



NEVENKA DE MATOS MOURA

**CONTRIBUIÇÕES AO ESTUDO DA INTERAÇÃO DE
Corynespora cassicola COM SEMENTES DE ALGODÃO E
SOJA**

**LAVRAS - MG
2024**

NEVENKA DE MATOS MOURA

**CONTRIBUIÇÕES AO ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *Corynespora cassicola* COM
SEMENTES DE ALGODÃO E SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Dr. José da Cruz Machado
Orientador

Dra. Carolina da Silva Siqueira
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Moura, Nevenka de Matos.

Contribuições ao estudo da interação de *Corynespora cassiicola* com sementes de algodão e soja / Nevenka de Matos Moura. – 2024.

136 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.

Coorientadora: Carolina Siqueira Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Mancha-alvo. 2. Patologia de sementes. 3. Nível de inóculo. I. Machado, José da Cruz. II. Silva, Carolina Siqueira. III. Título.

NEVENKA DE MATOS MOURA

**CONTRIBUIÇÕES AO ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *Corynespora cassicola* COM
SEMENTES DE ALGODÃO E SOJA**

**CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE INTERACTION OF *Corynespora
cassicola* WITH COTTON AND SOYBEAN SEEDS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 05 de março de 2024.

Dra. Carolina da Silva Siqueira	UFLA
Dra. Antônia dos Reis Figueira	UFLA
Dra. Raquel Maria Oliveira Pires	UFLA
Dra. Mônica Cagnin Martins	UNIFAAHF

Dr. José da Cruz Machado
Orientador

Dra. Carolina Siqueira Silva
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2024**

*Aos meus pais, irmão e demais familiares e amigos, por todo apoio e carinho
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me deu forças para continuar nos momentos mais difíceis desta trajetória.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. José da Cruz Machado pela atenção, orientação, por todo o conhecimento transmitido e confiança durante todos estes anos.

À professora Dra. Carolina Siqueira, pelas risadas, pela amizade, confiança e ensinamentos.

À toda equipe do LAPS, Carol, Iara, Angel, Guilherme e Ananda por toda a amizade, cafés, ensinamentos e por contribuírem para a realização do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

À Ariane Alvarenga, secretária do PPG Agronomia/Fitopatologia, por toda sua paciência, amizade e companheirismo.

Aos amigos que me ajudaram na condução e avaliação dos experimentos, Thamires, Indiara, Guilherme, Ananda, Bárbara, Dilson, Felipe, Gabriella, Jher, Larissa, Letícia, Lorena, Murad, João, Lucas e Neilton.

Aos meus pais, Nando e Tida, meu irmão, Dardo e ao Rodrigo por sempre me motivarem a continuar em busca dos meus sonhos.

Às minhas companheiras de lar, Thamires, Bárbara, Cláudia, Letícia e Carol por todos esses anos de amizade e cumplicidade.

À Larissa e Pedrinho por serem minha família em LEM e sempre estarem comigo nos dias de luta e de glória.

Aos amigos e companheiros de trabalho que conheci na JCO, em especial, Jhef e Djison, que aguentaram meus dias de tensão e ainda foram simpáticos.

Ao meu primo Lucas e às minhas amigas Thamires e Indiara, por nunca terem soltado as minhas mãos e sempre me ajudarem a seguir adiante.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do trabalho.

*“Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime,
pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você
andar”.*

Josué 1:9

RESUMO GERAL

Corynespora cassiicola, agente causal da mancha-alvo em algodão e soja, pode ser transmitido via sementes em diversos hospedeiros. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as relações do referido patógeno com sementes de algodão e soja, com foco na transmissão desses organismos, de sementes para a planta e nos efeitos resultantes dessa interação. Para a determinação da taxa de transmissão e a avaliação dos efeitos de *C. cassiicola* no desempenho das sementes/plântulas de algodão e soja, foram utilizados dois isolados do fungo, sendo a inoculação realizada pelo método de condicionamento hídrico em sementes de uma cultivar de algodão e uma de soja. Para algodão, as sementes foram mantidas sobre as colônias fúngicas por períodos de 36, 72, 108 e 144 horas, equivalentes aos níveis de inóculo do patógeno, estabelecidos para este estudo, com denominações: NI36, NI72, NI108 e NI144, respectivamente. No caso de sementes de soja, as sementes foram mantidas em contato físico com a colônia fúngica pelos períodos de 36, 72 e 108 horas, equivalentes a níveis de inóculo: NI36, NI72 e NI108, sendo adicionado ao experimento um tratamento químico das sementes com o produto (Metalaxil-M + Fludioxonil) nos dois níveis de inóculo: NI72 e NI108. Os experimentos foram desenvolvidos, em câmaras de cultivo vegetal com temperaturas de 20 °C e 25 °C, sendo os efeitos avaliados diariamente. A taxa de transmissão total de cada patógeno foi calculada pelo somatório da taxa de morte em pré-emergência e as taxas de transmissão com infecção sintomática e assintomática. As taxas de transmissão total de *C. cassiicola* foram diretamente proporcionais ao aumento dos níveis de inóculo, para ambos os isolados e temperaturas de cultivo. Em relação aos efeitos fisiológicos, avaliou-se germinação e o vigor (índice de velocidade de emergência), estande inicial e final, altura e o peso de planta fresca e seca, condutividade elétrica e índice de doenças/dano. A sanidade foi avaliada por blotter teste nas sementes inoculadas nos mesmos níveis de inóculo utilizados para avaliar as taxas de transmissão do patógeno. Observou-se que, para as duas culturas em estudo, quanto maior o nível de inóculo inicial nas sementes, maiores foram os efeitos negativos na qualidade das sementes inoculadas e nas plantas oriundas da germinação. Nas plantas provenientes de sementes com nível de inóculo NI144 para algodão e NI108 para soja, ocorreram os mais baixos valores de IVE, estandes, pesos e alturas de plantas. Pelos testes de qualidade das sementes, observou-se que quanto maior os níveis de inóculo, menores foram as porcentagens de plântulas normais pelo teste de germinação, ocorrendo nesses níveis os maiores percentuais de incidências do patógeno nas sementes. Nas sementes infectadas verificou-se avançado processo de degradação dos tecidos destas estruturas pelas análises de condutividade elétrica. Pelas avaliações do desempenho das sementes de soja, quando relacionadas, sementes quimicamente tratadas e não tratadas, o tratamento de sementes mostrou-se eficaz na redução de nível de inóculo. Por meio do uso da técnica de PCR convencional e incubação de fragmentos de tecidos vegetais foi possível demonstrar que plantas assintomáticas podem carregar o patógeno, o qual pode manifestar-se durante o ciclo das culturas em ambiente de cultivo.

Palavras-chave: mancha-alvo; patologia de sementes; nível de inóculo.

GENERAL ABSTRACT

Corynespora cassiicola, the pathogen responsible for target spot in cotton and soybean, can be transmitted to multiple hosts through infected seeds. This study aimed to evaluate the relationship between this pathogen and cotton and soybean seeds, with a focus on seed-to-plant transmission and the resulting effects of this interaction. To determine the transmission rate and assess the effects of *C. cassiicola* on the performance of one cotton cultivar and two soybean cultivars of seeds and seedlings, we used two-isolated fungus and inoculated them using the water conditioning method. For cotton, the seeds were kept on the fungal colonies for 36, 72, 108 and 144 hours, equivalent to the pathogen inoculum levels established for this study, with denominations: NI36, NI72, NI108 and NI144, respectively. For the soybean seeds, we maintained physical contact with the fungal colony for 36, 72, and 108 hours, corresponding to inoculum levels NI36, NI72, and NI108. Additionally, chemical treatment with the product (Metalaxyl-M + Fludioxonil) was applied at two inoculum levels, NI72 and NI108. The experiments were conducted in plant growth chambers at temperatures of 20 °C and 25 °C, with daily evaluations of the effects. The overall transmission rate of each pathogen was determined by summing the pre-emergence mortality rate and the transmission rates for both symptomatic and asymptomatic infections. The total transmission rates of *C. cassiicola* were directly proportional to the inoculum levels, regardless of the isolate or cultivation temperature. Physiological effects were assessed by measuring germination, vigor (emergence speed index), initial and final stand, plant height, fresh and dry weight, electrical conductivity, and disease/damage index. The health was assessed by blotter test on seeds inoculated at the same inoculum levels used to assess pathogen transmission rates. It was observed that for both crops under study, higher initial inoculum levels in the seeds resulted in more pronounced negative effects on the quality of the inoculated seeds and the germinated plants. Plants from seeds with the NI144 inoculum level for cotton and NI108 for soybean exhibited the lowest values of EVI, stands, weights, and plant heights. The seed quality tests showed that higher inoculum levels were associated with a lower percentage of normal seedlings in the germination test, which also corresponded to an increased incidence of the pathogen in the seeds at these levels. Infected seeds exhibited advanced tissue degradation in their structures, as indicated by electrical conductivity analyses. Comparative evaluations of the performance of soybean seeds revealed that chemically treated seeds were effective in reducing the level of the pathogen when compared to untreated seeds. By employing the conventional PCR technique and incubating plant tissue fragments, it was demonstrated that asymptomatic plants can harbor the pathogen, which may become apparent during the crop cycle in a cultivated environment.

Keywords: target spot; seed pathology; inoculum level.

INDICADORES DE IMPACTO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as relações de *C. cassiicola* com sementes de algodão e soja, com foco na transmissão desses organismos, de semente para planta e nos efeitos resultantes dessa interação. A mancha-alvo é uma doença que vem assumindo uma grande importância no Brasil, atingindo níveis preocupantes em cultivos de soja e algodão. Presume-se que a rápida disseminação da doença seja decorrente de uso de sementes portadoras do referido patógeno. Essa situação tornase mais preocupante, considerando-se que não se dispõe, até o momento, de genótipos resistentes à doença. Neste estudo, alguns dos principais fatores que interferem nas relações de patógenos com sementes de seus hospedeiros, como variabilidade genética e fisiológica do patógeno, níveis (potenciais) de inóculo do patógeno nas sementes, temperatura de cultivo e tratamento sanitário de sementes, no caso da soja, foram considerados, tendo se como intuito demonstrar os riscos que os agricultores correm com o uso de sementes de algodão e soja portadoras de *C. cassiicola*, e assim possibilitar a formulação de estratégias de manejo sanitário das sementes, visando ao controle dessas doenças. Importante salientar que os efeitos de *C. cassiicola*, a partir das sementes, foram, em geral, mais severos em soja do que em algodão e esse fato pode ser atribuído, em grande parte, à origem dos isolados utilizados que procederam de isolamentos conduzidos a partir de plantas de soja com sintomas da doença. Além dos efeitos causados no desempenho das sementes, representados por reduções drásticas de germinação e vigor, culminando com reduções de estandes, altura e pesos de plantas, é oportuno ressaltar o papel crucial de sementes infectadas ou contaminadas na disseminação do inóculo entre áreas de cultivo sem limites de distâncias geográficas. Por tratar-se de um organismo necrotrófico com alta capacidade de sobrevivência na ausência de seus hospedeiros percebe-se que o uso de sementes livres de *C. cassiicola* ou em níveis toleráveis, mediante o tratamento de sementes, constitui uma medida das mais eficazes no manejo da doenças em algodão e soja. Uma vez comprovada a ação danosa de *C. cassiicola*, a partir das sementes de espécies hospedeiras, como soja e algodão, uma preocupação para a formulação de estratégia de manejo da mancha-alvo, diz respeito à necessidade de se dispor de métodos adequados de diagnose do patógeno em amostras de sementes dessas culturas, uma vez que o blotter test, apresenta dificuldades para a detecção rápida e mais segura de *C. cassiicola*. O uso de técnicas moleculares, baseadas em análise de DNA por PCR convencional, representa uma ferramenta que deve ser incorporada a esquemas de detecção desse patógeno, em combinação com métodos biológicos. Por outro lado, estudos sobre a eficácia do tratamento de sementes, visando ao controle de *C. cassiicola* presente nas sementes de soja e algodão, tornam-se também prioridade para o manejo dessa doença. Nesse sentido, o foco deve ser voltado tanto para o tratamento químico como para o uso de agentes biológicos, conforme tem sido feito com sucesso em outros patossistemas.

IMPACT INDICATORS

This work was carried out with the objective to evaluate the relationships between *C. cassiicola* and cotton and soybean seeds, focusing on the transmission of this organism from seed to plant and the effects resulting from this interaction. Target spot is a disease that has assumed great importance in Brazil, reaching worrying levels in soybean and cotton crops. It is assumed that the rapid spread of the disease is due to the use of seeds carrying the referred to pathogen. This situation becomes more worrying, considering that, to date, there are no genotypes resistant to the disease. In this study, some of the main factors that interfere in the relationships between pathogens and the seeds of their hosts, such as genetic and physiological variability of the pathogen, inoculum level (potential) of pathogen in the seeds, cultivation temperature and sanitary treatment of seeds, were considered, with the aim of demonstrating the risks that farmers run with the use of cotton and soybean seeds carrying *C. cassiicola*, and thus enabling the formulation of seed health management strategies, to control these diseases. It is important to register that the effects of *C. cassiicola*, from the seeds, were, in general, more severe in soybeans than in cotton and this fact can be attributed, mostly to the origin of the isolates used that came from isolations conducted from soybean plants with symptoms of the disease. In addition to the effects caused on seed performance, represented by drastic reductions in germination and vigor, culminating in reductions in plant stands, height and weight, it is relevant to highlight the crucial role of infected or contaminated seeds in the dissemination of the inoculum between cultivation areas without limits of geographic distances. As it is a necrotrophic organism with a high capacity for survival in the absence of its hosts, it is clear that the use of seeds free of *C. cassiicola* or at tolerable levels, through seed treatment, constitutes one of the most effective measures in management of diseases in cotton and soybeans. Once the harmful action of *C. cassiicola* has been proven, from the seeds of host species, such as soybeans and cotton, a concern for the formulation of a management strategy for the target spot concerns the need to have adequate diagnostic methods of the pathogen in seed samples from these crops, since the blotter test presents difficulties for the rapid and safer detection of *C. cassiicola*. The use of molecular techniques, based on DNA analysis by conventional PCR, represents a tool that should be incorporated into detection schemes for this pathogen, in combination with biological methods. On the other hand, studies on the effectiveness of seed treatment, aiming to control *C. cassiicola* present in soybean and cotton seeds, also become a priority for the management of this disease. In this sense, the focus should be on both chemical and biological treatments, as has been done successfully in other pathosystems.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 - Intensidade de inóculo de *Corynespora cassiicola*, em sementes de algodão com diferentes níveis de inóculo (NI36, NI72, NI108, NI144) dos isolados 1 e 2..... 46
- Figura 2 - Valores percentuais de germinação de sementes de algodão portadoras de diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144) de *C. cassiicola*. A - isolado 1 e B - isolado 2. As comparações referem-se às colunas de mesmas cores. 47
- Figura 3 - Valores médios de condutividade elétrica de exsudatos sementes de algodão portadoras de diferentes níveis de inóculo de *C. cassiicola*. A - isolado 1 e B - isolado 2. 47
- Figura 4 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de algodão inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144) dos isolados 1 e 2 sob a temperatura de cultivo de 20°C. A - isolado 1, 20°C e B - isolado 2, 20°C. 48
- Figura 5 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de algodão inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144) dos isolados 1 e 2 sob a temperatura de cultivo de 25°C. A - isolado 1, 25°C e B - isolado 2, 25°C. 49
- Figura 6 - Estande inicial de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado 1, em cinco níveis de inóculo NI0, NI36, NI72, NI108, NI144, mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e B – isolado 1, 25°C. 49
- Figura 7 - Estande inicial de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado 2, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C..... 50
- Figura 8 - Estande final de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado (1), em cinco níveis de inoculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e B – isolado 1, 25°C..... 50

Figura 9 - Estande final de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> isolado (2), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.	51
Figura 10 - Altura de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> isolado (1), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e B – isolado 1, 25°C.	51
Figura 11 - Altura de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> isolado (2), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.	52
Figura 12 - Peso fresco de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> isolado 1, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e isolado 1, 25°C.	52
Figura 13 - Peso de plantas frescas de algodão emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> isolado 2, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.	53
Figura 14 - Peso de plantas secas de algodão emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> isolado 1, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e B – isolado 1, 25°C.	53
Figura 15 - Peso seco de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> isolado 2, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.	54
Figura 16 - Índice de Dano/Doença em plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com cinco níveis de inóculo de <i>Corynespora cassiicola</i> , isolados 1 e 2, com cultivo sob temperaturas de a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 e 25°C e B – isolado 2, 20 e 25°C.	55

ARTIGO 2

- Figura 1 - Percentual de morte de sementes/plântulas de algodão em pré-emergência, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108 e NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C)..... 69
- Figura 2 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes à progênie com formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108, NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C). 70
- Figura 3 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes para plantas assintomáticas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108, NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C). 70
- Figura 4 - Incidência de *Corynespora cassiicola* em plantas assintomáticas, seccionadas em: colo (C) e inserção foliar (IF), em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108, NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C). 71
- Figura 5 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108, NI144), por meio a técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. 72
- Figura 6 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, por meio da técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. (A) MM- Marcador molecular, CP- Controle positivo e CN- Controle negativo; (B) Isolado 1, 20°C; (C) Isolado 2, 20°C; (D) Isolado 1, 25°C; (E) Isolado 2, 25°C..... 72
- Figura 7 - Taxa de transmissão total de *C. cassiicola*, relativa ao somatório de sementes/plântulas com morte em pré-emergência, plantas sintomáticas e assintomáticas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108, NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C). 73

ARTIGO 3

- Figura 1 - Intensidade de inóculo de *Corynespora cassiicola*, em sementes de soja inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI36, NI72, NI108) dos isolados 1 e 2. A - isolado 1 e B - isolado 2. Parte das sementes de NI72 e NI108 foram tratadas com fungicidas (TS). 88
- Figura 2 - Valores médios de percentuais de plantas normais, anormais e mortas observadas pelo teste de germinação de soja inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) dos isolados 1 e 2. Plantas normais: A – Isolado 1 e B – isolado 2. Plantas anormais: C - Isolado 1 e D – Isolado 2. Sementes mortas: E – Isolado 1 e F – Isolado 2. 89
- Figura 3 - Valores percentuais de germinação de sementes de soja inoculadas (NI72 e NI108) tratadas e não tratadas dos isolados 1 e 2. NI72: Plantas normais: A – Isolado 1 e B – isolado 2. Plantas anormais: C - Isolado 1 e D – Isolado 2. Sementes mortas: E – Isolado 1 e F – Isolado 2. NI108: Plantas normais: G – Isolado 1 e H – isolado 2. Plantas anormais: I – Isolado 1 e J – Isolado 2. Sementes mortas: J – Isolado 1 e L – Isolado 2. 90
- Figura 4 - Valores médios de condutividade elétrica ($\mu\text{S. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) de exsudatos de sementes de soja inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) dos isolados 1 e 2. A - isolado 1 e B - isolado 2. 92
- Figura 5 - Valores médios de condutividade elétrica ($\mu\text{S. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) de exsudatos de sementes de soja inoculadas (NI72 e NI108) tratadas e não tratadas dos isolados 1 e 2. NI72: A – isolado 1 e B – isolado 2. NI108: C – isolado 1 e D – isolado 2. 92
- Figura 6 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de soja inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72 e NI108) dos isolados 1 e 2 sob as temperaturas de cultivo de 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. 93
- Figura 7 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de soja inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C. 94

- Figura 8 - Estande inicial de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25°C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. 95
- Figura 9 - Estande inicial de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C. 96
- Figura 10 - Estande final de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2) em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) e mantidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20°C; C – isolado 1, 25 °C e D – isolado 2, 25 °C. 97
- Figura 11 - Estande final de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C. 97
- Figura 12 - Altura de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25°C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. 99
- Figura 13 - Altura de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C. 99
- Figura 14 - Peso de plantas frescas de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em quatro níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72 e NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25°C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. 101

Figura 15 - Peso de plantas frescas de soja emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.	102
Figura 16 - Peso de plantas secas de soja emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> (isolados 1 e 2) em quatro níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72 e NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25°C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C.	103
Figura 17 - Peso de plantas secas de soja emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.	103
Figura 18 - Índice de doenças/dano em plantas soja emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> (isolados 1 e 2), em quatro níveis de inóculo (NI36, NI72 e NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolados 1 e 2, 20 °C e B – isolados 1 e 2, 25 °C.	105
Figura 19 - Índice de doenças/dano em plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com <i>Corynespora cassiicola</i> (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.	106

ARTIGO 4

Figura 1 - Percentual de morte de sementes/plântulas de soja em pré-emergência, causada pelo fungo <i>Corynespora cassiicola</i> , em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108) e duas temperaturas (20 e 25°C).....	120
--	-----

Figura 2 - Percentual de morte de sementes/plântulas de soja em pré-emergência, causada pelo fungo <i>Corynespora cassiicola</i> , em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo nas sementes (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas em cultivos a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C; D – isolado 2, 25 °C.	121
Figura 3 - Taxa de transmissão de <i>Corynespora cassiicola</i> de sementes à progênie com formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).	122
Figura 4 - Taxa de transmissão de <i>Corynespora cassiicola</i> de sementes à progênie com formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20 °C; C – isolado 1, 25 °C; D – isolado 2, 25 °C.	122
Figura 5 - Taxa de transmissão de <i>Corynespora cassiicola</i> de sementes à progênie sem formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).	123
Figura 6 - Taxa de transmissão de <i>Corynespora cassiicola</i> de sementes à progênie sem formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20 °C; C – isolado 1, 25 °C; D – isolado 2, 25 °C.	124
Figura 7 - Incidência de <i>Corynespora cassiicola</i> em plantas assintomáticas, seccionadas em: colo (C) e inserção foliar (IF), em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).	125
Figura 8 - Incidência de <i>Corynespora cassiicola</i> em plantas assintomáticas, seccionadas em: colo (C) e inserção foliar (IF), em relação a dois isolados (1 e 2),), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – NI72; B – NI108.	125
Figura 9 - Detecção dos isolados 1 e 2 de <i>Corynespora cassiicola</i> , em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108), por meio a técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C.	126

