Campus Crato, da Universidade Federal do Cariri - UFCA.

4.1. Análise comparativa da adaptabilidade das espécies de *Macrophomina* causadoras da podridão cinzenta do feijão-caupi na região do Cariri Cearense

Serão utilizados 10 (dez) isolados de cada uma das três espécies de *Macrophomina* causadoras da podridão cinzenta do feijão-caupi na região do Cariri Cearense, previamente identificados por iniciadores específicos (artigo em fase de redação). A adaptabilidade das espécies será comparada sob diferentes condições de temperatura, pH, salinidade, potencial hídrico, fungicida e planta hospedeira.

4.1.1. Efeito da temperatura

Discos de micélio (5 mm de diâmetro) serão retirados da margem da colônia de cada isolado com sete dias de crescimento em BDA e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA. Três placas de cada isolado serão colocadas em incubadoras com temperaturas controladas a 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C no escuro. O delineamento experimental será inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com três repetições (placas) por combinação de isolado e temperatura. O diâmetro das colônias será mensurado aos dois dias de incubação em duas direções perpendiculares e obtida a média (mm).

4.1.2. Efeito pH

Discos de micélio (5 mm de diâmetro) serão retirados da margem da colônia de cada isolado com sete dias de crescimento em BDA e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA ajustado para pH 4, 5, 6, 7, 8 e 9 pelo uso de soluções 1M de NaOH e HCl. As placas serão incubadas no escuro a 25°C. O delineamento experimental será inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com três repetições (placas) por combinação de isolado e nível de pH. O diâmetro das colônias será avaliado como descrito anteriormente (item 4.1.1).

4.1.3. Efeito da salinidade

Discos de micélio (5 mm de diâmetro) serão retirados da margem da colônia de cada isolado com sete dias de crescimento em BDA e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA suplementado com 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8% (peso/volume) de NaCl. As placas serão incubadas no escuro a 25°C. O delineamento experimental será inteiramente casualizado, em

arranjo fatorial, com três repetições (placas) por combinação de isolado e nível de salinidade. O diâmetro das colônias será avaliado como descrito anteriormente (item 4.1.1).

4.1.4. Efeito do potencial hídrico (Ψ_s)

Discos de micélio (5 mm de diâmetro) serão retirados da margem da colônia de cada isolado com sete dias de crescimento em BDA e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA suplementado com KCl para obter os valores de potencial hídrico (Ψ_s) de -1.0, -2.0, -3.0, -4.0 e -5.0 Mpa, conforme Michel e Radcliffe (1995). As placas serão incubadas no escuro a 25°C. O delineamento experimental será inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com três repetições (placas) por combinação de isolado e nível de potencial hídrico. O diâmetro das colônias será avaliado como descrito anteriormente (item 4.1.1).

4.1.5. Efeito de fungicidas

Serão utilizadas formulações comerciais dos fungicidas azoxistrobina, carbendazin, fluazinan, fludioxonil, pentacloronitrobenzeno, piraclostrobina e tebuconazole, testados em nível mundial para o controle da podridão cinzenta do caule em várias culturas. A sensibilidade dos isolados será avaliada em relação à inibição do crescimento micelial. Os fungicidas serão dissolvidos em água e adicionados ao meio BDA fundente (45°C) para alcançar as concentrações a concentração final de 5 $\mu\text{g i.a./mL}$. Discos de micélio (5 mm de diâmetro) serão retirados da margem da colônia de cada isolado com 10 dias de crescimento em BDA e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA suplementado com o fungicida. Placas contendo BDA sem fungicida serão utilizadas como testemunhas. Os fungicidas serão avaliados separadamente e para cada fungicida o delineamento experimental será inteiramente casualizado, com três repetições (placas) por isolado. As placas serão incubadas no escuro a 25°C. O diâmetro das colônias será avaliado como descrito anteriormente (item 4.1.1). A porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) será calculada com a fórmula $ICM = [(C - N)/T] \times 100$, onde C é o diâmetro da colônia da testemunha (sem fungicida) e N é o diâmetro da colônia para o tratamento com o fungicida.