- Figura 10 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), por meio da técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C..... 127
- Figura 11 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, por meio a técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. (A) MM- Marcador molecular, CP- Controle positivo e CN- Controle negativo; Sem tratamento químico de sementes: (B) Isolado 1, 20°C; (C) Isolado 2, 20°C; (D) Isolado 1, 25°C; (E) Isolado 2, 25°C. Com tratamento químico de sementes: (F) Isolado 1, 20°C; (G) Isolado 2, 20°C; (H) Isolado 1, 25°C; (I) Isolado 2, 25°C..... 128
- Figura 12 - Taxa de transmissão total de *C. cassiicola*, relativa ao somatório de sementes/plântulas com morte em pré-emergência, plantas sintomáticas e assintomáticas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C..... 128
- Figura 13 - Taxa de transmissão total de *C. cassiicola*, relativa ao somatório de sementes/plântulas com morte em pré-emergência, plantas sintomáticas e assintomáticas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20 °C; C – isolado 1, 25 °C; D – isolado 2, 25 °C..... 129

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	22
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1	Aspectos gerais das culturas do algodão e da soja	24
2.2	Aspectos gerais da mancha-alvo do algodão e soja, causada por <i>Corynespora cassiicola</i>	26
2.3	Deteção, transmissão pelas sementes e controle de <i>C. cassiicola</i>	28
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	37
	ARTIGO 1 - EFEITOS DE <i>Corynespora cassiicola</i> EM ASSOCIAÇÃO COM SEMENTES DE ALGODÃO	37
1	INTRODUÇÃO	39
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1	Origem e multiplicação dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> e perfil das sementes utilizadas	41
2.2	Inoculação de sementes com <i>C. cassiicola</i>	41
2.3	Avaliação da incidência, intensidade (nível) de inóculo e efeitos de <i>C. cassiicola</i> na germinação e vigor das sementes em laboratório e no desempenho das sementes sob condições controladas de cultivo.....	42
2.3.1	Teste de sanidade	42
2.3.2	Teste de germinação das sementes.....	43
2.3.3	Teste de vigor (condutividade elétrica – CE).....	43
2.4	Testes de emergência em condições controladas	43
2.4.1	Avaliação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE).....	44
2.4.2	Avaliação de estande inicial e estande final	44
2.4.3	Avaliação da altura de plantas.....	44
2.4.4	Avaliação da massa de planta fresca e seca	44
2.4.5	Avaliação do índice de doenças/dano	45
2.5	Análises estatísticas	45
3	RESULTADOS.....	46
3.1	Incidência e intensidade (nível) de inóculo de <i>C. cassiicola</i> e efeitos do fungo na qualidade fisiológica das sementes de algodão	46
3.2	Efeitos de <i>C. cassiicola</i> no desenvolvimento inicial das plantas de algodão em ambiente de cultivo controlado a partir de sementes inoculadas	48
4	DISCUSSÃO.....	56
5	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	ARTIGO 2 - POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE <i>Corynespora cassiicola</i> A PARTIR DE SUA ASSOCIAÇÃO COM SEMENTES DE ALGODÃO	61
1	INTRODUÇÃO	63
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1	Origem e multiplicação dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> , perfil das sementes utilizadas, inoculação de sementes e teste de sanidade.....	65
2.2	Inoculação das sementes	65
2.3	Teste de sanidade	66
2.4	Avaliação da transmissão de <i>Corynespora cassiicola</i> em câmara de cultivo vegetal.....	66

2.5	Detecção de <i>C. cassiicola</i> em plantas assintomáticas por meio da técnica PCR convencional	67
2.5.1	Extração de DNA.....	67
2.5.2	PCR convencional	68
2.6	Análises estatísticas	68
3	RESULTADOS.....	69
4	DISCUSSÃO.....	74
5	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	ARTIGO 3 - EFEITOS DE <i>Corynespora cassiicola</i> NO DESEMPENHO DE SEMENTES DE SOJA TRATADAS E NÃO TRATADAS COM FUNGICIDAS QUÍMICOS	79
1	INTRODUÇÃO	81
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	83
2.1	Origem e multiplicação dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> e perfil das sementes utilizadas	83
2.2	Inoculação de sementes.....	83
2.3	Avaliação da incidência, intensidade (nível) de inóculo e efeitos de <i>Corynespora cassiicola</i> na germinação e vigor das sementes em laboratório e no desempenho das sementes sob condições controladas de cultivo	84
2.3.1	Teste de sanidade	84
2.3.2	Teste de germinação em rolo de papel	85
2.3.3	Teste de vigor (condutividade elétrica – CE).....	85
2.4	Testes de emergência em condições controladas.....	85
2.4.1	Avaliação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE).....	86
2.4.2	Avaliação de estande inicial e estande final.....	86
2.4.3	Avaliação da altura de plantas.....	86
2.4.4	Avaliação de massa de planta fresca e seca	86
2.4.5	Avaliação do índice de doenças/dano	87
2.5	Análises estatísticas dos dados	87
3	RESULTADOS.....	88
3.1	Incidência e intensidade de inóculo de <i>C. cassiicola</i> e qualidade fisiológica das sementes de soja.....	88
3.2	Efeitos de <i>C. cassiicola</i> no desenvolvimento inicial de soja, a partir de sementes inoculadas, com cultivo em condições controladas.....	93
4	DISCUSSÃO.....	107
5	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110
	ARTIGO 4 - TRANSMISSIBILIDADE DE <i>Corynespora cassiicola</i> EM SEMENTES DE SOJA TRATADAS E NÃO TRATADAS COM FUNGICIDAS QUÍMICOS	112
1	INTRODUÇÃO	114
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	116
2.1	Origem e multiplicação dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> , perfil das sementes utilizadas, inoculação de sementes e teste de sanidade.....	116
2.2	Inoculação das sementes	116
2.3	Teste de sanidade	117
2.4	Avaliação da transmissão de <i>Corynespora cassiicola</i> em câmara de cultivo vegetal.....	117

2.5	Detecção de <i>C. cassicola</i> em fragmentos de plantas assintomáticas por meio da técnica PCR convencional	118
2.5.1	Extração do DNA	118
2.5.2	PCR convencional	118
2.6	Análises estatísticas	119
3	RESULTADOS.....	120
4	DISCUSSÃO.....	130
5	CONCLUSÃO	132
	REFERÊNCIAS	133
	CONSIDERAÇÕES GERAIS	135

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país que tem apresentado um constante crescimento da produção agrícola, havendo estimativa de aumento de 27% da produção de grãos até o final da presente década (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2020). Essa informação pode ser avaliada sob diferentes ângulos, com base em expectativas positivas e também com certa preocupação, considerando-se os aspectos de sustentabilidade e os riscos imediatos que esse aumento representa para os agricultores e sistema agrícola em geral, podendo causar diversos problemas fitossanitários e resistência de patógenos a seus hospedeiros.

O aumento da produção agrícola somente tem sido possível, por meio do uso de tecnologias inovadoras, como a introdução de novos materiais vegetais melhorados, adoção do sistema de manejo cultural e uso de sementes certificadas, entre outras.

Para o cultivo da soja e algodão, entre outras culturas, a qualidade das sementes constitui matéria básica para a produção de alimentos e derivados, uma vez que são veículos das informações genéticas responsáveis pelas características agronômicas dos materiais utilizados pelos agricultores, em seus cultivos, sendo ponto-chave para o sucesso desses empreendimentos na cadeia agrícola.

Importante ressaltar que a cadeia de produção agrícola é extremamente dependente da qualidade sanitária das sementes, por essas serem estruturas vulneráveis ao abrigo de patógenos, que causam doenças de grande importância econômica, além de serem veículos de disseminação de doenças entre lavouras e entre regiões a longas distâncias (Machado, 1994; Machado; Pozza, 2005; Neergaard, 1979).

Com o avanço das áreas de cultivo no cerrado brasileiro, principalmente em estados como Mato Grosso do Sul, Bahia, Goiás e Minas Gerais, pela pressão gerada para a produção de maiores volumes de grãos, os riscos de introdução e estabelecimento de doenças de natureza epidêmica são preocupantes, e isso coloca em risco todo o potencial produtivo dessas regiões, havendo constatações que a mancha-alvo vêm ganhando importância, nas regiões produtoras de algodão e soja, em função da sucessão de cultivo entre eles.

Com base em metodologias desenvolvidas, para estudos das relações de patógenos com sementes, nos últimos tempos, tem sido possível obter avanços expressivos no entendimento desses tipos de interações para muitos patossistemas. O desenvolvimento da técnica de infecção artificial de sementes, por meio do condicionamento hídrico em condições de laboratório, pode

ser considerado como um dos marcos para diversos estudos em Patologia de Sementes (Machado *et al.*, 2001a, 2001b). Adicionalmente, no que tange às pesquisas de detecção de patógenos, em sementes por métodos moleculares, tem sido possível até o momento checar e ajustar alguns protocolos já conhecidos na literatura para alguns fungos de difícil identificação por métodos culturais.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo central contribuir com os estudos sobre relações de *C. cassicola* com sementes de algodão e soja com foco voltado para a determinação da taxa de transmissão e desempenho das sementes inoculadas artificialmente com o referido patógeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais das culturas do algodão e da soja

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma planta fibrosa que tem seu centro de origem no México, sendo atualmente cultivada em grande parte do mundo. O Brasil é o segundo maior exportador mundial de algodão e o terceiro maior produtor mundial, situando-se apenas atrás da Índia, China (United States Department of Agriculture - USDA, 2023). Segundo dados divulgados pela CONAB, no 8º Levantamento - Safra 2022/23 em maio de 2023, a área plantada com algodão, no Brasil na referida safra, foi de 2 milhões de hectares com produção aproximada de 3 milhões de toneladas. Hoje em dia o Brasil contribui com 10,9% da produção mundial, mas estima-se que essa produção deverá aumentar para 12,5% em 2030 (Dohlman; Hansen; Boussios, 2022).

Os estados do Mato Grosso e Bahia foram responsáveis por 89,9 da produção de algodão no Brasil, na safra 2022/23, entretanto o Mato Grosso ocupa a primeira posição com 69,5% e a Bahia com 20,4% da produção (Brasil, 2023b). Esses estados abrigam as maiores áreas produtoras do algodão no Brasil pelas suas condições favoráveis ao cultivo dessa espécie e pelo alto investimento em tecnologia empregado nessas lavouras. A produção de algodão no Brasil está em constante crescimento, contando com alta demanda, especialmente no setor têxtil, tanto para importação quanto para exportação.

O algodão é uma planta cultivada com múltiplas finalidades, como produção de fibra, óleo e farinha, para a alimentação animal (Constable; Bange, 2015), sendo considerado como uma das melhores fontes de proteína e a quinta maior oleaginosa, ficando atrás somente da soja, palma, canola e girassol (Ashraf, 2002; Sawan *et al.*, 2006).

Sementes de algodão, além de serem usadas na propagação da espécie, são utilizadas na alimentação humana e animal (Bertrand *et al.*, 2005; Elangovan *et al.*, 2006). As sementes são uma boa fonte de óleo (18-25%) e 20-25% de proteína (Saxena; Sharma; Sambhi, 2011). Segundo Zia *et al.* (2022), existe uma diferença na produção de óleo de caroço de algodão entre países, fazendo com que a venda desse produto nessa forma aumente no mercado internacional.

O ciclo do algodoeiro pode durar até 220 dias dependendo da cultivar e de fatores bióticos e abióticos. O algodão é uma planta perene cultivada como cultura anual em áreas tropicais e subtropicais por suas fibras e suas características oleaginosas (Deguine; Ferron; Russell, 2008).

No Brasil, as doenças que acometem a cultura do algodoeiro têm como agentes causais membros pertencentes aos grupos de fungos, bactérias, vírus e nematoides (Natália *et al.*, 2022), os quais, dependendo das condições predominantes nas regiões de cultivo, podem causar prejuízos dos mais significativos para os produtores em geral.

Alguns patógenos podem estar associados às sementes, o que, muitas vezes, tornam-nas fontes de inóculo para transmissão e disseminação das doenças. Entre as doenças que acometem a cultura do algodão e que mantêm uma relação com as sementes dessa cultura, podem ser destacadas: Murcha de fusarium (Ag. c. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), Tombamento (Ag. c. *Rhizoctonia solani*), Antracnose (Ag. c. *Colletotrichum gossypii*); Ramulose (Ag. c. *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), Mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*. Alguns desses patógenos fazem parte de complexos de fungos de solo e sementes e podem ocorrer separadamente ou em conjunto (Chitarra; Goulart; Zorato, 2009; Menten *et al.*, 2005; Tanaka, 1995).

Em relação à cultura da soja (*Glycine Max* (L.) Merrill), trata-se de uma espécie oleaginosa que tem seu centro de origem na Ásia e que, na atualidade, é uma das culturas mais importantes em todo o mundo. No Brasil, o cultivo de soja ocupa uma área de quase 45 milhões de hectares, com produção de 154 milhões de toneladas, na safra 2022/23 (Brasil, 2023a), o que leva o país à condição de maior produtor mundial da cultura (Brasil, 2023a; Embrapa, 2023). A exemplo do que acontece com o algodão, o estado do Mato Grosso também figura como o maior produtor de soja no Brasil, com recordes de produtividade (Brasil, 2023a).

A produção de grãos de soja no Brasil vem aumentando a cada safra, sendo as medidas integradas de manejo, com destaque para aspectos nutricionais e sanitários, responsáveis por esses resultados (Krzyzanowski *et al.*, 2008). É (a soja) uma importante fonte de proteínas e possui alto teor de aminoácidos essenciais ao corpo humano (Pollnow *et al.*, 2020; Saraiva; Melo, 2020). Grãos de soja são utilizados, para diversas finalidades, sendo mais direcionados à produção de óleo vegetal e de ração animal, além de seu consumo para nutrição humana, que vem sendo crescente pelos benefícios que proporcionam à saúde humana e animal.

Conforme destacado anteriormente para a cultura do algodão, a qualidade sanitária das sementes de soja também pode se tornar um fator limitante na produção agrícola, pois elas podem servir de veículo para patógenos importantes, em virtude de seu alto potencial de interferir negativamente na produção e produtividade da lavoura (Machado, 1994; Machado; Pozza, 2005; Neergaard, 1979).

Diversos fitopatógenos podem se associar à cultura da soja, principalmente os do grupo dos fungos e causar prejuízos tanto no rendimento quanto na qualidade das sementes

produzidas. A ocorrência de fungos em sementes de soja tem sido registrada em diversos países. No Brasil, os fungos fitopatogênicos de maior relevância, em associação com sementes nessa cultura, são *Phomopsis sojae*, *Diaphorte meridionalis*, *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii*, *C. sojae*, *Fusarium pallidoroseum* (ex *Fus. semitectum*), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Corynespora cassiicola*, *Peronospora manshurica*, *Aspergillus flavus* e *Rhizoctonia solani*, entre outros. Para alguns desses organismos, tais como *Phomopsis sojae*, *C. truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, já existe um expressivo número de informações sobre a sua relação biológica e parasitaria com sementes de soja (Botelho *et al.*, 2015; Silva Júnior *et al.*, 2020; Wain-Tassi *et al.*, 2012).

2.2 Aspectos gerais da mancha-alvo do algodão e soja, causada por *Corynespora cassiicola*

O gênero *Corynespora* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, subclasse Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales e família Corynesporascaceae (Robert; Stegehuis; Stalpers, 2005). A espécie *C. cassiicola* se caracteriza pela produção de conidióforos eretos, ramificados, com até 20 septos, de coloração marrom. Os conídios emergidos apresentam-se isolados ou em cadeia de dois a seis, cor parda, dilatados na base, retos ou ligeiramente curvos, com 3 a 20 septos (Ellis; Holliday, 1971; Rinzo; Kitazawa, 1980; Snow; Berggren, 1989). É um fungo necrotrófico, que sobrevive nas sementes, restos culturais em decomposição e em plantas daninhas, pertencendo ao grupo V de McNew (Almeida *et al.*, 2005) e apresentando ainda a habilidade de sobreviver em restos culturais (Chun-Xia *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2018).

C. cassiicola é um fungo fitopatogênico, causador da mancha-alvo do algodoeiro, que pode ocupar uma ampla variedade de habitats, tendo como hospedeiros mais de 400 espécies de plantas (Carris; Glawe; Gray, 1986; Dixon *et al.*, 2009; Farr; Rossman, 2020). Pode causar sintomas em folhas, caules, raízes, flores e frutos de seus hospedeiros e é encontrado em mais de 70 países (Farr; Rossman, 2020).

Como já mencionado anteriormente, esse fungo pode infectar espécies de plantas importantes economicamente, como soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium hirsutum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), espécies de cucurbitáceas, como pepino (*Cucumis sativus*) e melancia (*Citrullus vulgaris*) (Lopes; Reis, 2011; Mehta; Motomura; Almeida, 2005; Olive; Bain; Lefebvre, 1945; Teramoto; Cavalcante; Cunha, 2006),

além de plantas invasoras, como trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e assa-peixe (*Vernonia cinerea*) (Malvick, 2004; Souza; Silva, 2001).

Em razão da ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica, Ellis e Holliday (1971) consideram *C. cassiicola* como uma espécie cosmopolita e inespecífica. Por esse motivo, é considerado como um fitopatógeno universal, causador de grandes perdas econômicas em vários países. A mancha-alvo foi relatada no algodoeiro pela primeira vez nos EUA, em 1959 (Jones, 1961) e, desde então, tem sido relatada, com frequência, nesse país (Conner; Hagan; Zhang, 2013; Fulmer *et al.*, 2012), China (Wei *et al.*, 2014) e no Brasil (Dias; Souza; Theodoro, 2016).

O fungo é encontrado em praticamente todas as regiões de cultivo do algodão do Brasil (Galbieri *et al.*, 2014; Teramoto *et al.*, 2013). De acordo com os dados da literatura, a sobrevivência do referido agente, em restos de cultura e sementes contaminadas/infectadas, pode ser favorecida por temperaturas abaixo de 30°C e longos períodos de alta umidade relativa.

Em geral, a sintomatologia inicial da doença se caracteriza por pequenas manchas nas folhas com coloração parda e envoltas por halo amarelado. No decorrer do tempo, as lesões evoluem, tornando-se grandes manchas circulares de cor castanha, podendo ainda levar à queda das folhas infectadas (Bowen *et al.*, 2018). Similarmente, os sintomas em plantas de soja são caracterizados inicialmente por pontuações escuras, com halo amarelado, que se expandem com a evolução da doença; os halos amarelos tornam-se castanhos claros nos estágios mais avançados da infecção (Yorinori; Gazziero, 2012). O fungo pode infectar raízes, causando podridão radicular (Conner; Hagan; Zhang, 2013; Henning *et al.*, 2005; Soares; Godoy; Oliveira, 2009).

No Brasil o fungo foi relatado pela primeira vez, em 1974, em lavouras de soja do estado do Mato Grosso (KIIHL) e, posteriormente, foi identificado por Almeida e Yamashita (1976) no estado de São Paulo. O patógeno pode ocorrer tanto no estágio vegetativo quanto no reprodutivo, em condições favoráveis para o seu desenvolvimento, ou seja, em temperaturas na faixa de 20 a 30°C e umidade relativa acima de 80% (Agrios, 2005).

O entendimento da associação entre *C. cassiicola* e sementes de soja, que ainda é pouco conclusivo, é de suma importância, visto que as sementes têm sido nesse e em outros casos referenciadas como um fator relevante, responsável pela introdução e disseminação de doenças, entre regiões produtoras, causando redução no rendimento das lavouras e na qualidade do produto final (Godoy *et al.*, 2013; Koenning; Creswell, 2006; Panique, 2007).

Em estudos realizados por Galbieri *et al.* (2014), confirmou-se que isolados de *C. cassiicola*, obtidos de plantas de soja, são patogênicos ao algodão e isolados obtidos de plantas

de algodão são patogênicos à soja, evidenciando assim a problemática em relação à sucessão de cultivo dessas culturas. A disseminação do patógeno, em populações de espécies hospedeiras, ocorre por meio de gotas de chuva, restos culturais e sucessão de culturas.

Até o momento não há estudos que demonstrem com segurança a verdadeira relação do referido patógeno com sementes de soja e algodão. O fato de não se ter relatos de existência de cultivares resistentes à mancha-alvo da soja e do algodoeiro (Galbieri *et al.*, 2014) faz com os agricultores utilizem sementes livres desse patógeno.

2.3 Detecção, transmissão pelas sementes e controle de *C. cassiicola*

A diagnose e a detecção segura de patógenos como *C. cassiicola*, em sementes de espécies hospedeiras, vêm se tornando cada vez mais importantes, principalmente considerando se os riscos que os agricultores correm, ao utilizarem sementes portadoras desse tipo de patógeno. No caso da associação de fungos com sementes, a detecção desses agentes nesse material, deve obedecer aos procedimentos recomendados por regras estabelecidas pela International Seed Testing Association (ISTA, 1976) ou às regras existentes em cada país, como no caso do Brasil, que segue o Manual de Análise Sanitária de Sementes (Brasil, 2009), disponibilizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os testes de sanidade sugeridos são, em sua maioria, baseados em procedimentos que favorecem a manifestação dos agentes, por meio de suas estruturas típicas ou, em alguns casos, pela observação de indicadores indiretos como certos metabólitos que permitam a caracterização e a identificação desses patógenos.

Em especial, para a detecção do agente da mancha-alvo em sementes de soja e algodão, não existem metodologias específicas até o momento. Por analogia a outros fungos necrotróficos com posições taxonômicas afins, a recomendação é o uso de métodos culturais ou biológicos, como o blotter test, cuja eficácia para o caso de *Corynespora cassiicola* é ainda questionável.

O uso de técnicas moleculares, mais especificamente PCR convencional, tem sido aplicado a vários grupos de microrganismos para sua identificação precisa e mais rápida. Em um estudo conduzido por Sousa, Siqueira e Machado (2016), usando a técnica de PCR convencional, foi possível detectar *C. cassiicola* em sementes de soja inoculadas artificialmente com esse patógeno (Machado *et al.*, 2012).

A transmissão de *C. cassiicola* das sementes a plântulas de soja foi alvo mais recente de estudos conduzidos por Goulart e Utiamada (2020), em que se constatou, em sementes

inoculadas artificialmente, uma incidência do patógeno de 66% e 42% de transmissão sintomática, baseada em sintomas da doença em cotilédones, o que representa uma taxa de transmissão de 2,4:1. Neste trabalho, os autores não avaliaram a transmissão de sementes a plantas assintomáticas. Caso esse tipo de avaliação tivesse sido considerado, a taxa de transmissão do patógeno das sementes para as plantas seria provavelmente mais elevada. Até o momento não existem estudos de transmissão de *C. cassiicola* em relação a sementes de algodão.

A confirmação da possibilidade de infecção cruzada entre isolados de *C. cassiicola* oriundos de algodão e soja é uma informação relevante para o entendimento da epidemiologia da doença, principalmente, visando à redução do inóculo inicial, visto que as duas culturas são amplamente cultivadas no Cerrado brasileiro e em outras regiões (Souza, 2017; Sumabat; Kemerait; Brewer, 2018).

Pouco se conhece sobre o controle/manejo da mancha-alvo em soja e algodão de forma concreta. Avaliações de resistência de material genético de soja a essa doença têm revelado que existem materiais que apresentam reações diferenciadas ao referido patógeno. As cultivares menos suscetíveis foram BRSGO 7960 e BRS Sambaíba e as mais suscetíveis: BMX Potência RR e M-SOY 7908 RR. As cultivares menos suscetíveis em campo foram M-SOY 8866, M-SOY 7908 RR e BMX Potência RR e as mais suscetíveis foram BRSGO 8360 e BRS Tracajá (Teramoto *et al.*, 2013).

As cultivares de algodão FMT 701, FM 975 e FM 944 foram testadas quanto à severidade de mancha-alvo, utilizando-se três tratamentos com fungicidas, em aplicações sequenciais de distintos fungicidas dos grupos triazol, estrobilurina e carboxamida. A menor suscetibilidade à mancha-alvo foi apresentada pela cultivar FM 944 (Souza, 2017).

Com a elevada capacidade de sobrevivência de *C. cassiicola* em restos culturais por um período de até dois anos (Chun-Xia *et al.*, 2010; Kurosawa; Pavan; Rezende, 2005; Lopez *et al.*, 2018), faz-se necessária a eliminação de soqueiras de plantas susceptíveis e destruição dos restos culturais, além da rotação de culturas com plantas não hospedeiras do patógeno. Uma menor densidade de plantas é uma medida a ser adotada, uma vez que plantas adensadas proporcionam altas umidades nos cultivos, o que favorece o desenvolvimento da doença (Zambolim, 2023).

A aplicação de fungicidas na parte aérea da planta e o uso de sementes sadias e tratadas são métodos reconhecidos como eficazes para o controle químico da referida doença. Até o momento, existem 132 produtos registrados para o controle da mancha-alvo em soja e 14 produtos para o controle da doença em algodão. No que tange ao controle biológico, atualmente,

há nove produtos registrados, para o controle da doença, sendo esses compostos por diferentes microrganismos como *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. velezensis* (Agrofit, 2023). Em relação ao controle químico da mancha-alvo, observa-se que, nos últimos anos, surgiram isolados de *C. cassicola* resistentes a grupos desses produtos, levando a um aumento progressivo da doença e, assim, gerando perdas significativas aos produtores (Godoy *et al.*, 2023).

O manejo integrado de moléculas químicas com agentes biológicos e rotação de culturas têm sido uma estratégia eficaz empregada pelos produtores de soja e algodão, tendo em vista a inexistência de cultivares resistentes a esse patógeno (Avozani *et al.*, 2022; Galbieri *et al.*, 2014; Hiremath *et al.*, 2023).

A ampla gama de hospedeiros de *C. cassicola* e a diversidade genética (Dixon *et al.*, 2009) dos isolados são um fator determinante para ser melhor compreendido, pois o patógeno não apresenta especificidade, em relação aos hospedeiros, uma vez que isolados obtidos, a partir de plantas de soja sintomáticas, também, expressaram sintomas quando testados em algodão e vice-versa.

Em razão de um aumento expressivo do ataque da mancha-alvo em lavouras de soja e algodão, nos últimos anos no Brasil, percebe-se que o controle químico praticado pelo uso de fungicidas, em pulverizações em cultivos em desenvolvimento, tem sido a principal medida de controle dessa doença. Como resultado do uso sistemático de algumas moléculas com mecanismos de ação únicos, tem-se observado o surgimento de resistência por isolados de *C. cassicola* a esses princípios ativos, o que constitui mais uma grande preocupação e um enorme desafio à pesquisa a partir dessas constatações (Rondon; Lawrence, 2021). Entende-se que novos métodos de combate e de prevenção da doença têm que ser desenvolvidos com a urgência que esse desafio impõe às condições brasileiras. Nesse sentido, é preciso que medidas de controle devam ser aplicadas não só na fase de cultivo, mas também na fase de pré-plantio. Nesse contexto, o uso de sementes livres do patógeno ou devidamente tratadas com agentes biocidas que atingem o patógeno associado às sementes pode ser uma poderosa ferramenta no controle da doença em foco. O entendimento da relação semente-patógeno torna-se fundamental para o sucesso destas medidas de controle da mancha-alvo em ambos os hospedeiros, soja e algodão.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic, 2005. 948 p.
- AGROFIT. **Agrofit 2023**. Disponível em:
https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 12 jan. 2023.
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* (org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2.
- ALMEIDA, A. M. R.; YAMASHITA, J. Crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt) Wei em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 1, n. 1, p. 203-206, 1976.
- ASHRAF, M. Salt tolerance of cotton: some new advances. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Abingdon, v. 21, n. 1, p. 1-30, 2002.
- AVOZANI, A. *et al.* Biological control of *Corynespora cassiicola* and *Drechslera tritici-repentis*. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 9, n. 4, p. e7111-e7111, 2022.
- BERTRAND, J. A. *et al.* Nutrient content of whole cottonseed. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 1470-1477, 2005.
- BOTELHO, L. D. S. *et al.* Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 55-62, 2015.
- BOWEN, K. L. *et al.* Epidemics and yield losses due to *Corynespora cassiicola* on cotton. **Plant Disease**, Quebec, v. 102, n. 12, p. 2494-2499, 2018.
- BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileiro: grãos: décimo primeiro levantamento, agosto 2023: safra 2022/2023**. Brasília, DF: Conab, 2023a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 365 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio**. Brasília, DF: MAPA, 2023b.
- CARRIS, L. M.; GLAWE, D. A.; GRAY, L. E. Isolation of the Soya bean pathogens *Corynespora cassiicola* and *Phialophora gregata* from cysts of *Heterodera glycines* in Illinois. **Mycologia**, New York, v. 78, p. 503-506, 1986.
- CHITARRA, L. G.; GOULART, A. C. P.; ZORATO, M. F. Tratamento de sementes de algodoeiro com fungicidas no controle de patógenos causadores de tombamento de plântulas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 31, n. 1, p. 168-176, 2009.

- CHUN-XIA, Z. *et al.* Biological characteristics of *Corynespora cassiicola* causing *Corynespora* leaf fall disease. **Plant Protection**, Kuala Lumpur, v. 36, n. 2, p. 98-101, 2010.
- CONNER, K. N.; HAGAN, A. K.; ZHANG, L. First report of *Corynespora cassiicola* incited target spot on cotton in Alabama. **Plant Disease**, Quebec, v. 97, n. 10, p. 1379-1379, 2013.
- CONSTABLE, G. A.; BANGE, M. P. The yield potential of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 182, p. 98-106, 2015.
- DEGUINE, J. P.; FERRON, P.; RUSSELL, D. Sustainable pest management for cotton production: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 28, p. 113-137, 2008.
- DIAS, A. R.; SOUZA, H. M.; THEODORO, G. F. Mancha alvo em algodão. **Revista Cultivar: grandes culturas**, Pelotas, v. 17, n. 202, p. 18-21, 2016.
- DIXON, L. J. *et al.* Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 9, p. 1015-1027, 2009.
- DOHLMAN, E.; HANSEN, J.; BOUSSIOS, D. **USDA agricultural projections to 2031**. New York: USDA, 2022.
- ELANGO VAN, A. V. *et al.* GMO (Bt-Cry1Ac gene) cotton seed meal is similar to non-GMO low free gossypol cottonseed meal for growth performance in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 252-263, 2006.
- ELLIS, M. B.; HOLLIDAY, P. ***Corynespora cassiicola*: descriptions of pathogenic fungi and bacteria**. London: CAB International, 1971.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja em números: safra 2019/2020**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 15 dez. 2020.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja em números: safra 2022/2023**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 15 out. 2023.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases**. Washington, DC: ARS-USDA, 2020. (US national fungus collections).
- FULMER, A. M. *et al.* First report of target spot caused by *Corynespora cassiicola* on cotton in Georgia. **Plant Disease**, Quebec, v. 96, n. 7, p. 1066-1066, 2012.
- GALBIERI, R. *et al.* *Corynespora* leaf blight of cotton in Brazil and its management. **American Journal of Plant Sciences**, Dover, v. 5, n. 26, p. 3805, 2014.
- GODOY, C. V. *et al.* **Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na cultura da soja, na safra 2022/2023**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2023.

- GODOY, C. V. *et al.* **Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Londrina: Embrapa Soja, 2013. (Circular técnica).
- GOULART, A. C. P.; UTIAMADA, C. M. *Corynespora cassiicola* in soybean seeds: incidence and transmission. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 36, p. 259-265, 2020.
- HENNING, A. A. *et al.* **Manual de identificação de doenças de soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2005. (Embrapa Soja Documentos, 256).
- HIREMATH, I. G. *et al.* In vivo bio-efficacy of fungicides and antagonists for the management of target leaf spot of soybean [*Corynespora cassiicola* (Berk. and Curt.) Wei]. **International Journal of Environment and Climate Change**, Hooghly, v. 13, n. 10, p. 4427-4434, 2023.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 4, n. 1, p. 1-180, 1976.
- JONES, J. P. A leaf spot of cotton caused by *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 51, n. 5, p. 305, 1961.
- KOENNING, S. R.; CRESWELL, T. C. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in southeastern United States. **Plant Disease**, Quebec, v. 90, p. 974, 2006.
- KRZYŻANOWSKI, F. C. *et al.* **O controle de qualidade agregando valor à semente de soja: série sementes.** Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 54).
- KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. *In*: KIMATHI, H. *et al.* (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 293-302.
- LOPES, C. A.; REIS, A. **Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido.** 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2011. 12 p. (Circular técnica, 100).
- LOPEZ, D. *et al.* Genome-Wide analysis of *Corynespora cassiicola* leaf fall disease putative effectors. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 276, 2018.
- MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-264, 1994.
- MACHADO, J. C. *et al.* Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. *In*: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. **Proceedings** [...]. Angers: ISTA, 2001a. p. 62.
- MACHADO, J. C. *et al.* Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001b.

- MACHADO, J. C. *et al.* Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 37-63, 2012.
- MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. *In*: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. p. 375-398.
- MALVICK, D. K. Fungus foliage diseases of soybeans. **Report on Plant Disease**, Champaign, n. 503, p. 1-9, 2004.
- MEHTA, Y. R.; MOTOMURA, K. F.; ALMEIDA, W. P. *Corynespora* leaf spot of cotton in Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 131, 2005.
- MENTEN, J. O. *et al.* Utilização de sementes sadias e/ou adequadamente tratadas no manejo de doenças do algodoeiro. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. **Anais** [...]. Salvador: Embrapa, 2005.
- NATÁLIA, N. D. L. *et al.* Aplicação de instrumentação em cultivo de algodão: revisão sistemática da literatura. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 11, n. 9, p. e46511930581-e46511930581, 2022.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2nd ed. London: McMillan, 1979. 1190 p.
- OLIVE, L. S.; BAIN, D. C.; LEFEBVRE, C. L. A leaf spot of cowpea and Soya bean caused by an undescribed species of *Helminthosporium*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 35, p. 822-831, 1945.
- PANIQUE, T. N. **La mancha anillada de lasoya (*Corynespora cassiicola*)**. La Paz: Fundacruz, 2007.
- POLLNOW, H. E. *et al.* Manejo da adubação de base em 21 soja no Noroeste do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Development**, São José dos Pinhais, v. 6, n. 6, p. 38913-38923, 2020.
- RINZO, S.; KITAZAWA, K. Occurrence of soybean root rot caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei in Hokkaido. **Annual Phytopathology Society Japan**, Tokyo, n. 46, p. 193-199, 1980.
- ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.; STALPERS, J. **The MycoBank engine and related databases**. Utrecht: MycoBank, 2005. Disponível em: <https://www.mycobank.org/>. Acesso em: 10 mar. 2024.
- RONDON, M. N.; LAWRENCE, K. The fungal pathogen *Corynespora cassiicola*: a review and insights for target spot management on cotton and Soya bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 169, n. 6, p. 329-338, 2021.
- SARAIVA, O. F.; MELO, P. G. S. **Resumos da V Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2010.

- SAWAN, Z. M. *et al.* Cotton seed, protein, oil yields and oil properties as affected by nitrogen fertilization and foliar application of potassium and a plant growth retardant. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, v. 2, n. 1, p. 56-65, 2006.
- SAXENA, D. K.; SHARMA, S. K.; SAMBI, S. S. Comparative extraction of cotton seed oil. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, London, v. 6, n. 1, p. 84-89, 2011.
- SILVA JÚNIOR, M. B. *et al.* qPCR-based detection of *Colletotrichum truncatum* in soybean seeds. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 45, n. 5, p. 550-555, 2020.
- SNOW, J. P.; BERGGREN, G. T. Target spot. *In*: SINCLAIR, J. B. (ed.). **Compendium of soybean diseases**. 3rd ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1989. p. 27-28.
- SOARES, R. M.; GODOY, C. V.; OLIVEIRA, M. C. N. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 34, n. 5, p. 333-338, 2009.
- SOUSA, M. V. D.; SIQUEIRA, C. D. S.; MACHADO, J. D. C. Conventional PCR for detection of *Corynespora cassiicola* in soybean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, p. 85-91, 2016.
- SOUZA, H. M. **Estratégias de controle integrado de doenças do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e suas relações com a produtividade**. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul, 2017.
- SOUZA, I. M. R.; SILVA, G. S. Fungos associados a plantas daninhas na ilha de São Luiz, Maranhão. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 27, n. 2, p. 267-268, 2001.
- SUMABAT, L. G.; KEMERAIT, R. C.; BREWER, M. T. Phylogenetic diversity and host specialization of *Corynespora cassiicola* responsible for emerging target spot disease of cotton and other crops in the southeastern United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 108, p. 892-901, 2018.
- TANAKA, M. A. S. Transmissão planta-semente e sementes-plântula do agente causal da ramulose do algodoeiro. *In*: MENTEN, J. O. M. (ed.). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ, 1995. p. 171-178.
- TERAMOTO, A.; CAVALCANTE, P. R.; CUNHA, M. G. Primeiro relato da ocorrência de *Corynespora cassiicola* na cultura do pepino em Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 1, p. 151, 2006.
- TERAMOTO, A. *et al.* Reação de cultivares de soja à *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 38, p. 68-71, 2013.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **USDA agricultural projections to 2031**. Disponível em: <https://www.usda.gov/sites/default/files/documents/USDA-Agricultural-Projections-to-2031.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2023.
- WAIN-TASSI, A. L. *et al.* Seed-borne pathogens and electrical conductivity of soybean seeds. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 69, n. 1, p. 19-25, 2012.

WEI, Y. X. *et al.* First report of target spot of cotton caused by *Corynespora cassiicola* in China. **Plant Disease**, Quebec, v. 98, n. 7, p. 1006-1006, 2014.

YORINORI, J. T.; GAZZIERO, D. L. P. **Pest management in soybean**. London: Springer Nature, 2012. 332 p.

ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado de doenças agressivas visando a produtividade de grãos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2023. 533 p.

ZIA, M. A. *et al.* Benefícios à saúde humana e características físico-químicas e funcionais do óleo de semente de algodão: uma revisão. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 82, p. 1-16, 2022.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - EFEITOS DE *Corynespora cassiicola* EM ASSOCIAÇÃO COM SEMENTES DE ALGODÃO

Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.

RESUMO

A mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, é considerada uma das principais doenças do algodoeiro e está presente, em todas as áreas, em que essa espécie é cultivada. Sua associação com sementes de espécies hospedeiras ainda não foi plenamente esclarecida, verificando-se apenas que o fungo tem sido detectado, em sementes de algodão, pelos testes de sanidade disponíveis. Diante do exposto, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar os efeitos de *C. cassiicola* no desempenho das sementes de algodão sob condições controladas. Para este estudo foram considerados uma cultivar susceptível ao patógeno, FM 944GL, dois isolados do fungo, quatro níveis de inóculo e uma testemunha para cada isolado e cultivo inicial do algodão em ambientes com duas temperaturas distintas. Foram aplicados testes-padrão de sanidade, germinação e vigor (condutividade elétrica) das sementes em laboratório e teste de emergência, em ambiente de cultivo, pelo qual foram avaliados estande, vigor (Índice de velocidade de emergência), altura e peso de plantas frescas e secas e índice de dano/doença. De modo geral, a presença de ambos os isolados de *C. cassiicola* em sementes de algodão foi prejudicial ao desenvolvimento das sementes inoculadas, havendo variações de intensidade entre as variáveis utilizadas para esse tipo de avaliação. Observou-se que os efeitos negativos, no desempenho das sementes, foram mais evidenciados, nos níveis de inóculo mais elevados de ambos os isolados e em ambiente com temperatura mais baixa. Com base em algumas variáveis utilizadas, observou-se uma diferença de efeitos entre os dois isolados do patógeno.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum* L.; mancha-alvo; vigor.

ABSTRACT

Target spot, caused by the fungus *Corynespora cassiicola*, is considered one of the main cotton diseases and is present in all areas where this species is grown. Its association with the seeds of host species has not yet been fully clarified, and all that is known is that the fungus has been detected in cotton seeds by the available health tests. Given the above, the main objective of this study was to evaluate the effects of *C. cassiicola* on the performance of cotton seeds under controlled conditions. This study considered a cultivar susceptible to the pathogen, FM 944GL, two isolates of the fungus, four inoculum levels and a control for each isolate, and initial cotton cultivation in environments with two different temperatures. Standard seed health, germination, and vigor (electrical conductivity) tests were carried out in the laboratory, as well as an emergence test in the growing environment, which assessed stand, vigor (emergence speed index), height, and weight of fresh and dry plants and the damage/disease index. In general, the presence of both isolates of *C. cassiicola* in cotton seeds was detrimental to the development of inoculated seeds, with variations in intensity between the variables used for this type of evaluation. It was observed that the negative effects on seed performance were more evident at higher inoculum levels of both isolates and in a lower temperature environment. Based on some of the variables used, a difference in effects was observed between the two isolates of the pathogen.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; targeted spot; vigor.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do algodão, que tem seu centro de origem no México, é atualmente cultivada em diversas regiões do mundo, ocupando o Brasil o terceiro lugar no ranking de produção mundial dessa espécie (United States Department of Agriculture - USDA, 2023). Segundo dados da CONAB (Brasil, 2022), o cultivo do algodão ocupou no Brasil, na safra 2022/23, uma área de 2 milhões de hectares com produção de 3 milhões de toneladas.

Corynespora cassiicola é o agente causal da mancha-alvo em algodão e tem uma ampla gama de hospedeiros, incluindo culturas agrícolas de importância econômica, como soja, tomate, pepino, feijão-caupi e seringueira. A mancha-alvo é considerada uma das principais doenças do algodão e, nos últimos anos, a doença tem ocorrido com maior frequência, principalmente pela sucessão da cultura com a soja, que também é hospedeira desse fungo.

O patógeno pode sobreviver por mais de uma safra na forma de clamidósporos e, em restos culturais, em plantas daninhas, além de ser transmitido por sementes do algodão. Fatores como chuvas e ventos contribuem efetivamente para a dispersão do inóculo inicial na cultura. Conídios do fungo são inicialmente produzidos sobre lesões que são formadas nas folhas inferiores de plantas atingidas e a partir daí podem ser dispersos e dar origem a repetidos ciclos da doença (Bowen *et al.*, 2018; Mehl *et al.*, 2017; Sharma, 2017).

Sob condições de ambiente favorável para o desenvolvimento da doença, como umidade relativa do ar a partir de 80%, temperatura do ar entre 20 e 30°C, o patógeno pode causar lesões necróticas nos tecidos foliares, afetando a região fotossinteticamente ativa (Bowen *et al.*, 2018). O fungo é capaz de crescer nos tecidos do hospedeiro e provocar a morte da planta antes ou durante a colonização, pela liberação de metabólitos fitotóxicos (Wang *et al.*, 2016). Em condições ideais, para a infecção pelo patógeno e desenvolvimento da doença, plantas de algodão podem apresentar severa desfolha prematura, que se inicia na parte inferior na qual a umidade é mais elevada e localizada mais próxima do inóculo primário do solo (Galbieri *et al.*, 2014).

Segundo estudo realizado nos Estados Unidos, a mancha-alvo pode levar a uma queda de produtividade na cultura do algodão de mais de 336 kg/ha em cultivares suscetíveis (Conner; Hagan; Zhang, 2013). Esse tipo de quantificação ainda é desconhecido nas condições do Brasil (Souza *et al.*, 2020).