4.1.6. Efeito da planta hospedeira

Amostras de substrato serão infestadas com os isolados de *Macrophomina* e posteriormente plantadas com algodão, feijão-caupi, mamona, melão e sorgo, sendo duas cultivares de cada espécie vegetal. O inóculo de *Macrophomina* será preparado em frascos Erlenmeyer contendo substrato constituído de 100 g de arroz sem casca e 75 mL de água destilada. Após a esterilização em autoclave (120 °C, 1 atm, 20 minutos) e resfriamento, em cada frasco serão colocados cinco discos de 5 mm de diâmetro de cultura de *Macrophomina*, previamente cultivada em meio BDA durante sete dias. Os frascos serão incubados a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, sendo agitados diariamente para distribuição uniforme dos propágulos do fungo no substrato. Após 15 dias, o substrato colonizado será retirado dos frascos e acondicionado em sacos de papel para secagem a 35°C por 48 horas.

Em cada vaso plástico (2,5 kg de capacidade) contendo substrato (85% de solo e 15% de esterco bovino curtido) previamente autoclavado em dois dias consecutivos (120 °C, 1 atm, 30 minutos) serão perfuradas cinco covas e em cada cova serão depositados três grãos de arroz colonizados com *Macrophomina*. As testemunhas consistirão na deposição em cada cova de plantio de três grãos de arroz autoclavados e sem a colonização pelo fungo. Imediatamente após a infestação, em cada cova será plantada uma semente, previamente desinfestada em solução

de NaClO a 1,5% por 2 minutos, lavada em água destilada esterilizada e seca por 30 minutos em câmara asséptica. As plantas hospedeiras serão avaliadas separadamente e para cada hospedeira o delineamento experimental será inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com cinco repetições (vasos). Os vasos serão mantidos em casa de vegetação e a partir do dia da inoculação, o regime de rega será alterado de um dia para dois dias de intervalo, visando introduzir estresse hídrico típico do clima predominante no Nordeste brasileiro, onde a podridão cinzenta é muito grave.

A avaliação será realizada aos 20 dias após a semeadura, pela estimativa da severidade da doença com o auxílio de uma escala de notas de 0 a 5, em que: 0 = ausência de sintomas; 1 = lesões limitadas aos tecidos cotiledonares; 2 = lesões radiculares, cotiledonares e/ou alcançando os tecidos do hipocótilo em aproximadamente 2,0 cm; 3 = lesões acima de 2,0 cm de comprimento na região do colo da planta; 4 = caule com todo o seu diâmetro colonizado pelo fungo e/ou com presença de picnídios; 5 = sementes não germinadas e tombamento de plântulas (LIMA, 2015). Com os dados será calculado o índice de severidade da doença (ID) por vaso, pela expressão: $ID = (\sum f(v)/N \cdot X) \cdot 100$, onde f = número de plantas com um determinado nível da escala de notas, v = nível da escala observado, N = número total de plantas avaliadas e X = nível máximo da escala (MCKINNEY, 1923).

4.1.7. Análises estatísticas

Nos experimentos de temperatura, pH, salinidade e potencial hídrico os dados serão submetidos às análises de regressão linear e não-linear. Os níveis ótimos das variáveis que propiciaram os maiores crescimentos miceliais e os crescimentos miceliais máximos serão estimados usando os modelos de regressão e os sumários numéricos com o auxílio do programa TableCurve™ 2D 5.01 (Systat Software Inc., Chicago, EUA). A escolha dos modelos será determinada pelo coeficiente de determinação (R^2), distribuição dos resíduos e quadrado médio dos erros. As significâncias das regressões serão verificadas pelo teste F ($P < 0,05$) e de seus parâmetros pelo teste t ($P < 0,05$). Os valores das variáveis estimadas pelos modelos de regressão, bem como das variáveis dos experimentos de fungicidas e agressividade em plantas hospedeiras serão submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste da diferença mínima significativa (LSD) de Fisher ($P = 0,05$). As ANOVAs e as comparações de médias serão realizadas com auxílio do programa Statistix 9.0.

4.2. Avaliação da eficácia de adubos verdes incorporados ao solo no controle podridão cinzenta do feijão-caupi e identificação dos fatores edáficos associados

4.2.1. Avaliação da eficácia da utilização de adubos verdes incorporados ao solo no controle podridão cinzenta do feijão-caupi

O experimento será conduzido em 60 microparcels constituídas de manilhas de concreto com 0,5 m de diâmetro e 0,5 m de profundidade. Será utilizado um solo sem histórico anterior de cultivo com feijão-caupi e sem histórico de ocorrência de doenças radiculares. A correção da fertilidade do solo será efetuada com base na análise química e na recomendação de adubação para a cultura. Os dados de temperatura e umidade relativa do ar, precipitação pluvial, temperatura e umidade do solo nas profundidades de 10 e 20 cm serão mensurados a intervalos de 60 min com o auxílio de dataloggers e sensores instalados dentro da área de microparcels.

No experimento, 55 microparcels serão submetidas à infestação com o inóculo de um isolado de *M. phaseolina*, espécie mais prevalente na região do Cariri Cearense (artigo em fase de redação), enquanto cinco parcelas não serão infestadas pelo patógeno e constituirão a testemunha. A infestação do solo de cada parcela será realizada aos 30 dias antes do primeiro

ciclo de cultivo, pela remoção de uma camada superficial de 20 cm de solo (cerca de 20 kg) e mistura ao substrato colonizado pelo patógeno, com posterior distribuição na parcela correspondente. A mistura entre o solo das parcelas e o substrato colonizado pelo patógeno será efetuada visando a obtenção da densidade de inóculo em torno de 1×10^3 ufc/g de solo de *Macrophomina*.

Serão testados 12 tratamentos, em três ciclos de cultivo, conforme demonstrado no Quadro 1. Os adubos verdes a serem testados incluem: crotalária breviflora, crotalária juncea, crotalária spectabilis, feijão-de-porco, guandu anão, guandu forrageiro, lab-lab, mucuna-preta, mucuna-anã e mucuna-preta. O intervalo entre cada ciclo de cultivo será de aproximadamente 30 dias.

Quadro 1 – Tratamentos e ciclos de cultivos a serem utilizados na avaliação da eficácia da adubação verde no controle da podridão cinzenta do feijão-caupi.

Tratamento	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
1	caupi	caupi	caupi
2	caupi	crotalária breviflora	caupi
3	caupi	crotalária juncea	caupi
4	caupi	crotalária spectabilis	caupi
5	caupi	feijão-de-porco	caupi
6	caupi	guandu anão	caupi
7	caupi	guandu forrageiro	caupi
8	caupi	lab-lab	caupi
9	caupi	mucuna-anã	caupi
10	caupi	mucuna-preta	caupi
11	caupi	sem plantio	caupi
12 (Testemunha)	caupi	caupi	caupi

Nos plantios será utilizada a cultivar de caupi IPA-207, caracterizada como altamente suscetível a *Macrophomina*. Em todos os ciclos de cultivo, antes do plantio as sementes serão desinfestadas em solução de NaOCl 1,5% durante 2 min, lavadas em água corrente e colocadas para secar durante 45 min. Nas microparcels serão semeadas 20 sementes. Ao atingirem o estágio de plena floração (> 50% das plantas em florescimento), os adubos verdes serão picados manualmente e incorporados ao solo, deixando um intervalo mínimo de 20 dias entre a incorporação e um novo plantio de caupi para a decomposição parcial dos restos culturais. O delineamento experimental será inteiramente casualizado, com cinco repetições.