Em relação ao manejo da mancha-alvo nas condições brasileiras, poucas informações são encontradas na literatura. De modo geral, são citadas medidas comuns a outras doenças, como rotação de culturas com espécies não hospedeiras, destruição de restos vegetais, práticas

sanitárias de sementes, aplicações de fungicidas (químicos e biológicos). Essas medidas têm sido importantes para a redução de perdas de rendimento nas culturas de algodão e soja (Galbieri *et al.*, 2014).

Diante da escassez de informações que dizem respeito à relação de *C. cassicola* com sementes de espécies hospedeiras, principalmente no caso do algodão, o presente trabalho teve como foco central entender e mensurar com mais profundidade o grau de associação desse patógeno com sementes do algodão, sob condições controladas, tendo como base avaliar os efeitos dessa interação no desempenho fisiológico das sementes portadoras do patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório Central de Análise de Sementes, do Departamento de Agricultura ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Origem e multiplicação dos isolados de *Corynespora cassiicola* e perfil das sementes utilizadas

Foram utilizados dois isolados de *C. cassiicola*, para a realização do trabalho, sendo um obtido da coleção micológica do Agrônômica Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, codificado como 9601 (1) e outro isolado da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, codificado como LAPS 312 (2). Ambos os isolados foram originalmente obtidos de plantas de soja procedentes de diferentes regiões de cultivo no Brasil. Inicialmente os isolados foram cultivados em substrato, contendo batata, dextrose e ágar (BDA), em placas de Petri, com incubação em câmara do tipo BOD à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Ao final desse período, foram obtidas culturas monospóricas dos isolados para uso na inoculação das sementes.

O grau de suscetibilidade à mancha-alvo das sementes de algodão, utilizadas neste trabalho, pertencentes à cultivar FM 944GL (BASF), não é conhecido, embora preliminarmente tenha sido verificada a sua susceptibilidade aos isolados utilizados. A sua sanidade foi determinada, por meio de testes de laboratório realizados, de acordo com os protocolos disponíveis, seguindo as Regras para Análises de Sementes no Brasil (Brasil, 2009a, 2009b). As sementes utilizadas nesses estudos encontravam-se isentas de *C. cassiicola* e apresentaram um percentual de germinação de 93%.

2.2 Inoculação de sementes com *C. cassiicola*

Para a obtenção de sementes de algodão com diferentes níveis de inóculo de *C. cassiicola*, foi utilizada a metodologia de condicionamento hídrico (Machado *et al.*, 2001, 2012). Inicialmente as sementes foram desinfestadas, utilizando hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e lavadas três vezes com água destilada e secas entre folhas de papel germitest em sala climatizada a 20°C por 48 horas. Colônias de *C. cassiicola* foram obtidas, a partir de culturas monospóricas desenvolvidas em placas de Petri de 15cm com meio BDA + manitol, com

potencial hídrico ajustado a $-1,0$ MPa (Michel; Radcliffe, 1995). Após sete dias, as sementes foram distribuídas sobre as colônias fúngicas, em camadas simples, tendo-se o cuidado de posicionar as sementes em contato físico direto com o fungo. As sementes foram mantidas sobre as colônias fúngicas por períodos de 36, 72, 108 e 144 horas, equivalentes aos níveis de inóculo do patógeno estabelecidos para este estudo, os quais foram denominados: NI36, NI72, NI108 e NI144, respectivamente e acondicionadas em câmaras do tipo BOD, sob temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. As sementes foram retiradas e secas, em folhas de papel germitest, em sala climatizada, por um período de 48 horas. Para a avaliação do efeito do restritor hídrico, as sementes foram também colocadas em placas de Petri, contendo apenas o meio BDA acrescido de manitol pelos mesmos períodos de tempo já mencionados e, em seguida, submetidas à secagem da mesma maneira descrita para sementes inoculadas. Uma testemunha absoluta NI0 (sem manitol e não inoculada) foi também adicionada no experimento.

Pelo teste de germinação das sementes, aplicado preliminarmente, não foram observados efeitos isolados do restritor hídrico manitol no percentual de germinação.

2.3 Avaliação da incidência, intensidade (nível) de inóculo e efeitos de *C. cassiicola* na germinação e vigor das sementes em laboratório e no desempenho das sementes sob condições controladas de cultivo

2.3.1 Teste de sanidade

Para esse teste foi utilizado o método de blotter. As sementes de algodão inoculadas e não inoculadas foram distribuídas sobre três discos de papel de filtro umedecidos com água (5g de água/L), acrescidos de 2,4-D (diclorofenoxyacetato de sódio – concentração de 10 ppm), acondicionadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Foram utilizadas cinco repetições de 40 sementes por placa, sendo essas mantidas em câmaras do tipo BOD por fotoperíodo de 12 h, a 20°C , em câmara de incubação de sementes, por sete dias. Após esse período, as sementes foram examinadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e microscópio ótico (Brasil, 2009b). Os resultados foram obtidos em porcentagem de incidência e de intensidade do fungo. Para a avaliação da intensidade do fungo nas sementes examinadas, considerou-se a área de cobertura visual das sementes por estruturas morfológicas do fungo. Nesse caso, adotou-se uma escala de 0 a 4, em que 0= sementes livres de estrutura do fungo; 1= sementes com até 25% da superfície coberta pelo patógeno; 2= 26-50%; 3= 51-75% e 4= 76-100%. O resultado final foi calculado usando-se a fórmula de McKinney (1923).

2.3.2 Teste de germinação das sementes

O teste de germinação em Rolo de Papel foi conduzido com 200 sementes (quatro repetições de 50 sementes), as quais foram distribuídas sobre papel tipo germitest, umedecido com água destilada (2,5 vezes o peso do papel) e colocadas em germinador regulado à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas, aos cinco e aos doze dias após a semeadura, conforme os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.3.3 Teste de vigor (condutividade elétrica – CE)

Foram utilizadas 200 sementes em cada tratamento (quatro repetições de 50 sementes). Cada repetição foi pesada em balança de precisão (4,16 g), colocada em copo plástico (capacidade de 200 mL), contendo 75 mL de água deionizada e acondicionados em câmara do tipo BOD, à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Após esse período, efetuou-se a leitura da condutividade elétrica da solução de cada tratamento, utilizando-se condutivímetro MS TECNOPON[®], modelo mCA 150, sendo esse previamente calibrado com uma solução padrão de KCl. As leituras obtidas foram subtraídas da leitura inicial da água (controle) e divididas pelo peso de cada repetição, sendo o resultado final expresso em $\mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, conforme descrito por Krzyzanowski, Vieira e França Neto (1999).

2.4 Testes de emergência em condições controladas

Cem sementes de algodão de cada tratamento, foram distribuídas individualmente em copos plásticos de 300 mL, contendo uma mistura autoclavada de substrato comercial (Tropstrato HA hortaliças saco de 25kg) com areia (granulação média) lavada e autoclavada, na proporção 1:1. Os copos foram dispostos em grupos de 25 por bandeja de tamanho 48 x 29 x 10 cm, sendo cada bandeja correspondente a uma repetição. O experimento foi conduzido, em duas câmaras de cultivo vegetal, com temperaturas ajustadas em $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas luz (luz do dia NSK T10 40W 6500K FL40T10-6 60Hz)/12 horas escuro.

2.4.1 Avaliação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE)

Para essa avaliação, foram realizadas contagens diárias da emergência das plantas a partir da primeira emergência de plântulas até a estabilização do estande. As plantas permaneceram em câmara de cultivo vegetal até 28 dias após a semeadura (d.a.s.). O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962).

$$IVE = \sum_{i=1}^n N_i/D_i, \text{ em que:}$$

IVE = índice de velocidade de emergência;

N_i = número de plantas emergidas na 1ª contagem, 2ª contagem, ...enésima contagem, respectivamente;

D_i = número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ...enésima contagem, respectivamente.

2.4.2 Avaliação de estande inicial e estande final

O estande inicial das plantas crescidas em câmara de cultivo vegetal a 20°C e 25°C foi registrado aos seis dias após a semeadura. Os estandes finais das plantas, mantidas em ambas as câmaras de cultivo, foram registrados aos 28 dias após a semeadura. Os valores absolutos foram transformados em porcentagem.

2.4.3 Avaliação da altura de plantas

Aos 28 d.a.s, foram realizadas medições de 10 plantas aleatórias em cada repetição, as quais foram medidas desde a base do colo até o ápice foliar com o uso de uma régua graduada com precisão de milímetros.

2.4.4 Avaliação da massa de planta fresca e seca

Aos 28 dias após a semeadura, as plantas emergidas foram cortadas na região do colo e na última inserção de folhas com o auxílio de uma lâmina para bisturi e pesadas. Posteriormente, foram levadas à estufa com circulação forçada de ar, regulada a 70°C, na qual permaneceram por sete dias e então pesadas novamente para a obtenção da massa de planta seca. Os resultados foram expressos em gramas (g).

2.4.5 Avaliação do índice de doenças/dano

Para o cálculo desse índice, lançou-se mão de uma escala de notas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5, na qual zero = plantas normais sem sintomas de infecção; 1 = plantas com massa de até 10% menor que a massa de plantas oriundas de sementes não inoculadas; 2= plantas com massa acima de 10% menor que a massa de plantas oriundas de sementes não inoculadas; 3= plantas com sintomas de necrose na haste e/ou folha; 4= plantas mortas em pós-emergência; e 5= sementes não germinadas. Os valores anotados foram submetidos à fórmula de McKinney (1923), que expressa valores médios percentuais de danos provocados pela doença em avaliação.

2.5 Análises estatísticas

Para os testes de germinação, sanidade e condutividade elétrica, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e o delineamento experimental dos testes de emergência, que avalia IVE, estande inicial e final, altura, peso da planta fresca e seca, foi em blocos ao acaso (DBC). As análises de variância foram realizadas individualmente para cada isolado, além do controle (não inoculado)

A análise exploratória dos dados foi realizada, para a verificação de presença de outlayer, normalidade e homoscedasticidade, a fim de verificar sua força e confiabilidade. Após a análise inicial e a confirmação da normalidade, foi feita a análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade. Nas variáveis que apresentaram diferença significativa pelo teste R foi feito o estudo de correlação e, para as que apresentaram de média à forte correlação, foi feito o estudo de regressão para ajuste de equação. Nas variáveis, em que não houve ajuste de equação, apresentando correlação fraca entre as variáveis respostas e os tratamentos, mas apresentaram diferenças significativas no teste F, foi aplicado o teste de Scott-knott, a 5%, para análise múltipla de médias. Todas as análises foram realizadas, utilizando os pacotes tidyverse, corr, vegan, deplyr e agricolae do programa estatístico RStudio.

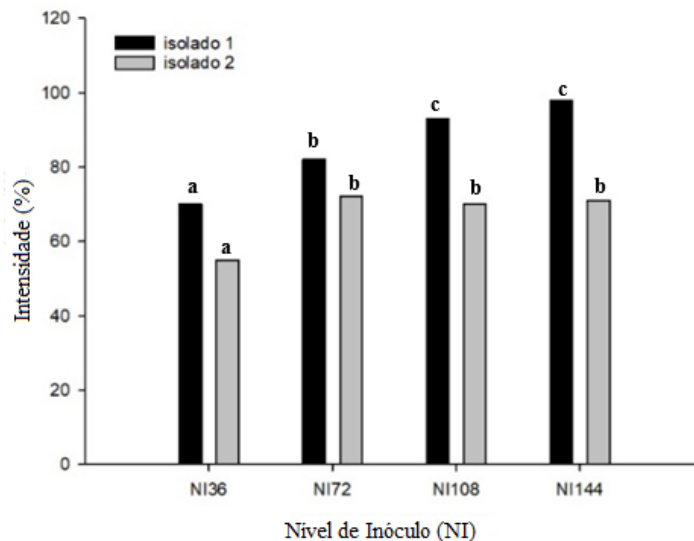
3 RESULTADOS

3.1 Incidência e intensidade (nível) de inóculo de *C. cassiicola* e efeitos do fungo na qualidade fisiológica das sementes de algodão

Pelo teste de sanidade, observou-se incidência de 100% do isolado 1, nas sementes inoculadas e, para o isolado 2, a incidência do patógeno foi variável entre os níveis de inóculo, cabendo ao nível NI36 o menor valor, 85,5%, e aos demais os valores de 97%, 95%, 96%, respectivamente.

A avaliação da intensidade de inóculo nas sementes inoculadas, em cada tratamento, mostrou que as sementes inoculadas com o isolado 1 apresentaram maiores níveis dessa variável em NI108 e NI144, seguidos de NI72 e, por último, NI36. Nas sementes inoculadas com o isolado 2, os níveis NI72, NI108 e NI144 apresentaram os mesmos valores médios e todos superiores estatisticamente ao nível NI36 (Figura 1).

Figura 1 - Intensidade de inóculo de *Corynespora cassiicola*, em sementes de algodão com diferentes níveis de inóculo (NI36, NI72, NI108, NI144) dos isolados 1 e 2.

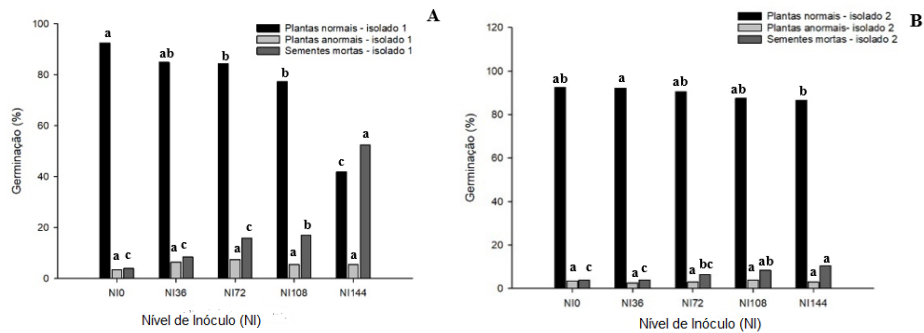


Fonte: Da autora (2024).

A presença de *C. cassiicola*, nas sementes de algodão, na forma infectiva, provocou uma queda no percentual de germinação de forma inversa e proporcional ao aumento dos níveis de inóculo, havendo um efeito mais pronunciado no nível de inóculo mais elevado, NI144. Nessas condições, pôde-se constatar também uma maior quantidade de sementes mortas (Figura 2 A).

A queda do percentual de germinação das sementes inoculadas com o isolado 2 foi estatisticamente diferenciada apenas no nível de inóculo mais elevado (Figura 2 B).

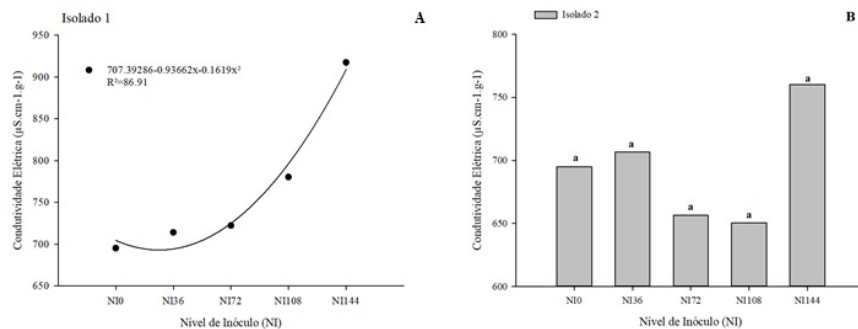
Figura 2 - Valores percentuais de germinação de sementes de algodão portadoras de diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144) de *C. cassiicola*. A - isolado 1 e B - isolado 2. As comparações referem-se às colunas de mesmas cores.



Fonte: Da autora (2024).

Os resultados referentes aos efeitos de *C. cassiicola* sobre o vigor das sementes, avaliados pelo teste de condutividade elétrica, mostram que houve um aumento exponencial (Figura 3 A) dos valores dessa variável em sementes com diferentes níveis de inóculo do isolado 1. Por sua vez, os valores de condutividade elétrica, correspondentes ao isolado 2, foram estatisticamente equivalentes entre si em todos os níveis de inóculo utilizados neste ensaio (Figura 3 B).

Figura 3 - Valores médios de condutividade elétrica de exsudatos sementes de algodão portadoras de diferentes níveis de inóculo de *C. cassiicola*. A - isolado 1 e B - isolado 2.

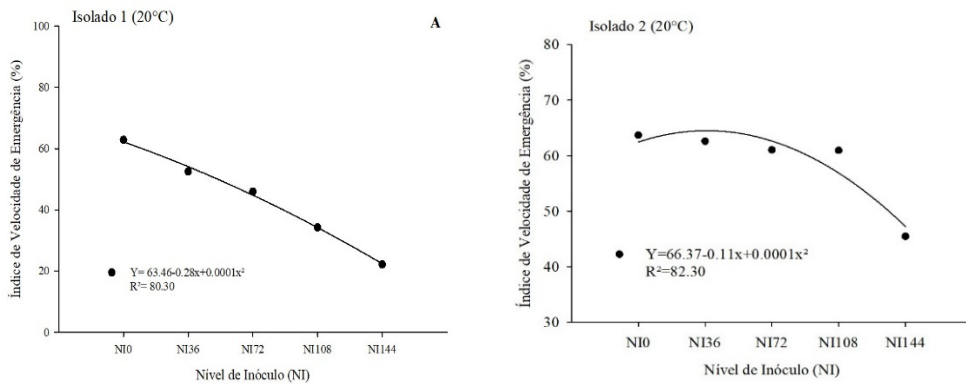


Fonte: Da autora (2024).

3.2 Efeitos de *C. cassiicola* no desenvolvimento inicial das plantas de algodão em ambiente de cultivo controlado a partir de sementes inoculadas

O aumento do nível de inóculo do isolado 1, na temperatura de 20 °C, levou à diminuição dos valores de IVE de forma linear (Figura 4 A), indicando que quanto maior o nível de inóculo, menor é o vigor das plantas. A mesma tendência foi observada, nas plantas provenientes de sementes inoculadas com o isolado 2, que também apresentaram uma redução do IVE diretamente proporcional ao aumento do nível de inóculo, na temperatura de 20°C, porém de uma forma mais branda (Figura 4 B).

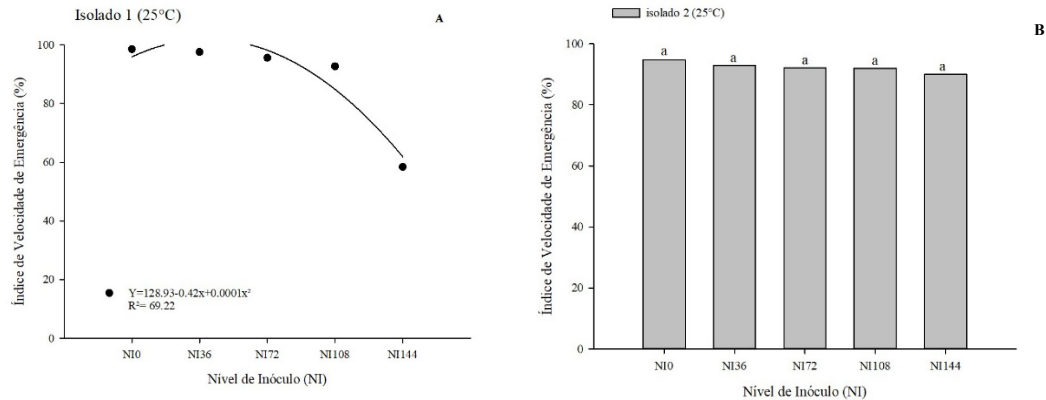
Figura 4 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de algodão inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144) dos isolados 1 e 2 sob a temperatura de cultivo de 20°C. A - isolado 1, 20°C e B - isolado 2, 20°C.



Fonte: Da autora (2024).

Em ambiente com temperatura de 25 °C, as plantas, provenientes de sementes inoculadas com o isolado 1, comportaram-se da mesma forma que na temperatura de 20°C, enquanto as inoculadas com o isolado 2 não apresentaram diferença estatística no índice de velocidade de emergência entre os tratamentos com os diferentes níveis de inóculo (Figuras 5 A e B).

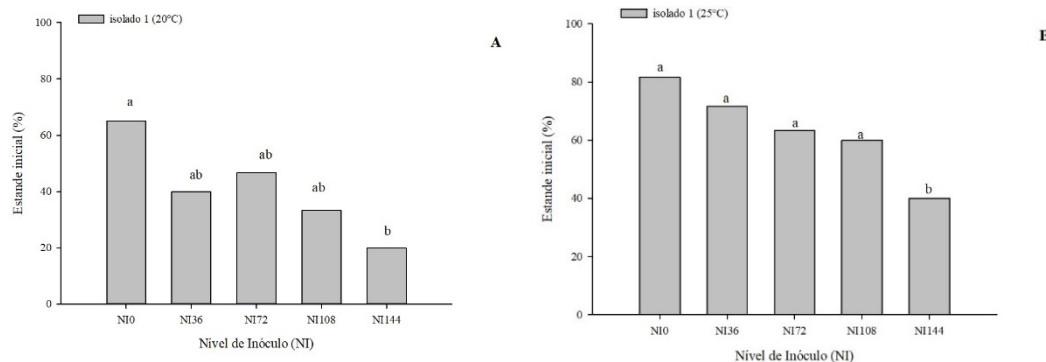
Figura 5 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de algodão inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144) dos isolados 1 e 2 sob a temperatura de cultivo de 25°C. A - isolado 1, 25°C e B - isolado 2, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

O estande inicial das plantas, provenientes de sementes inoculadas com o isolado 1, sob temperatura de 20°C (Figura 6 A), apresentou um declínio gradual, a partir de NI36, sendo maior no nível NI144. Entretanto, no ambiente com temperatura de 25°C, elas apresentaram redução de estande somente em sementes com nível de inóculo maior, NI144 (Figura 6 B).