Ao final do primeiro e do terceiro ciclos, as plantas de feijão-caupi serão avaliadas em relação à severidade da podridão cinzenta, rendimento de sementes e nodulação das raízes. A severidade da doença será avaliada com o auxílio de escala de notas (LIMA, 2015) e posteriormente calculado o índice de severidade da doença (MCKINNEY, 1923) por parcela. O rendimento de sementes será determinado pelo peso total de sementes por parcela e a porcentagem de redução no rendimento (PR) devido à doença será estimada pela fórmula: $PR = [(RPS - RPD) / RPS] \times 100$, onde RPS = rendimento na parcela sadia (testemunha) e RPD = rendimento na parcela doente. A nodulação das raízes será avaliada pela contagem do número de nódulos viáveis (vermelhos ou rosados) (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987).

4.2.2. Identificação dos fatores edáficos de natureza biótica associados à eficácia no controle da podridão cinzenta do feijão-caupi com a utilização da adubação verde

Visando identificar os fatores edáficos de natureza biótica associados à supressividade ou conducividade da podridão cinzenta com a utilização da adubação verde, serão estimadas as populações microbianas no solo por diluição em série e plaqueamento em meio de cultura. As amostras de solo serão coletadas nas microparcelas próximas às linhas de plantio (5-10 cm de profundidade) no dia da avaliação final da severidade da podridão cinzenta no primeiro e no terceiro ciclos de cultivo. Serão retiradas cinco amostras de 100g de cada parcela, que depois de homogeneizadas constituirão uma amostra composta. Uma alíquota de 10 g de solo será retirada da amostra e colocada em Erlenmeyers com 90 mL de água esterilizada. Após 30 min de agitação mecânica em uma mesa agitadora a 200 rpm, serão realizadas diluições seriadas e suspensões de 10^{-2} e 10^{-3} distribuídas em diferentes meios de cultura: MSTP 1 para *Macrophomina* (NASCIMENTO et al., 2014); meio seletivo para *Trichoderma* (TSM) (ELAD; CHET, 1983); meio King B (KMB) para *Pseudomonas* fluorescentes (KING et al., 1954) e ágar nutriente (TUIE, 1969) para bactéria formadora de endósporo, no qual, antes do plaqueamento, as diluições serão aquecidas sem banho-maria a 80°C durante 20 min (SNEATH, 1986). As placas de Petri serão incubadas a 25°C no escuro. As populações de bactérias serão avaliadas depois de 48 horas de incubação e os fungos após cinco dias. Cada população resultará da média de três placas, sendo expressas em unidades formadoras de colônia por grama de solo (ufc/g).

4.2.3. Análises estatísticas

Os valores de índice de severidade da doença, redução do rendimento de sementes e nodulação no primeiro e no terceiro ciclos serão submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste LSD ($P=0,05$). Adicionalmente, os resultados de severidade da doença, rendimento de sementes, nodulação e populações microbianas serão submetidos à análise de correlação de Pearson, análises não-paramétricas e multivariadas, como componentes principais, correlações canônicas e trilha, refletindo a preocupação de evitar reducionismos e procurando caracterizar os fatores bióticos do solo responsáveis pela capacidade supressiva ou conduciva à doença induzida pela adubação verde. As análises serão realizadas com auxílio do programa Statistix 9.0.

4.3. Redação de artigos científicos

Serão efetuadas redações de artigos científicos após o final das seguintes fases experimentais:

a) Análise comparativa da adaptabilidade das espécies de *Macrophomina* associadas às plantas de feijão-caupi com podridão cinzenta no Cariri Cearense (item 4.4)

b) Avaliação da eficácia da utilização de adubos verdes incorporados ao solo no controle da podridão cinzenta do feijão-caupi e identificação dos fatores edáficos associados (item 4.5)

Os artigos serão submetidos para publicação em periódicos internacionais classificados como A1 e/ou A2 pela CAPES.

4.4. Difusão das informações geradas

As informações geradas com os estudos serão publicadas na forma de artigos científicos em revistas internacionais arbitradas da área de Fitopatologia, bem como divulgações em evento científico de nível.

4.5. Formação de recursos humanos

Durante toda a execução do projeto estarão envolvidos estudantes de graduação em Agronomia da Universidade Federal do Cariri (UFCA), o que permitirá a formação de recursos humanos de alto nível na área de Fitopatologia, com ênfase para a podridão cinzenta em cultivo estratégico para o estado do Ceará.