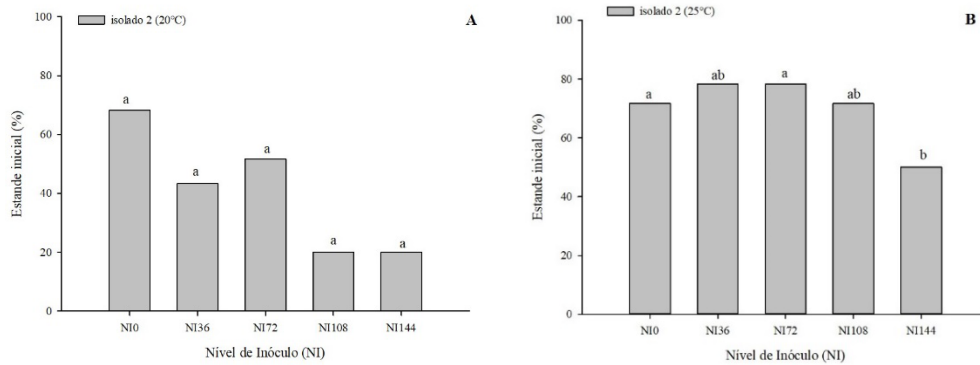
Figura 6 - Estande inicial de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado 1, em cinco níveis de inóculo NI0, NI36, NI72, NI108, NI144, mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e B – isolado 1, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

Nas avaliações de estande inicial das plantas inoculadas com o isolado 2, a 20°C, não se observaram diferenças estatísticas nas plantas emergidas de sementes com os níveis crescentes de inóculo (Figura 7 A), enquanto a 25°C, o valor de estande inicial foi o menor no nível de inóculo NI144 (Figura 7 B).

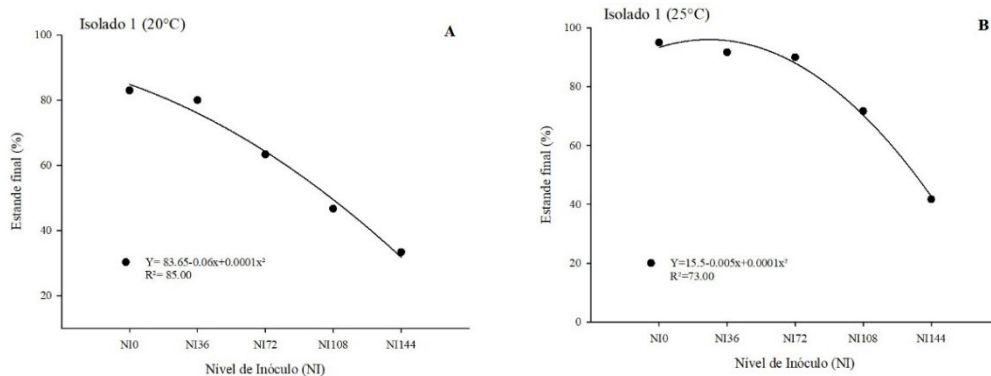
Figura 7 - Estande inicial de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado 2, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

Na avaliação do estande final, observou-se que houve interação significativa entre as temperaturas de cultivo e os potenciais de inóculo em ambos os isolados. No tratamento com sementes inoculadas com isolado 1, observou-se tendência à diminuição do estande final na proporção inversa do aumento do nível de inóculo sob temperaturas de 20 e 25°C (Figuras 8 A e B).

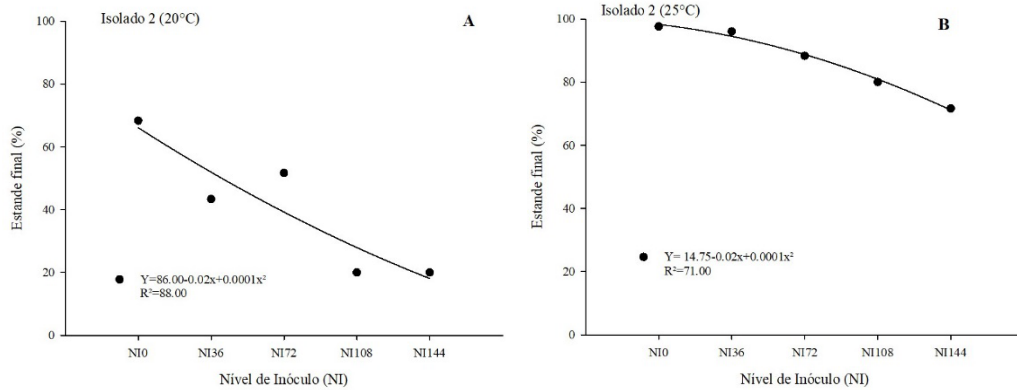
Figura 8 - Estande final de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado (1), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e B – isolado 1, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

A mesma tendência de efeitos, observados com o isolado 1, ocorreu com o isolado 2, ou seja, os valores de estande final diminuiram consideravelmente com o aumento do nível de inóculo em ambas as temperaturas, ou seja, a 20 e 25°C (Figuras 9 A e B).

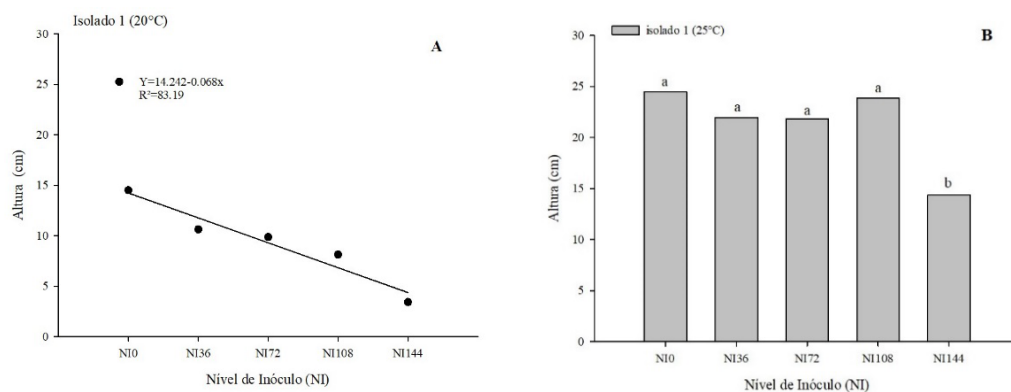
Figura 9 - Estande final de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado (2), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

A altura de plantas emergidas das sementes inoculadas com o isolado 1 apresentou uma interação significativa entre as temperaturas de cultivo e os potenciais de inóculo em todos os tratamentos. A exemplo do que foi observado com estandes de plantas, houve um efeito proporcional inverso do patógeno sobre a altura de plantas oriundas de sementes (Figuras 10 A e B).

Figura 10 - Altura de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado (1), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e B – isolado 1, 25°C.

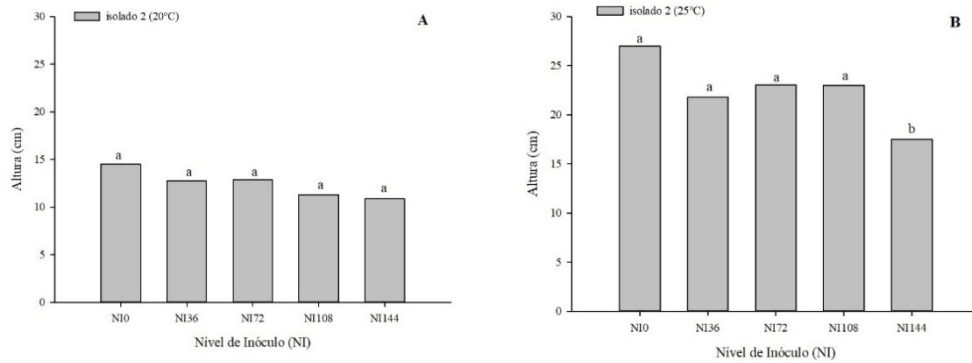


Fonte: Da autora (2024).

Por sua vez, os resultados referentes à altura de plantas oriundas de sementes inoculadas com o isolado 2 indicam não houve diferença significativa entre os níveis de inóculo em ambiente com temperatura de 20°C, (Figura 11 A). Sob temperatura de 25°C, houve

uma redução significativa da altura de plantas no nível de inóculo mais elevado NI144 (Figura 11 B).

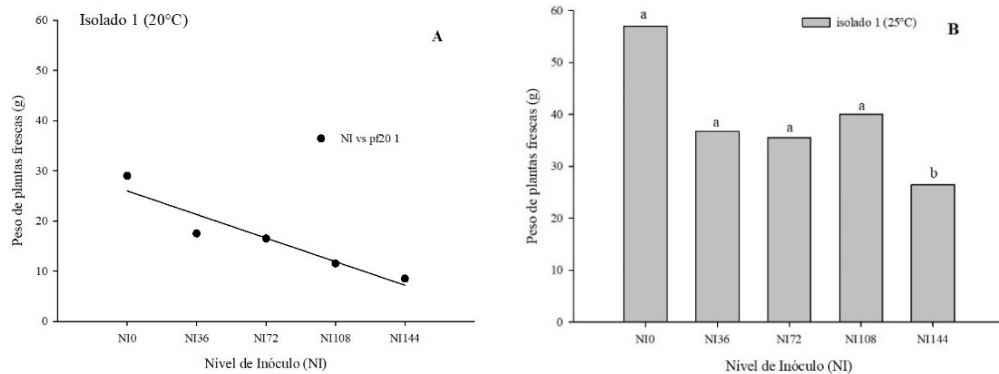
Figura 11 - Altura de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado (2), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

Os pesos das plantas frescas, quando foram provenientes das sementes inoculadas com o isolado 1 e cultivadas em ambiente a 20°C, apresentaram reduções significativas na proporção inversa dos valores do nível de inóculo (Figura 12 A). Por outro lado, no cultivo à temperatura de 25°C, observou-se que o peso das plantas submetidas aos tratamentos com os diferentes níveis de inóculo não apresentaram diferenças entre si, mas diferiram estatisticamente da testemunha não inoculada (Figura 12 B).

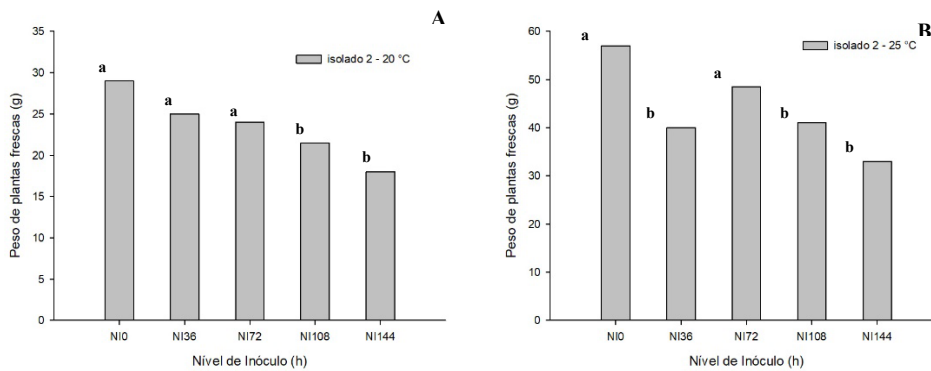
Figura 12 - Peso fresco de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado 1, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e isolado 1, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

Sob temperatura de 20°C, as plantas emergidas das sementes inoculadas com o isolado 2 apresentaram uma redução nos valores de peso de plantas frescas, a partir de NI108, quando comparados à testemunha (Figura 13 A). Já em cultivo a temperatura de 25°C, houve redução no peso de plantas frescas em NI36, NI108, NI144 (Figura 13 B).

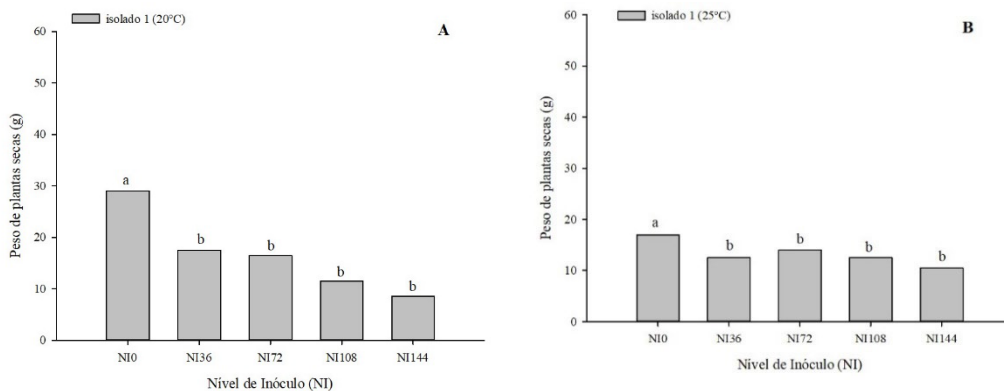
Figura 13 - Peso de plantas frescas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado 2, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

Em relação a peso das plantas secas, provenientes de sementes inoculadas com o isolado 1, os valores médios foram semelhantes entre os tratamentos com os diferentes níveis de inóculo, mas apresentaram valores menores que a testemunha em ambas as temperaturas testadas (Figuras 14 A e B).

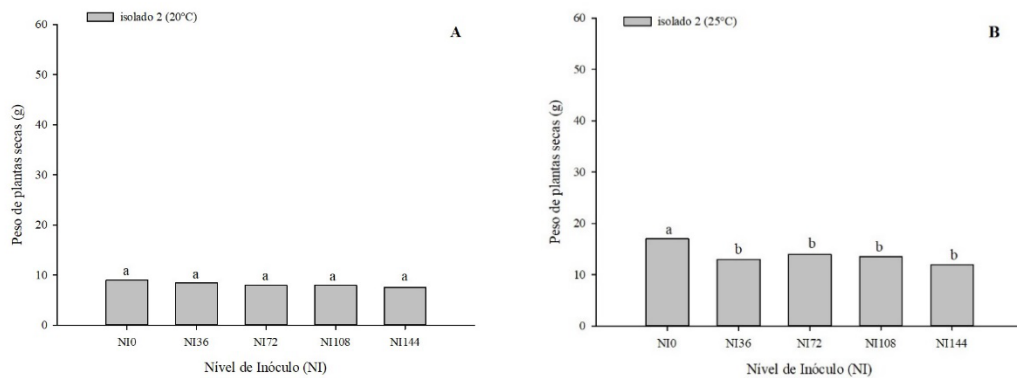
Figura 14 - Peso de plantas secas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado 1, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20°C e B – isolado 1, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

Para o isolado 2, os efeitos do patógeno, considerando-se peso de plantas secas, somente foram observados no cultivo à temperatura de 25°C, não havendo, entretanto diferenças estatísticas entre os tratamentos envolvendo inoculação das sementes (Figura 15 B). Em ambiente com temperatura mais baixa, 20 °C, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos incluindo a testemunha (Figura 15 A).

Figura 15 - Peso seco de plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* isolado 2, em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108, NI144), mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 2, 20°C e B – isolado 2, 25°C.

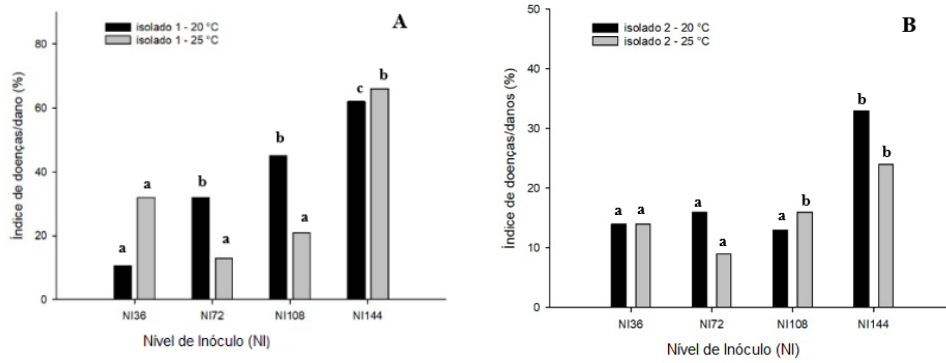


Fonte: Da autora (2024).

Pela avaliação do índice de doença/danos, Figura 15, referente ao isolado 1, observou-se que os efeitos do patógeno foram mais acentuados, a partir do nível de inóculo inicial de NI72, em cultivo à temperatura de 20°C e somente no nível de inóculo de NI144 no cultivo à temperatura de 25°C (Figura 16 A).

Os valores de índice de doença/danos, referentes ao isolado 2 de *C. cassiicola*, Figura 16 B, revelam que houve um efeito estatisticamente significativo do patógeno, a partir do nível inicial de inóculo NI36, que não diferiu dos níveis de inóculo NI72 e NI108, no cultivo do algodão a 20 °C. No cultivo à temperatura de 25°C, os valores de índice de doença/dano foram maiores estatisticamente nos níveis de inóculo NI108 e NI144. (Figura 16 B).

Figura 16 - Índice de Dano/Doença em plantas de algodão emergidas de sementes inoculadas com cinco níveis de inóculo de *Corynespora cassiicola*, isolados 1 e 2, com cultivo sob temperaturas de a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 e 25°C e B – isolado 2, 20 e 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

4 DISCUSSÃO

Os resultados do teste de germinação em laboratório revelaram que a presença de *C. cassiicola* nas sementes de algodão na forma infectiva é capaz de provocar efeitos negativos significativos na formação de plântulas normais e na germinação das sementes. Independente do isolado e da temperatura ambiente, ocorreu uma redução do percentual de germinação de maneira proporcional e inversa ao aumento do nível de inóculo do patógeno inicial nas sementes. Pelo método de inoculação do fungo nas sementes, utilizado neste estudo, verificou-se alta incidência de ambos os isolados avaliados pelo teste de sanidade, blotter, o que não é tão comum em inoculações realizadas em outros patossistemas envolvendo fungos. Pela avaliação da intensidade de inóculo que indica a quantidade de inóculo em sementes individuais foi possível detectar diferenças entre os tratamentos para ambos os isolados utilizados neste estudo. Esse resultado apresenta similaridade com outros patossistemas já submetidos ao mesmo método de inoculação, como *Stenocarpella maydis* em milho (Siqueira *et al.*, 2014) e *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão e soja (Botelho *et al.*, 2013; França *et al.*, 2021), entre outros.

Em relação aos efeitos dos isolados de *C. cassiicola* no vigor das sementes, avaliados pelo teste de condutividade elétrica, nota-se que houve um aumento exponencial nos valores, indicando que quanto maior o nível de inóculo, mais degradada a semente se torna, em relação ao isolado 1. Para o isolado 2, não houve diferenças entre os níveis de inóculo utilizados neste estudo. Pelos testes realizados, para avaliar os efeitos de *C. cassiicola* em associação com sementes de algodão, em ambiente de cultivo com temperatura controlada, partindo-se de sementes com distintos níveis de inóculo, foi possível observar que pelo índice de velocidade de emergência (IVE), na temperatura de 20°C, para os dois isolados, houve uma diminuição de forma linear dessa variável, confirmando que o nível de inóculo interfere diretamente no vigor (IVE). Provavelmente a baixa temperatura desfavoreceu o desenvolvimento das plantas de algodão e foi favorável ao desenvolvimento do patógeno. No estudo sobre IVE, em ambiente com temperatura de 25°C, para o isolado 1, constata-se que aumentos do nível de inóculo do fungo nas sementes provoca reduções dos valores de IVE; em relação ao isolado 2, não se observou variação significativa dos efeitos entre níveis de inóculo do patógeno, o que sugere um comportamento diferencial dos isolados nessas condições desse teste. Importante salientar que ambos os isolados foram inicialmente recuperados de soja.

Com base nos resultados de estande inicial, nota-se que, na testemunha, em que as sementes não foram inoculadas, houve uma diferenciação em relação às temperaturas e isolados. Para o isolado 1, a 20 e 25°C, houve maior redução no estande de plantas em NI144,

enquanto, para o isolado 2 a 20°C, não houve diferença estatística entre os tratamentos e a 25°C houve uma redução de estande inicial em NI144. Aos 28 dias após a semeadura, avaliou-se o estande final e observou-se que, independente da temperatura utilizada, para ambos os isolados, houve uma diminuição da porcentagem de plantas emergidas conforme aumenta o nível de inóculo.

O nível de inóculo não afetou o crescimento das plantas, em nenhuma temperatura, quando relacionado ao isolado 2. Por outro lado, plantas oriundas de sementes inoculadas com o isolado 1 apresentaram a altura afetada pelos níveis de inóculo em ambiente com as duas temperaturas utilizadas.

Pelas avaliações dos efeitos dos níveis de inóculo do fungo nos pesos das plantas frescas, verificou-se que houve redução, em todos os tratamentos, indicando que a presença do fungo afeta diretamente o peso de plantas frescas.

Para o peso de plantas secas, oriundas de sementes inoculadas com o isolado 1, nas duas temperaturas, notou-se diminuição na porcentagem dessa variável, quando comparadas com a testemunha. Contudo, para o isolado 2, apenas a 25°C verificou-se redução de peso quando comparado à testemunha.

Com base nos valores calculados, para índice de dano/doença, observou-se que os dois isolados, utilizados neste trabalho, foram mais danosos ao algodoeiro à temperatura de 20°C. Esse fator, conforme já referenciado, pode ser em razão do ambiente com temperatura não favorável para o cultivo de algodão e favorável ao desenvolvimento do patógeno que se desenvolve em uma ampla faixa de temperaturas (20 a 30°C) (Bowen *et al.*, 2018). Os efeitos do isolado 1 são mais drásticos em comparação ao isolado 2. Neste estudo, notou-se que níveis de inóculo mais elevados provocaram índice de dano/doença maiores

Por este estudo, fica também evidenciado que a associação de *C. cassicola* com sementes de algodão pode provocar danos drásticos, como morte em pré-emergência e perdas de estande em pós-emergência, com posteriores efeitos danosos que dependerão de diversos fatores que são objetos de consideração epidemiológica de cada patossistema. Os danos que procedem de atuação do agente da mancha-alvo, a partir de sementes de algodão, ou seja, desde o início da semeadura em campos de cultivo, apresentam reflexos dos mais diversos e drásticos, tanto nas produções como no âmbito de implicações epidemiológicas.

5 CONCLUSÃO

A associação de *C. cassiicola* com sementes de algodão pode causar danos diversos e severos à germinação e vigor das sementes, além de afetar o desenvolvimento de plantas em etapas posteriores de cultivo.

Em condições de temperatura mais baixa, que é menos favorável ao cultivo do algodão, a presença de *C. cassiicola* é mais prejudicial ao desempenho das sementes infectadas.

Os efeitos de *C. cassiicola*, na qualidade das sementes de algodão, na forma infectante, são crescentes e proporcionais de maneira direta ou inversa dependendo da variável em consideração.

Os danos causados por *C. cassiicola*, em associação com sementes de algodão, podem variar de acordo com o isolado do patógeno.

De modo geral, valores crescentes de níveis de inóculo inicial do patógeno nas sementes provocam níveis crescentes e proporcionais de danos/doença na cultura em condições favoráveis para a doença.

REFERÊNCIAS

- BOTELHO, L. D. S. *et al.* Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, p. 153-160, 2013.
- BOWEN, K. L. *et al.* Epidemics and yield losses due to *Corynespora cassiicola* on cotton. **Plant Disease**, Quebec, v. 102, n. 12, p. 2494-2499, 2018.
- BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileiro: grãos: décimo primeiro levantamento, agosto 2022: safra 2021/2022**. Brasília, DF: Conab, 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009a. 399 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009b. 200 p.
- CONNER, K. N.; HAGAN, A. K.; ZHANG, L. First report of *Corynespora cassiicola* incited target spot on cotton in Alabama. **Plant Disease**, Quebec, v. 97, n. 10, p. 1379-1379, 2013.
- FRANÇA, S. K. S. D. *et al.* Quantification and conceptual validation of the inoculum potential of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and bean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 43, p. 1-11, 2021.
- GALBIERI, R. *et al.* *Corynespora* leaf blight of cotton in Brazil and its management. **American Journal of Plant Sciences**, Dover, v. 5, n. 26, p. 3805, 2014.
- KRZYZANOWKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. 218 p.
- MACHADO, J. C. *et al.* Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. *In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. Proceedings [...]*. Angers: ISTA, 2001. p. 62.
- MACHADO, J. C. *et al.* Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 37-63, 2012.
- MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 75, p. 22-34, Mar. 1962.
- MCKINNEY, H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, DC, v. 26, n. 3, p. 195-217, Jan. 1923.
- MEHL, H. *et al.* Multi-year regional evaluation of one and two applications of registered and experimental fungicides for the management of target spot on two cotton varieties. *In:*

BELTWIDE COTTON CONFERENCES, 2017, Memphis. **Proceedings** [...]. Memphis: National Cotton Council of America, 2017. p. 222-223.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A. Computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, 1995.

SHARMA, N. **Epidemiology of target spot of cotton and tomato**. 2017. 107 f. Thesis (Master of Science) - Auburn University, Auburn, 2017.

SIQUEIRA, C. S. *et al.* Effects of *Stenocarpella maydis* in seeds and in the initial development of corn. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, p. 79-86, 2014.

SOUZA, H. M. *et al.* Integrated control of target spot and yield of cotton in the Brazilian cerrado biome. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 92, p. e20181205, 2020.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Brazil**: cotton and products update. Disponível em: <https://fas.usda.gov/data/brazil-cotton-and-products-update-14>. Acesso em: 7 dez. 2023.

WANG, X. *et al.* The role of effectors and host immunity in plantnecrotrophic fungal interactions. **Virulence**, Austin, v. 5, n. 7, p. 722-732, 2016.

ARTIGO 2 - POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE *Corynespora cassiicola* A PARTIR DE SUA ASSOCIAÇÃO COM SEMENTES DE ALGODÃO

Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.

RESUMO

Sementes de algodão infectadas por *Corynespora cassiicola* podem causar prejuízos diversos à cultura. A transmissão desse patógeno pelas sementes pode variar, de acordo com diversos fatores, entre os quais se destacam: genótipo do hospedeiro, condições climáticas e natureza do patógeno. O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de transmissão de dois isolados de *C. cassiicola*, a partir de sementes de algodão, utilizando sementes infectadas artificialmente com cultivo sob duas temperaturas (20 °C e 25 °C). As sementes foram inoculadas pelo método de condicionamento hídrico, com exposição das sementes a colônias do fungo por 36 h, 72 h, 108 h e 144 h, que corresponderam aos diferentes níveis de inóculo, NI36, NI72, NI108 e NI144. Após a inoculação, as sementes foram distribuídas individualmente, em copos plásticos com substrato (composto orgânico + areia), com quatro repetições de 25 sementes cada por tratamento. Ao final de vinte e oito dias, todas as plantas foram analisadas quanto à presença do patógeno por métodos biológico e molecular (PCR convencional). A maior taxa de transmissão total do patógeno em estudo, na temperatura de 20°C, o isolado 1 foi de 86% em NI144, enquanto, para o isolado 2, os maiores percentuais aconteceram em NI72 e NI108, representando 41 e 55% de transmissão. Amostras de plantas mantidas a 25°C apresentaram maiores taxas de transmissão, no maior nível de inóculo, sendo, para o isolado 1, 86,6% de transmissão e, para o isolado 2, taxa de transmissão total de 74%.

Palavras-chave: patologia de sementes; nível de inóculo; mancha-alvo. algodão.

ABSTRACT

Cotton seeds infected by *Corynespora cassiicola* can cause a variety of losses to the crop. The transmission of this pathogen through seeds can vary according to several factors, including host genotype, climatic conditions, and nature of the pathogen. This study aimed to evaluate the transmission rate of two isolates of *C. cassiicola* from cotton seeds using artificially infected seeds with cultivation at two temperatures (20 °C and 25 °C). The seeds were inoculated using the water conditioning method, exposing the seeds to colonies of the fungus for 36 h, 72 h, 108 h, and 144 h, which corresponded to the different inoculum levels, NI36, NI72, NI108, and NI144. After inoculation, the seeds were distributed individually in plastic cups with the substrate (organic compost + sand), with 4 replicates of 25 seeds each per treatment. At the end of twenty-eight days, all the plants were analyzed for the presence of the pathogen using biological and molecular methods (conventional PCR). The highest total transmission rate of the pathogen under study at 20°C, isolate 1 was 86% in NI144, while for isolate 2, the highest percentages occurred in NI72 and NI108, representing 41 and 55% transmission. Plant samples collected at 25°C showed higher transmission rates at the highest inoculum level, with isolate 1 showing 86.6% transmission and isolate 2 showing a total transmission rate of 74%.

Key words: seed pathology; inoculum level; targeted spot; cotton.

1 INTRODUÇÃO

Corynespora cassiicola é um patógeno necrotrófico, podendo sobreviver em restos culturais de espécies hospedeiras por até dois anos (Cardoso *et al.*, 2001; Kurosawa; Pavan; Rezende, 2005; Pernezny *et al.*, 2002) e em sementes (Roim, 2001). No Brasil, o referido fungo já foi relatado como agente etiológico da mancha-alvo, em diversas culturas de importância econômica, como o algodoeiro (Mehta; Motomura; Almeida, 2005; Teramoto *et al.*, 2013).

Para a grande maioria das espécies vegetais cultivadas, a semente é o principal insumo, sendo responsável pelo estabelecimento, expansão, diversificação e desenvolvimento dessas espécies em diferentes condições de cultivo. Trata-se de uma estrutura cuja qualidade pode ser avaliada, com base em quatro fatores de natureza genética, física, fisiológica e sanitária. Observa-se que sementes podem abrigar e transportar patógenos entre diferentes regiões e tornar-se fontes de inóculo nessas regiões de destino. Nesse caso, a detecção precoce do patógeno nas sementes e o estabelecimento de padrões sanitários de tolerância desses agentes, complementado por tratamento das sementes, apresentam-se como procedimentos recomendados e imprescindíveis para o manejo da mancha-alvo em algodoeiro e nos demais hospedeiros do patógeno.

Informações sobre a transmissão de *C. cassiicola* por sementes de algodão têm sido raras em literatura e isso demonstra a pouca atenção voltada para esse aspecto desse patossistema nas condições brasileiras. Inúmeros fatores influenciam a transmissão de patógenos das sementes contaminadas ou infectadas para as plantas em ambientes de cultivo. Nível de incidência, posição e potencial de inóculo do patógeno, em associação com sementes, ao lado de fatores genéticos, ambientais e manejo cultural, são exemplos de fatores que determinam a severidade dos danos que podem ser provocados pela associação de patógenos com sementes (Gadaga; Siqueira; Machado, 2020; Machado, 1994; Siqueira *et al.*, 2014, 2016).

A transmissão de *C. cassiicola* pelas sementes de algodão tem sido relatada na literatura como um fator importante no ciclo da mancha-alvo nesta cultura, porém de maneira superficial (Amorim *et al.*, 2016). Em geral, mais atenção tem sido dedicada à transmissão de *C. cassiicola* por sementes de outros hospedeiros, como soja (Goulart; Utiamada, 2020) e, em outros países, em que esse patógeno já se encontra estabelecido (Koenning; Creswell, 2006; Lu; Liu; Chang, 2021). Importante salientar que informações sobre eficácia do tratamento de sementes de algodão, visando ao controle do agente da mancha-alvo têm sido encontradas em literatura, sem, no entanto levar em conta a natureza ou grau de associação desse patógeno com sementes

dessa espécie. A consistência dos resultados desses estudos carece, por conseguinte, de bases científicas mais sólidas e pontuais.

Diante desse cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar a transmissibilidade de *C. cassicola*, a partir de sementes à progênie de algodão, levando-se em consideração fatores como níveis (potenciais) de inóculo inicial do patógeno nas sementes e ambientes de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Origem e multiplicação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, perfil das sementes utilizadas, inoculação de sementes e teste de sanidade

Foram utilizados dois isolados de *Corynespora cassiicola*, para a realização do trabalho, sendo um obtido da coleção micológica do Agrônoma Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, codificado como 9601 (1) e outro isolado da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, codificado como LAPS 312 (2). Ambos os isolados foram originalmente obtidos de plantas de soja procedentes de diferentes regiões de cultivo no Brasil. Inicialmente os dois isolados foram cultivados, em substrato contendo batata, dextrose e ágar (BDA), em placas de Petri, com incubação em câmara do tipo BOD à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Ao final desse período, foram obtidas culturas monospóricas dos isolados para uso na inoculação das sementes.

O grau de suscetibilidade à mancha-alvo das sementes de algodão, utilizadas neste trabalho, pertencentes à cultivar FM 944GL (BASF), não é conhecido, embora preliminarmente tenha sido verificado a sua susceptibilidade aos isolados utilizados. A sua sanidade foi determinada, por meio de testes de laboratório realizados, de acordo com os protocolos disponíveis, seguindo as Regras para Análises de Sementes no Brasil (Brasil, 2009a, 2009b). As sementes utilizadas nestes estudos encontravam-se isentas de *C. cassiicola* e apresentaram um percentual de germinação de 93%.

2.2 Inoculação das sementes

Para a obtenção de sementes de algodão com diferentes níveis de inóculo de *C. cassiicola*, foi utilizada a metodologia de condicionamento hídrico (Machado *et al.*, 2001, 2012). Inicialmente as sementes foram desinfestadas, utilizando hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e lavadas três vezes com água destilada e secas entre folhas de papel germitest em sala climatizada a 20°C por 48 horas. Colônias de *C. cassiicola* foram obtidas, a partir de culturas monospóricas, desenvolvidas em placas de Petri de 15cm com meio BDA + manitol, com

potencial hídrico ajustado a $-1,0$ MPa (Michel; Radcliffe, 1995). Após sete dias, as sementes foram distribuídas sobre as colônias fúngicas, em camadas simples, tendo-se o cuidado de posicioná-las em contato físico direto com o fungo. As sementes foram mantidas sobre as colônias fúngicas por períodos de 36, 72, 108 e 144 horas, equivalentes aos níveis de inóculo do patógeno, estabelecidos para este estudo, com denominações: NI36, NI72, NI108 e NI144, respectivamente e acondicionadas em câmaras do tipo BOD, sob temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após esse tratamento, as sementes foram retiradas e secas em folhas de papel germitest, em sala climatizada, por um período de 48 horas. Para a avaliação do efeito do restritor hídrico, as sementes foram também colocadas em placas de Petri, contendo apenas o meio BDA, acrescido de manitol pelos mesmos períodos de tempo já mencionados e, em seguida, submetidas à secagem da mesma maneira descrita para sementes inoculadas. Uma testemunha absoluta NI0 (sem manitol e não inoculada) foi também adicionada ao experimento.

2.3 Teste de sanidade

Para o cálculo das taxas de transmissão, foi utilizado Blotter test que detecta e confirma a presença de *C. cassiicola* nos diferentes níveis de inóculo do patógeno. Por esse teste, as sementes de algodão inoculadas foram distribuídas sobre três discos de papel de filtro, umedecidos com ágar água (5g de ágar/L), acrescidos de 2,4-D (diclorofenoxiacetato de sódio – concentração de 10 ppm), acondicionados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Foram utilizadas cinco repetições de 40 sementes por placa, mantidas em câmaras do tipo BOD com fotoperíodo de 12 h, a 20°C , em câmara de incubação de sementes, por sete dias. Após esse período, as sementes foram examinadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e microscópio ótico (Brasil, 2009b). Os resultados foram expressos em porcentagem de incidência.

2.4 Avaliação da transmissão de *Corynespora cassiicola* em câmara de cultivo vegetal

Cem sementes de algodão de cada tratamento foram distribuídas individualmente em copos plásticos de 300 mL, contendo uma mistura autoclavada de substrato comercial (Tropstrato HA hortaliças saco de 25 kg) com areia na proporção 1:1. Os copos foram dispostos em grupos de 25 por bandeja de tamanho 48 x 29 x 10 cm, sendo cada bandeja correspondente a uma repetição. O experimento foi conduzido, em duas câmaras de cultivo vegetal, com temperaturas ajustadas em $20\pm 2^\circ\text{C}$ e $25\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas luz (luz do dia NSK

T10 40W 6500K FL40T10-6 60Hz)/12 horas escuro. Foi avaliada, diariamente, a emergência de plantas com sintomas da doença em questão (sintomáticas) e plantas sem sintomas, mas com posterior comprovação da presença do patógeno causador da doença (assintomáticas). Plantas sintomáticas foram assepticamente colocadas e incubadas em placas de Petri, contendo o meio BDA para a confirmação da presença de *C. cassiicola* nos tecidos avaliados. Após 28 dias da semeadura (d.a.s), todas as plantas emergentes foram coletadas e fragmentos de 2 cm de extensão à altura do colo (C) e última inserção das folhas (IF) foram desinfestados em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e três vezes em água destilada e esterilizada, por 1 minuto e secos em papel esterilizado. Todos os fragmentos foram depositados em placas de Petri com o meio BDA e incubadas à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias, os fragmentos foram analisados individualmente, no microscópio estereoscópico, para a observação de estruturas características *C. cassiicola*.

A presença de *C. cassiicola* em pelo menos um dos fragmentos examinados por planta foi suficiente para a confirmação da transmissão de *C. cassiicola* da semente para a planta emergida.

2.5 Detecção de *C. cassiicola* em plantas assintomáticas por meio da técnica PCR convencional

2.5.1 Extração de DNA

Fragmentos de plantas assintomáticas foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido até adquirir a consistência de um pó fino. As culturas fúngicas puras de *C. cassiicola*, utilizadas como controle positivo, foram cultivadas, durante sete dias em meio BDA e a maceração foi realizada da mesma forma que utilizada para os fragmentos de plantas. Três sub amostras de 40 g foram retiradas de cada amostra. Para a extração de DNA, foi utilizado o kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), conforme instruções do fabricante. Para a amplificação dos fragmentos específicos em sementes inoculadas, foi utilizado o primer GA4-F/GA4-R (Dixon *et al.*, 2009). O mesmo primer foi testado por Sousa, Siqueira e Machado (2016), para a detecção de *C. cassiicola* em sementes de soja. Para a cultura do algodão, até o momento, nenhum estudo foi realizado.

2.5.2 PCR convencional

Para o desenvolvimento da PCR, foi utilizado o kit All Taq Master Mix (QIAGEN). A amplificação foi realizada, em 20 µl da reação, em que foi adicionado um mix, contendo AllTaq Master Mix (AllTaq DNA Polimerase, tampão AllTaq PCR e dNTPs) (1,5 µl), Master Mix Tracer (48 µl) e primers (180 µl). A amplificação do fungo foi inicialmente de desnaturação de 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 segundos, anelamento de 58 °C por 30 segundos e extensão de 72 °C por 45 segundos, com extensão final de 72 °C por 5 minutos. 20 µl foi utilizado para analisar os produtos da PCR em gel de agarose 1,2% corado com GelRed (Biotium), (com corrida eletroforética realizada a 120 V). Os produtos da PCR foram observados em transluminador UV.

2.6 Análises estatísticas

Para o teste de sanidade, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC). As análises de variância foram realizadas individualmente para cada isolado, além do controle (não inoculado).

Para as variáveis, morte em pré-emergência e taxas de transmissão com observação de plantas sintomáticas e assintomáticas, foi realizada a análise exploratória dos dados, para verificação de presença de *outlayer*, normalidade e homoscedasticidade, a fim de verificar sua força e confiabilidade. Após a análise inicial e a confirmação da normalidade, foi feita a análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade. Nas variáveis que apresentaram diferença significativa pelo teste R, foi feito o estudo de correlação e, para as que apresentaram de média a forte correlação, foi feito o estudo de regressão para ajuste de equação. Nas variáveis, em que não houve ajuste de equação, apresentando correlação fraca entre as variáveis respostas e os tratamentos, mas apresentaram diferenças significativas no teste F, foi aplicado o teste de skott-knott, a 5%, para análise múltipla de médias. Todas as análises foram realizadas, utilizando os pacotes tidyverse, corr, vegan, deplyr e agricolae do programa estatístico RStudio.

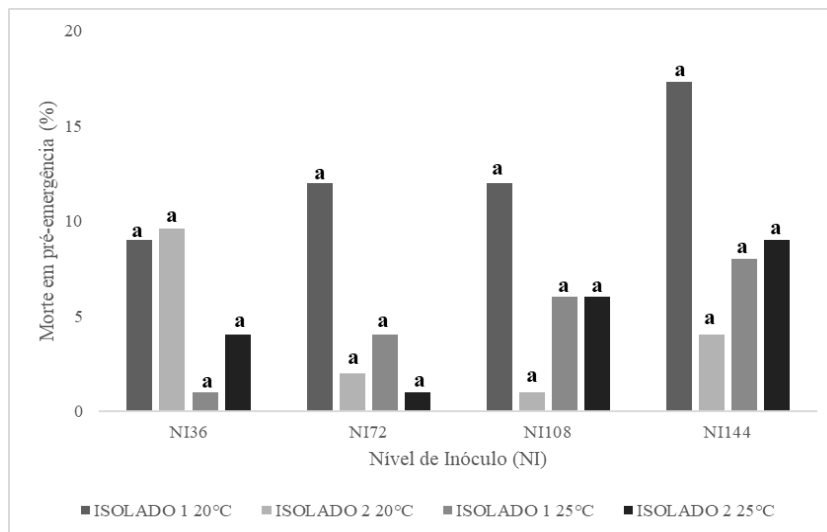
Para a taxa de transmissão total, consideraram-se todos os percentuais de morte em pré-emergência e das taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas.

3 RESULTADOS

Pelo teste de sanidade aplicado inicialmente nas sementes inoculadas, observou-se incidência de 100% do isolado 1. Nas sementes inoculadas com o isolado 2, a incidência do patógeno foi variável entre os níveis de inóculo, cabendo ao nível NI36 o menor valor, 85,5%, e os demais apresentando os valores de 97%, 95%, 96%, respectivamente.

Pela análise dos fatores relacionados à morte de sementes/plântulas em pré-emergência, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas, quando comparados os níveis de inóculo dos isolados 1 e 2 e temperaturas (20 e 25°C). Contudo observou-se uma tendência de aumento do número de sementes e plântulas mortas em pré-emergência, na proporção de aumento dos níveis de inóculo de *C. cassiicola*, nas sementes em ambos isolados, nas duas temperaturas de cultivo (Figura 1).

Figura 1 - Percentual de morte de sementes/plântulas de algodão em pré-emergência, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108 e NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).

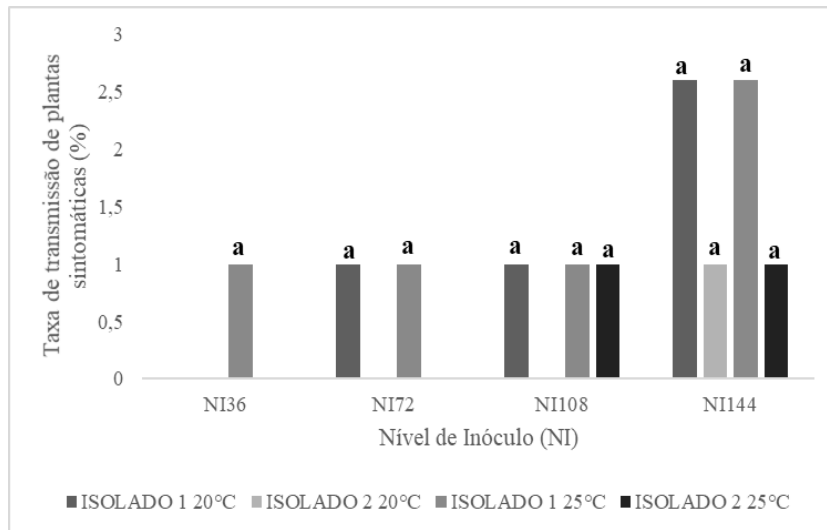


Fonte: Da autora (2024).