5. Principais Contribuições Científicas, Tecnológicas ou de Inovação da Proposta

5.1. Contribuições Científicas

- Esclarecimento sobre a adaptabilidade biológica e patogênica das espécies de *Macrophomina* causadoras da podridão cinzenta do caule em feijão-caupi no Cariri cearense;
- Caracterização dos fatores edáficos de natureza biótica associados à eficácia no controle da podridão cinzenta do feijão-caupi com a utilização da adubação verde;
- Redação de artigos científicos a serem submetidos à publicação em periódicos classificados como A1 e/ou A2 pela CAPES;
- Divulgação dos resultados obtidos evento científico de nível nacional;
- Orientação de estudantes de graduação em atividades de iniciação científica.

5.2. Contribuições Tecnológicas

- Caracterização da prevalência e da distribuição das espécies de *Macrophomina* associadas à podridão cinzenta do feijão-caupi no Cariri cearense;
- Indicação de espécies de adubos verdes com potencial de utilização no manejo da podridão cinzenta do caule em feijão-caupi no Cariri cearense.

6. Cronograma de Execução

Atividade	Tempo de Início do Projeto (Mês)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Análise comparativa da adaptabilidade das espécies de <i>Macrophomina</i> em diferentes temperaturas	•	•										
Análise comparativa da adaptabilidade das espécies de <i>Macrophomina</i> em diferentes níveis de pH		•	•									
Análise comparativa da adaptabilidade das espécies de <i>Macrophomina</i> em diferentes níveis de salinidade			•	•								
Análise comparativa da adaptabilidade das espécies de <i>Macrophomina</i> em diferentes níveis de potencial hídrico				•	•							
Análise comparativa da adaptabilidade das espécies de <i>Macrophomina</i> em diferentes fungicidas					•	•	•	•				
Análise comparativa da adaptabilidade das espécies de <i>Macrophomina</i> em diferentes plantas hospedeiras								•	•	•	•	•
Avaliação da eficácia de adubos verdes no controle podridão cinzenta do feijão-caupi	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
Identificação dos fatores edáficos de natureza biótica associados ao controle da podridão cinzenta do feijão-caupi				•	•						•	•
Redação de artigos científicos												•
Difusão das informações geradas												•
Formação de recursos humanos	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

7. Referências Bibliográficas

ABAWI, G. S.; WIDMER, T. L. Impact of soil health management practices on soil-borne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 37-47, 2000.

ANTONOVICS, J.; ALEXANDER, H. M. The concept of fitness in plant fungal pathogen systems. In: LEONARD, K. J.; FRY, W. E. (Eds.). **Plant disease epidemiology**. New York: McGraw-Hill, 1989. p. 185-214.

ATHAYDE SOBRINHO, C. Principais doenças do feijão-caupi no Brasil. In: BASTOS, E. A. (Eds.). **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016. p. 44-66.

BABU, K. B.; SRIVASTAVA, A. K.; SAXENA, A. K.; ARORA, D. K. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species specific oligonucleotide primers and probe. **Mycologia**, New York, v. 99, p. 733-739, 2007.

- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.H. Freeman, 1974. 433 p.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE - Imprensa Universitária, 2005. p. 125-153.
- BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. (Eds.). **Molecular methods in plant disease diagnostics**. Wallingford: CABI, 2016. 198 p.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 166 p.
- EIRAS, M.; GALLETI, S. R. (Eds.). **Técnicas de diagnóstico de fitopatógenos**. São Paulo: Devir, 2012. 192 p.
- ELAD, Y.; CHET, I. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 11, p. 55-58, 1983.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2016): área, produção e rendimento**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2017. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2019.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. **Fungus-host distribution database**. 2019. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 25 jan. 2019.
- GHORBANI, R.; WILOCKSON, S.; KOOCHKEI, A.; LEIFERT, C. Soil management for sustainable crop disease control: a review. *Environmental Chemical Letters*, London, v. 6, p. 149-162, 2008.
- GOMES-SILVA, F.; ALMEIDA, C. M. A.; SILVA, A. G.; LEÃO, M. P. C.; SILVA, K. P.; OLIVEIRA, L. G.; SILVA, M. V.; COSTA, A. F.; LIMA, V. L. M. Genetic diversity of isolates of *Macrophomina phaseolina* associated with cowpea from Brazil semi-arid region. **Journal of Agricultural Science**, Ottawa, v. 9, p. 112-116, 2017.
- 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**, Berlin, v. 160, p. 167-180, 2012.
- INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ. **Ceará em mapas**. Disponível em: <http://www2.ipece.ce.gov.br/atlas/capitulo1/11/128x.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- ISLAM, S.; HAQUE, S.; ISLAM, M. M.; EMDAD, E. M.; HALIM, A.; HOSSEN, Q. M.; HOSSAIN, Z.; AHMED, B.; RAHIM, S.; RAHMAN, S.; ALAM, M.; HOU, S.; WAN, X.; SAITO, J. A.; ALAM, M.; Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, Chichester, v. 13, p. 493-509, 2012.
- KAUR, S.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VALLAD, G. E.; CHAND, R.; CHAUHAN, V. B. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 38, p. 136-51, 2012.
- KING, E. O.; WARD, M. K.; BANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

- LANNON, C. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 319-338, 2012.
- LARKIN, R. P. Soil health paradigms and implications for disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, p. 199-221, 2015.
- LIMA, L. R. L. **Cruzamentos dialélicos para resistência a *Macrophomina phaseolina* e a *Thanatephorus cucumeris* em feijão-caupi**. 2015. 65f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; SOARES, D. J.; GOMES, A. A. M.; PEREIRA, O. L. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 153, p. 89-100, 2019.
- MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, p. 195-218, 1923.
- MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A.; ANDRADE, D. E. G. T. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco - Imprensa Universitária, 2005. p. 1-18.
- MILGROOM, M. G. **Population biology of plant pathogens: genetics, ecology, and evolution**. St. Paul: APS Press, 2015. 399 p.
- NASCIMENTO, S.R.C.; AMBRÓSIO, M.M.Q.; SILVA, F.H.A.; GUIMARÃES, L.M.S. Meios de cultura semi-seletivos para *Macrophomina phaseolina*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 3, p. 334-337, 2014.
- NDIAYE, M.; SARR, M. P.; CISSE, N.; NDOYE, I. Is the recently described *Macrophomina pseudophaseolina* pathogenically different from *Macrophomina phaseolina*? **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 9, n. 45, p. 2232 -2238, 2015.
- NELSON, R. R. The evolution of parasitic fitness. In: HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. (Eds.). **Plant disease: an advanced treatise**. v. 4: How pathogens induce disease. New York: Academic Press, 1979. p. 23-46.
- PALTI, J. **Cultural practices and infectious crop diseases**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. 241 p.
- SARR, M. P.; NDIAYE, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 53, p.250-268, 2014.
- SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; MENZES JÚNIOR, J. Â. N. Socioeconômico. In: BASTOS, E. A. (Eds.). **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016. p. 44-66.
- SNEATH, P. H. () Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1104-1207.
- STONE, A. G.; SCHEUERELL, S. J.; DARBY, H. M. Suppression of soilborne diseases in field agricultural systems: organic matter management, cover cropping, and other cultural practices. In: MAGDOFF, F.; WEIL, R. R. (Eds.). **Soil organic matter in sustainable agriculture**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 132-164.
- TUITE, J. **Plant pathological methods - fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p.

VAN SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987. 53 p.

YADAV, R. S.; PANWAR, J.; MEENA, H. N.; THIRUMALAISAMY, P. P.; MEE, R. L. Developing disease-suppressive soil through agronomic management. In: MEGHVANSI, M. K.; VARMA, A. (Eds.). **Organic amendments and soil suppressiveness in plant disease management**. Cham: Springer International, 2015. p. 61-94.