A transmissão de *C. cassiicola*, a partir de sementes para as plantas sintomáticas (Figura 2) e assintomáticas (Figura 3), foi observada, neste estudo, por meio de confirmação da presença do fungo, em tecidos dessas plantas, em isolamentos realizados em laboratório. Com base nessas observações, verificou-se que as taxas de transmissão do fungo, em plantas sintomáticas, não apresentaram diferenças entre si, enquanto a taxa de transmissão do fungo,

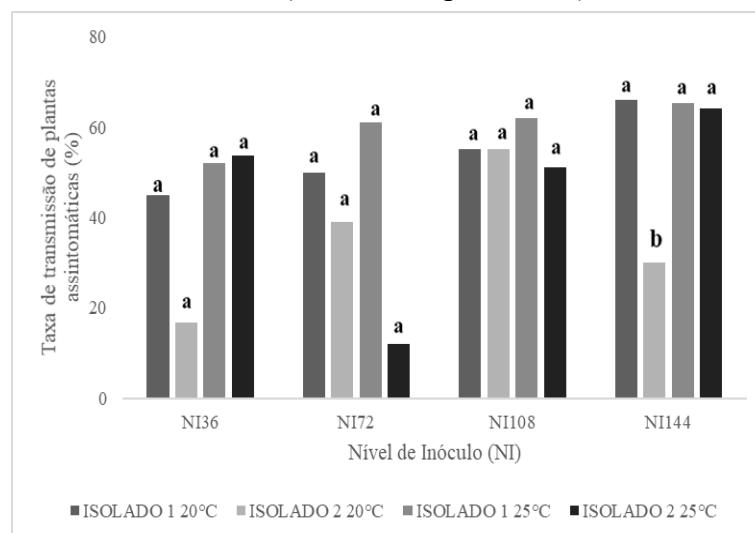
em plantas assintomáticas, isolado 2, na temperatura de 20°C, diferenciou-se dos demais no nível de inoculo NI144.

Figura 2 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes à progênie com formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inoculo, (NI36, NI72, NI108, NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).



Fonte: Da autora (2024).

Figura 3 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes para plantas assintomáticas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inoculo, (NI36, NI72, NI108, NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).

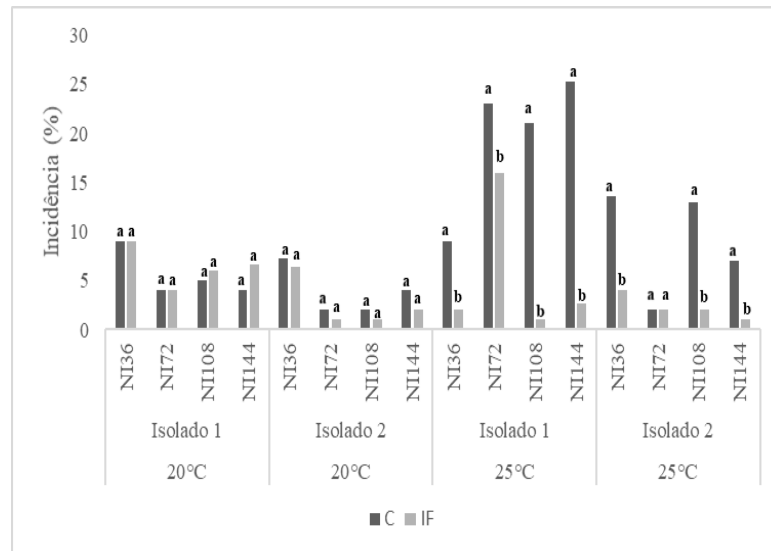


Fonte: Da autora (2024).

Em relação à taxa de transmissão de *C. cassiicola* de sementes de algodão às plantas assintomáticas, considerando-se as partes da planta analisada, colo (C) e a região da última inserção de folhas (IF), observou-se uma variação entre os valores, sem haver um padrão

consistente nesse tipo de associação, observando-se maior percentual de incidência do patógeno, na temperatura de 25°C, para ambos os isolados (Figura 4).

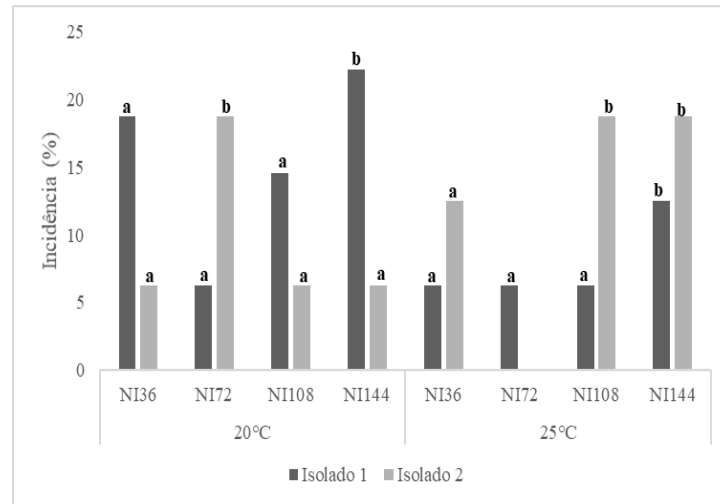
Figura 4 - Incidência de *Corynespora cassiicola* em plantas assintomáticas, seccionadas em: colo (C) e inserção foliar (IF), em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108, NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).



Fonte: Da autora (2024).

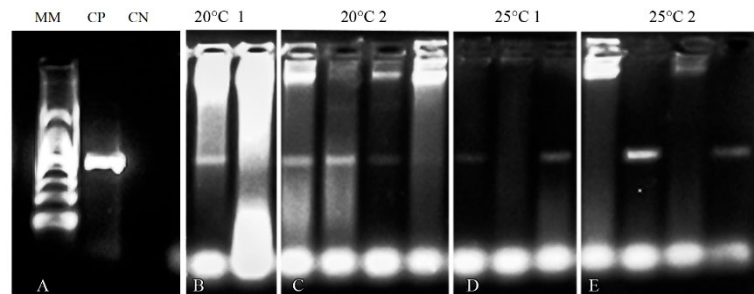
Nas avaliações feitas por meio da técnica de PCR convencional, para detectar a presença de *C. cassiicola*, nos fragmentos de plantas assintomáticas, em todos os níveis de inóculo (Figura 5), observou-se que a maior incidência do isolado 1 ocorreu, a partir de sementes com o nível de inóculo NI144 e temperatura de 20 °C, enquanto, na temperatura de 25°C, o maior percentual de incidência do patógeno ocorreu no mesmo nível de inóculo, mas para o isolado 2.

Figura 5 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108, NI144), por meio a técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

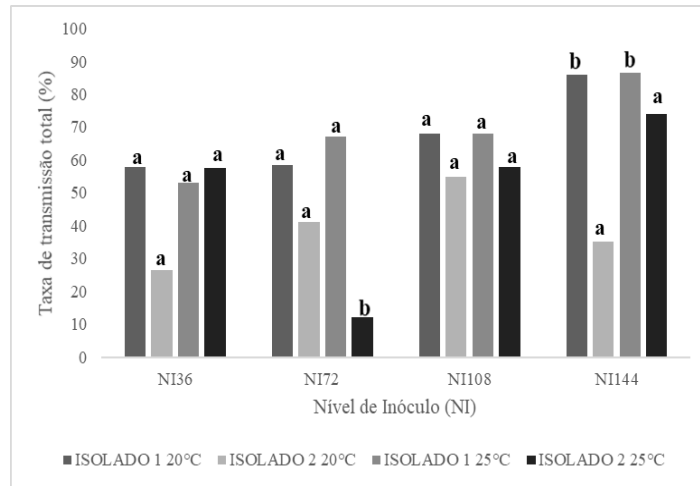
Figura 6 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, por meio da técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. (A) MM- Marcador molecular, CP- Controle positivo e CN- Controle negativo; (B) Isolado 1, 20°C; (C) Isolado 2, 20°C; (D) Isolado 1, 25°C; (E) Isolado 2, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

De modo geral, a taxa de transmissão total de *C. cassiicola* por sementes de algodão apresentou maiores valores na progênie oriunda de sementes com níveis de inóculo mais elevados. Na temperatura de 20°C, o isolado 1 apresentou uma taxa de transmissão de 86%, a partir de sementes com nível de inóculo de NI144, enquanto, para o isolado 2, os maiores percentuais de taxa de transmissão aconteceram, em sementes com níveis de NI72 e NI108, correspondendo a 41 e 55% de transmissão. Amostras de plantas emergidas a 25°C apresentaram maiores taxas de transmissão, em ambos os isolados, no maior nível de inóculo, tendo o isolado 1 apresentado uma taxa de 86,6% e o isolado 2 uma taxa média de transmissão de 74%.

Figura 7 - Taxa de transmissão total de *C. cassiicola*, relativa ao somatório de sementes/plântulas com morte em pré-emergência, plantas sintomáticas e assintomáticas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108, NI144) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).



Fonte: Da autora (2024).

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, os resultados mostram que o fungo *C. cassiicola* não foi capaz de provocar efeito significativo na morte de sementes e plântulas de algodão em pré-emergência. Contudo seus efeitos podem ser observados, posteriormente, pelo aparecimento de micélio do fungo, na emergência das plântulas e nas sementes não germinadas, que constituem fontes de inóculo que podem disseminar o patógeno na cultura e nas safras seguintes. As taxas de transmissão de *C. cassiicola* por sementes de algodão calculadas neste trabalho, com base em algumas variáveis, seguem o mesmo padrão de outros patossistemas, como nos casos de *C. lindemuthianum* – feijão comum, *Stenocarpella macrospora* – milho, *Sclerotinia sclerotiorum* – soja, feijão e girassol (França *et al.*, 2021; Gadaga; Siqueira; Machado, 2020; Siqueira *et al.*, 2014; Zancan *et al.*, 2015). Em todos esses casos, as taxas de transmissão apresentaram uma relação de proporcionalidade direta com os níveis de inóculo de cada patógeno nas sementes de seus respectivos hospedeiros.

Com base em observações de plantas sintomáticas da mancha-alvo neste estudo, verifica-se que a taxa de transmissão do patógeno pelas sementes foi relativamente baixa nas duas temperaturas e para os dois isolados utilizados. Esse fato pode ser atribuído ao ambiente de cultivo que, por ser controlado, pode não ter sido devidamente favorável ao desenvolvimento dos sintomas típicos da mancha-alvo, como seria o caso em condições naturais de cultivo no campo. Em sementes com nível de inoculo NI36, somente o isolado 1, a 25°C, apresentou transmissão do patógeno, enquanto, no maior nível de inóculo, NI144, todos os isolados apresentaram transmissão a plantas sintomáticas confirmada. Importante salientar que o fungo *C. cassiicola* abrange uma larga faixa de temperatura favorável ao seu desenvolvimento (Bowen *et al.*, 2018), provavelmente, por esse fator, a temperatura não foi determinante para a transmissão do patógeno em plantas sintomáticas.

Em relação à transmissão de *C. cassiicola* via sementes de soja às plantas assintomáticas, observou-se que as taxas de transmissão desse patógeno foram mais elevadas, a partir do nível de inóculo mais baixo, aumentando na proporção do aumento do nível de inóculo, nas sementes, independente da temperatura e isolado em questão. Essa tendência evidencia que o fungo, quando presente na semente, requer condições de cultivo especiais para que possa apresentar os sintomas, que, em sua maioria, manifestam mais intensamente ao final do ciclo. Com base nos resultados deste estudo, verificou-se também que, com o aumento dos níveis de inóculo, a ocorrência do fungo também aumentou nos fragmentos examinados (C e IF), na temperatura 20°C e para ambos isolados. Estudos com outros patossistemas que

utilizaram o mesmo modelo de determinação da taxa de transmissão via sementes, como no caso de *C. lindemuthianum* em feijão comum (Gadaga; Siqueira; Machado, 2020), *S. macrospora* e *S. maydis* em milho e outros, revelaram que, na metodologia de determinação da taxa total de transmissão dos patógenos, é extremamente importante e indispensável analisar fragmentos de plantas assintomáticas. Nos estudos conduzidos com o patossistema *Colletotrichum lindemuthianum* e sementes de feijão comum, observou-se que, nas análises de fragmentos de plantas de feijão assintomáticas, que tiveram suas sementes inoculadas com o agente da antracnose e com o cultivo a temperatura de 20°C, houve um maior percentual da incidência do patógeno, na região do colo, em comparação com a análise de fragmentos na região da última inserção de folhas da planta, em todos os níveis de inóculo estudados. Presença de patógenos, em tecidos de plantas assintomáticas de milho, foi também demonstrada por Siqueira *et al.* (2014, 2016) envolvendo espécies de *Stenocarpella*.

A exemplo do que tem sido relatado para outros patossistemas como *Sclerotinia sclerotiorum* – feijoeiro e soja, *C. lindemuthianum*- feijoeiro, *Exserohilum turcicum*, *S. macrospora* e *S. maydis* – milho (França *et al.*, 2021; Guimarães, 2020; Siqueira *et al.*, 2014, 2016), as maiores taxas de transmissão de *C. cassicola*, em sementes de algodão, ocorreram nos maiores níveis de inóculo nas sementes de algodão. Os valores dessas taxas atingiram percentuais em torno de 86% no nível de inóculo NI144.

Esses resultados levantam a preocupação e a necessidade de se determinar padrões de qualidade sanitária de *C. cassicola*, em amostras de sementes de espécies hospedeiras como o algodoeiro, tendo em vista as consequências que esse tipo de associação pode gerar aos produtores rurais e ao sistema agrícola, em geral, em termos de prejuízos imediatos e em longo prazo.

5 CONCLUSÃO

O fungo *C. cassicola* é transmitido de sementes às plantas de algodão em intensidades variáveis, em função dos níveis de inóculo do patógeno nas sementes, da variabilidade do patógeno e das condições de ambiente de cultivo de algodão considerados neste estudo.

C. cassicola pode ser transmitida às plantas de algodão e permanecer viável em tecidos de plantas assintomáticas. Neste trabalho, desenvolvido em condições controladas de cultivo, a maior incidência do fungo ocorreu em plantas assintomáticas.

A taxa de transmissão máxima de *C. cassicola*, a partir de sementes de algodão inoculadas, foi de 86%.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. *et al.* **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016. 573 p.
- BOWEN, K. L. *et al.* Epidemics and yield losses due to *Corynespora cassiicola* on cotton. **Plant Disease**, Quebec, v. 102, n. 12, p. 2494-2499, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009a. 399 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009b. 200 p.
- CARDOSO, M. O. *et al.* **Doenças das cucurbitáceas no estado do Amazonas**. Itacoatiara: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. (Circular técnica, 9).
- DIXON, L. J. *et al.* Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 9, p. 1015-1027, 2009.
- FRANÇA, S. K. S. D. *et al.* Quantification and conceptual validation of the inoculum potential of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and bean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 43, p. 1-11, 2021.
- GADAGA, S. J. C.; SIQUEIRA, C. D. S.; MACHADO, J. D. C. Transmission potential of *Colletotrichum lindemuthianum* (race 65) in association with bean seeds under controlled conditions. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 42, p. 1-9, 2020.
- GOULART, A. C. P.; UTIAMADA, C. M. *Corynespora cassiicola* in soybean seeds: incidence and transmission. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 36, p. 259-265, 2020.
- GUIMARÃES, M. D. R. F. **Interactions between *Exserohilum turcicum* and maize seeds: detection, effects and transmission of the pathogen**. 2020. 84 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.
- KOENNING, S. R.; CRESWELL, T. C. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in southeastern United States. **Plant Disease**, Quebec, v. 90, n. 7, p. 974, 2006.
- KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATHI, H. *et al.* (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 293-302.
- LU, P. K.; LIU, H. H.; CHANG, H. X. First report of *Corynespora cassiicola* causing target spot on soybean in Taiwan. **Plant Disease**, Quebec, v. 105, n. 11, p. 3753, 2021.
- MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

MACHADO, J. C. *et al.* Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. *In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM*, 26., 2001, Angers. **Proceedings** [...]. Angers: ISTA, 2001. p. 62.

MACHADO, J. C. *et al.* Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 37-63, 2012.

MEHTA, Y. R.; MOTOMURA, K. F.; ALMEIDA, W. P. *Corynespora* leaf spot of cotton in Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 131, 2005.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A. Computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, 1995.

PERNEZNY, K. *et al.* Control of target spot of tomato with fungicides, systemic acquired resistance activators, and a biocontrol agent. **Plant Protection Science**, Prague, v. 38, n. 3, p. 81-88, 2002.

ROIM, F. L. B. **Morfologia e patologia de isolados de *Corynespora cassiicola* obtidos de mancha foliar (mancha-alvo) e podridão radicular da soja**. 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2001.

SIQUEIRA, C. S. *et al.* Potential for transmission of *Stenocarpella macrospora* from inoculated seeds to maize plants grown under controlled conditions. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 154-161, 2014.

SIQUEIRA, C. S. *et al.* Transmission of *Stenocarpella maydis* by maize seeds. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 2, p. 393-400, 2016.

SOUSA, M. V. D.; SIQUEIRA, C. D. S.; MACHADO, J. D. C. Conventional PCR for detection of *Corynespora cassiicola* in soybean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 85-91, 2016.

TERAMOTO, A. *et al.* Reação de cultivares de soja à *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 38, p. 68-71, 2013.

ZANCAN, W. L. A. *et al.* Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled conditions. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 3, p. 775-784, 2015.

ARTIGO 3 - EFEITOS DE *Corynespora cassiicola* NO DESEMPENHO DE SEMENTES DE SOJA TRATADAS E NÃO TRATADAS COM FUNGICIDAS QUÍMICOS

Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.

RESUMO

A mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, é uma das principais doenças da cultura da soja e está presente em todas as áreas em que essa espécie é cultivada. Sua associação com as sementes de espécies hospedeiras ainda não foi plenamente elucidada, verificando-se apenas que o fungo tem sido detectado em sementes de soja pelos testes de sanidade disponíveis. Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos de *C. cassiicola*, no desempenho das sementes de soja, em condições de laboratório e em câmaras de cultivo vegetal. Para este estudo, foram considerados: uma cultivar (M5917 IPRO) susceptível ao patógeno, dois isolados do fungo, três níveis de inóculo do patógeno nas sementes, tratamento químico de sementes, e duas temperaturas de cultivo (teste de emergência). Aplicaram-se testes-padrão de sanidade, germinação e vigor (condutividade elétrica) das sementes em laboratório e teste de emergência, em ambiente de cultivo controlado, pelo qual são avaliados estandes, vigor (Índice de velocidade de emergência - IVE), altura e peso de plantas frescas e secas e índice de doenças/dano. A presença de ambos os isolados de *C. cassiicola*, em sementes de soja, foi prejudicial ao desenvolvimento das sementes inoculadas havendo variações de intensidade entre as variáveis utilizadas para esse tipo de avaliação. Observou-se que os efeitos negativos no desempenho das sementes foram mais evidenciados nos níveis de inóculo mais elevados de ambos os isolados e em ambiente com temperatura mais baixa. Com base em algumas variáveis utilizadas, observou-se uma diferença de efeitos entre os dois isolados do patógeno. O uso do tratamento químico de sementes é uma ferramenta importante e eficaz para a redução do patógeno em associação com a semente.

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

ABSTRACT

Target spot, caused by the fungus *Corynespora cassiicola*, is one of the main diseases of the soybean crop and is present in all areas where this species is grown. Its association with the seeds of host species has not yet been fully elucidated, and all that is known is that the fungus has been detected in soybean seeds by the available health tests. Given the above, the main objective of this study was to evaluate the effects of *C. cassiicola* on the performance of soybean seeds under laboratory conditions and in plant culture chambers. The following were considered for this study: a cultivar (M5917 IPRO) susceptible to the pathogen, two isolates of the fungus, three levels of pathogen inoculum in the seeds, chemical seed treatment, and two cultivation temperatures (emergence test). Standard seed health, germination, and vigor (electrical conductivity) tests were carried out in the laboratory, as well as an emergence test in a controlled cultivation environment, which evaluates stand, vigor (emergence speed index - ESI), height, and weight of fresh and dry plants and the disease/damage index. The presence of both isolates of *C. cassiicola* in soybean seeds was detrimental to the development of inoculated seeds, with variations in intensity between the variables used for this type of evaluation. It was observed that the negative effects on seed performance were more evident at higher inoculum levels of both isolates and in a lower temperature environment. Based on some of the variables used, a difference in effects was observed between the two pathogen isolates. Chemical seed treatment is an important and effective tool for reducing pathogens associated with the seed.

Key words: germination; seeds quality; vigor.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem sido praticado em intensidade crescente, em diversas regiões do mundo, sendo o Brasil o seu maior produtor com uma área cultivada de 45 milhões de hectares e uma produção de 154 milhões de toneladas de grãos na safra 2022/23 (Brasil, 2023; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2023b).

De acordo com levantamento de safra grãos 2023/24, apresentado em outubro pela CONAB (Brasil, 2023), as projeções apontam um crescimento recorde da área de cultivo e produção de grãos de soja para essa safra.

Em razão da ocorrência de alguns fatores como o fenômeno de El Niño, que desencadeia condições negativas para o cultivo agrícola de soja e outras culturas de ciclo anual, estima-se que a produtividade da soja deve sofrer reduções significativas na safra atual em muitas regiões no país (Embrapa, 2023a; Instituto Nacional de Meteorologia - INMET, 2023).

De modo geral, as mudanças climáticas são causas importantes do surgimento de novas doenças, ou que acentuam os danos causados por doenças que já ocorrem nas regiões produtoras. O enfrentamento desses problemas envolve a aplicação de esquemas de manejo de natureza cultural e sanitária, tendo-se como base conhecimentos já disponíveis sobre as doenças e pragas que ocorrem com mais frequência nas áreas de cultivo. Para muitas doenças, as informações requeridas ao seu manejo adequado no Brasil, como é o caso da mancha-alvo, ainda são insuficientes e pouco conclusivas.

A mancha-alvo em soja, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, pode provocar danos diversos a essa cultura, culminando com reduções severas da produção. Observa-se que o patógeno pode atacar a soja desde o estágio de semente até a fase reprodutiva sob condições favoráveis ao seu desenvolvimento, como em ambientes de cultivo com predominância de temperaturas na faixa de 20 a 30°C e umidade relativa acima de 80% (Agrios, 2005).

Uma das medidas mais importantes de manejo de inúmeras doenças na cultura da soja, a exemplo do que ocorre com outras espécies cultivadas, é o emprego do tratamento sanitário de sementes, que visa controlar fitopatógenos associados a sementes e/ou que estejam presentes no solo, no qual afetam a emergência e o estabelecimento de plantas nas áreas de cultivo. Esse tipo de tratamento tem se mostrado de elevada eficácia ao controle de inúmeras outras doenças, na cultura da soja, havendo registros genéricos na literatura de seu uso para o controle do agente da mancha-alvo nesta espécie (Rondon; Lawrence, 2021; Teramoto *et al.*, 2017). Com base em conhecimentos já adquiridos com outras doenças, que têm relações com sementes de soja, como são os casos de antracnose, seca de haste e vagem, mofo-branco, murcha de fusarium,

tombamentos, manchas de cercospora, etc (Andrade, 2019; França *et al.*, 2021; Silva Júnior *et al.*, 2021), estima-se que o tratamento sanitário de sementes de soja constitui uma ferramenta potencial para o controle da mancha-alvo nessa espécie.

Sobre a interação de *C. cassicola* com sementes de soja, pouco é conhecida e relatada em literatura. Nesse sentido, a busca de conhecimentos mais aprofundados sobre o grau e natureza da associação do referido patógeno com sementes de soja torna se essencial e constitui o alvo deste trabalho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório Central de Análise de Sementes, no Departamento de Agricultura, ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Origem e multiplicação dos isolados de *Corynespora cassiicola* e perfil das sementes utilizadas

Foram utilizados dois isolados de *Corynespora cassiicola*, um obtido da coleção micológica do Agrônoma Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria codificado como 9601 (1) e outro procedente da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, codificado como LAPS 312 (2). Inicialmente, os isolados foram cultivados, em meio de cultura contendo batata dextrose ágar (BDA), em placas de Petri, 9 cm de diâmetro, com incubação em câmara do tipo BOD à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, foram obtidas culturas monospóricas de ambos os isolados para uso na inoculação das sementes.

As sementes de soja utilizadas, pertencentes à cultivar M5917 IPRO, não apresentavam registros de resistência/susceptibilidade à mancha-alvo. Pelos resultados dos testes de laboratório aplicados preliminarmente, segundo Brasil (2009a, 2009b), as sementes utilizadas neste estudo apresentavam se isentas de *C. cassiicola* e um percentual de germinação de 91%.

2.2 Inoculação de sementes

Para a obtenção de sementes de soja com diferentes níveis de inóculo de *C. cassiicola*, a inoculação foi realizada por meio da metodologia de condicionamento hídrico (Machado *et al.*, 2001, 2012). Sementes foram inicialmente desinfestadas, utilizando hipoclorito de sódio 1% por 1(um) minuto e, em seguida, lavadas três vezes com água destilada e secas entre folhas de papel germitest, em sala climatizada a 20°C por 48 horas. Colônias de *C. cassiicola* obtidas, a partir de culturas monospóricas, obtidas em placas de Petri de 15cm com meio BDA + manitol, com potencial hídrico ajustado a -1,0 MPa (Michel; Radcliffe, 1995). Após sete dias, as sementes de soja foram distribuídas sobre a colônia fúngica, em camadas simples, tendo-se o cuidado de manter as sementes em contato físico com a colônia fúngica pelos períodos de 36, 72 e 108 horas, equivalentes a níveis de inóculo: NI36, NI72 e NI108, respectivamente e

acondicionadas, em câmaras do tipo BOD, sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. As sementes foram retiradas e secas, em folhas de papel germitest, em sala climatizada, por um período de 48 horas. Para a avaliação do efeito isolado do restritor hídrico, as sementes foram também colocadas em placas de Petri, contendo apenas o meio BDA acrescido de manitol, pelos mesmos períodos de tempo já mencionados e então secas da mesma maneira descrita para sementes inoculadas. Além de uma testemunha absoluta NI0 (sem manitol e não inoculada), foi adicionado ao experimento um tratamento químico das sementes com o produto (Metalaxil-M + Fludioxonil) nos dois níveis de inóculo: NI72 e NI108.

Pelo teste de germinação das sementes, não foram observados efeitos isolados do restritor hídrico manitol no percentual de germinação das sementes.

2.3 Avaliação da incidência, intensidade (nível) de inóculo e efeitos de *Corynespora cassiicola* na germinação e vigor das sementes em laboratório e no desempenho das sementes sob condições controladas de cultivo

2.3.1 Teste de sanidade

Para este teste, as sementes de soja inoculadas e não inoculadas foram distribuídas sobre três discos de papel de filtro umedecidos com ágar água (5g de ágar/L) acrescidos de 2,4-D (diclorofenoxiacetato de sódio – concentração de 10 ppm), acondicionadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Foram utilizadas cinco repetições de 40 sementes por placa, mantidas em câmaras do tipo BOD por fotoperíodo de 12 h, a 20°C em câmara de incubação de sementes, por sete dias. Após esse período, as sementes foram examinadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e microscópio óptico (Brasil, 2009b). Os resultados foram obtidos em porcentagens de incidência e de intensidade do fungo desenvolvido nas sementes. A intensidade correspondendo à área de cobertura visual das sementes por estruturas morfológicas do fungo. Nesse caso, os valores foram calculados, com base em uma escala de 0 a 4, em que 0= sementes livres de estrutura do fungo; 1(um)= sementes com até 25% da superfície coberta pelo patógeno; 2= 26-50%; 3= 51-75% e 4= 76-100%. O resultado final foi calculado usando-se a fórmula de McKinney (1923).

2.3.2 Teste de germinação em rolo de papel

O teste de germinação em Rolo de Papel foi conduzido com 200 sementes (quatro repetições de 50 sementes), as quais foram distribuídas sobre papel tipo germtest, umedecido com água destilada (2,5 vezes o peso do papel) e colocadas em germinador regulado à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas, aos cinco e aos doze dias após a semeadura, conforme os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009a). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

2.3.3 Teste de vigor (condutividade elétrica – CE)

Foram utilizadas 200 sementes em cada tratamento (quatro repetições de 50 sementes). Cada repetição foi pesada em balança de precisão (4,16 g), colocada em copo plástico (capacidade de 200 mL), contendo 75 mL de água deionizada e acondicionados em câmara do tipo BOD, à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Após esse período, efetuou-se a leitura da condutividade elétrica da solução de cada tratamento, utilizando-se condutivímetro MS TECNOPON[®], modelo mCA 150, previamente calibrado com uma solução padrão de KCl. As leituras obtidas foram subtraídas da leitura inicial da água (controle) e divididas pelo peso de cada repetição, sendo o resultado final expresso em $\mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, conforme descrito por Krzyzanowski, Vieira e França Neto (1999).

2.4 Testes de emergência em condições controladas

Cem sementes de algodão de cada tratamento foram distribuídas individualmente em copos plásticos de 300 mL, contendo uma mistura autoclavada de substrato comercial (composto Tropstrato HA hortaliças saco de 25kg) com areia (granulação média) lavada e autoclavada, na proporção 1:1. Os copos foram dispostos em grupos de 25 por bandeja de tamanho 48 x 29 x 10 cm, sendo cada bandeja correspondente a uma repetição. O experimento foi conduzido, em duas câmaras de cultivo vegetal, com temperaturas ajustadas em $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas/luz (luz do dia NSK T10 40W 6500K FL40T10-6 60Hz)/12 horas escuro.

2.4.1 Avaliação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE)

Para essa avaliação, foram realizadas contagens diárias da emergência das plantas a partir da primeira emergência de plântulas até a estabilização do estande. As plantas permaneceram em câmara de cultivo vegetal até 28 dias após a semeadura (d.a.s.). O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962).

$$IVE = \sum_{i=1}^n N_i/D_i, \text{ em que:}$$

IVE = índice de velocidade de emergência;

N_i = número de plantas germinadas na 1ª contagem, 2ª contagem, ...enésima contagem, respectivamente;

D_i = número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ...enésima contagem, respectivamente.

2.4.2 Avaliação de estande inicial e estande final

O estande inicial das plantas crescidas em câmara de cultivo vegetal a 20°C e 25°C foi registrado aos seis dias após a semeadura. Os estandes finais das plantas mantidas, em ambas as câmaras de cultivo, foram registrados aos 28 dias após a semeadura. Os valores absolutos foram transformados em porcentagem.

2.4.3 Avaliação da altura de plantas

Aos 28 d.a.s, foram realizadas medições de 10 plantas aleatórias, em cada repetição, as quais foram medidas desde a base do colo até o ápice foliar com o uso de uma régua graduada com precisão de milímetros.

2.4.4 Avaliação de massa de planta fresca e seca

Aos 28 dias após a semeadura, as plantas emergidas foram cortadas na região do colo e, na última inserção de folhas, com o auxílio de uma lâmina para bisturi e pesadas. Posteriormente, foram levadas à estufa com circulação forçada de ar, regulada a 70°C, em que permaneceram por sete dias e então pesadas novamente para a obtenção do peso de planta seca. Os resultados foram expressos em gramas (g).

2.4.5 Avaliação do índice de doenças/dano

Para o cálculo desse índice, lançou-se mão de uma escala de notas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5, na qual zero = plantas normais sem sintomas de infecção; 1(um) = plantas com massa de até 10% menor que a massa de plantas oriundas de sementes não inoculadas; 2= plantas com massa acima de 10% menor que a massa de plantas oriundas de sementes não inoculadas; 3= plantas com sintomas de necrose na haste e/ou folha; 4= plantas mortas em pós-emergência; e 5= sementes não germinadas. Os valores anotados foram submetidos à fórmula de McKinney (1923), que expressa valores médios percentuais de danos provocados pela doença em avaliação.

2.5 Análises estatísticas dos dados

Para os testes de germinação, sanidade e condutividade elétrica, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e o delineamento experimental dos testes de emergência, que avalia IVE, estande inicial e final, altura, peso da planta fresca e seca, foi em blocos ao acaso (DBC). As análises de variância foram realizadas individualmente, para cada isolado, além do controle (não inoculado)

A análise exploratória dos dados foi realizada, para a verificação de presença de outlayer, normalidade e homoscedasticidade a fim de verificar a sua força e confiabilidade. Após a análise inicial e a confirmação da normalidade, foi feita a análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade. Nas variáveis que apresentaram diferença significativa pelo teste R, foi feito o estudo de correlação e, para as que apresentaram de média a forte correlação, foi feito o estudo de regressão para ajuste de equação. Nas variáveis, em que não houve ajuste de equação, apresentando correlação fraca entre as variáveis respostas e os tratamentos, mas apresentaram diferenças significativas no teste F, foi aplicado o teste de skott-knott, a 5%, para análise múltipla de médias. Todas as análises foram realizadas, utilizando os pacotes tidyverse, corr, vegan, deplyr e agricolae do programa estatístico RStudio.

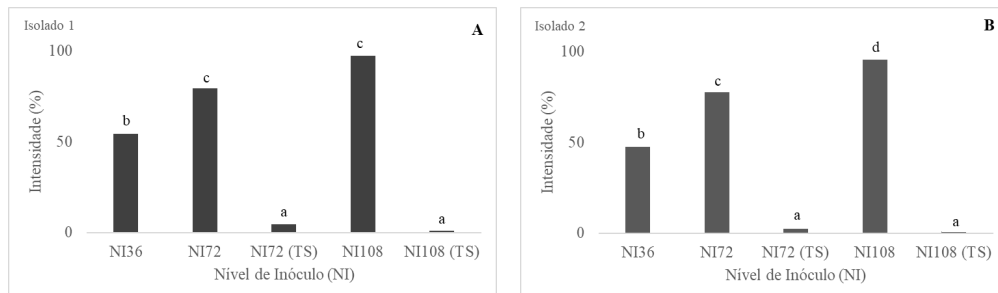
3 RESULTADOS

3.1 Incidência e intensidade de inóculo de *C. cassiicola* e qualidade fisiológica das sementes de soja

Pelo teste de sanidade, a incidência de *C. cassiicola* nas sementes inoculadas com o isolado 1 apresentou valores de 77%; 90,8%; 98,5% para os níveis de inóculo, NI36, NI72 e NI108 respectivamente e, quando as sementes com níveis de inóculo NI72 e NI108 foram submetidas ao tratamento químico, os valores de incidência foram 33,3% e 37,3%. Para o isolado 2, os valores de incidências do patógeno foram de 74,2%, 87,8% e 97,6% (sem tratamento) e 22,7% e 27,3% (com tratamento) nos níveis crescentes de inóculo utilizados.

Em relação à intensidade de inóculo quantificado neste estudo, Figuras 1A e 1B, observou-se que sementes inoculadas com níveis de inóculo de NI72 e NI108, tratadas com fungicidas, apresentaram os menores valores de intensidade do patógeno para ambos os isolados. Em nenhum caso, houve erradicação total do patógeno pelo tratamento de sementes aplicado neste ensaio. Para o isolado 1, não houve diferenças estatísticas de intensidade de inóculo entre sementes dos níveis NI72 e NI108, mas ambos apresentaram valores superiores estatisticamente à intensidade do nível NI36. (Figura 1 A). Em relação ao isolado 2, as sementes inoculadas apresentaram valores crescentes de intensidade de inóculo proporcionais aos níveis de inóculo utilizados.

Figura 1 - Intensidade de inóculo de *Corynespora cassiicola*, em sementes de soja inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI36, NI72, NI108) dos isolados 1 e 2. A - isolado 1 e B - isolado 2. Parte das sementes de NI72 e NI108 foram tratadas com fungicidas (TS).

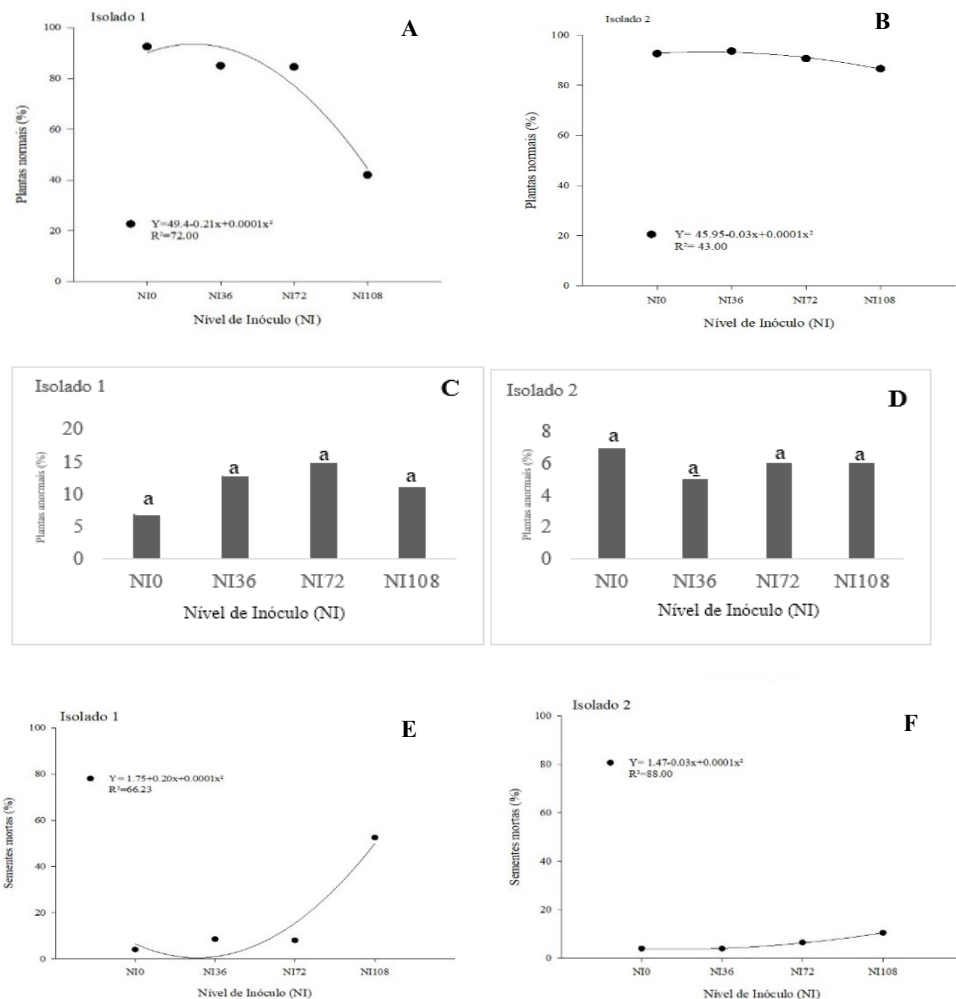


Fonte: Da autora (2024).

Pelos resultados dos testes de germinação, constatou-se que *C. cassiicola* provocou efeitos severos, no desempenho das sementes, havendo reduções proporcionais do percentual

dessa variável, na medida dos valores crescentes de níveis de inóculo de ambos os isolados. Nesse caso, houve uma proporcionalidade inversa de efeitos do patógeno, em relação aos valores de intensidade de inóculo e os valores das variáveis utilizadas para avaliar estes efeitos, como plantas normais, plantas anormais e plantas mortas (Figura 2 A, C, D, E). Em relação ao número de plantas anormais, não houve diferença estatística entre os níveis de inóculo para ambos os isolados (Figuras 2 B e F).

Figura 2 - Valores médios de percentuais de plantas normais, anormais e mortas observadas pelo teste de germinação de soja inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) dos isolados 1 e 2. Plantas normais: A – Isolado 1 e B – isolado 2. Plantas anormais: C - Isolado 1 e D – Isolado 2. Sementes mortas: E – Isolado 1 e F – Isolado 2.



Fonte: Da autora (2024).

Pela comparação dos resultados, considerando-se sementes inoculadas e tratadas quimicamente, observou-se que, no nível de inóculo NI72, isolado 1, houve diferença entre os tratamentos somente no percentual de sementes mortas (Figura 3 C), enquanto, para o isolado

2, houve um maior percentual de plantas normais oriundas de sementes inoculadas e tratadas e menor percentual de sementes mortas procedentes de sementes tratadas (Figuras 3 D e F). Em relação às plantas anormais, não se observou diferença estatística entre sementes tratadas e não tratadas (Figura 3 E). No nível de inóculo NI108, isolado 1, houve diferença entre os tratamentos no percentual de plantas normais (Figura 3 G), enquanto, no quesito plantas anormais, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figuras 3 I e J). Em relação às sementes mortas, observa-se um maior percentual em sementes não tratadas para ambos os isolados (Figuras 3 K e L).

Figura 3 - Valores percentuais de germinação de sementes de soja inoculadas (NI72 e NI108) tratadas e não tratadas dos isolados 1 e 2. NI72: Plantas normais: A – Isolado 1 e B – isolado 2. Plantas anormais: C - Isolado 1 e D – Isolado 2. Sementes mortas: E – Isolado 1 e F – Isolado 2. NI108: Plantas normais: G – Isolado 1 e H – isolado 2. Plantas anormais: I – Isolado 1 e J – Isolado 2. Sementes mortas: J – Isolado 1 e L – Isolado 2.

(Continua)

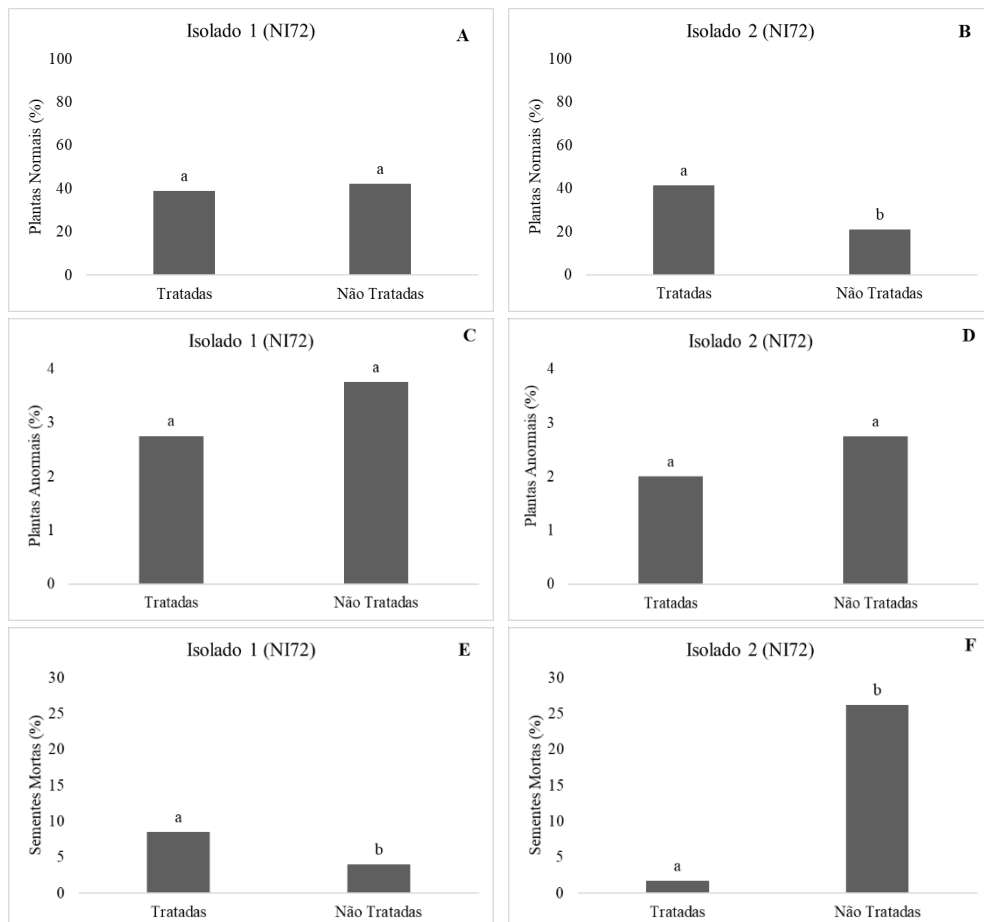
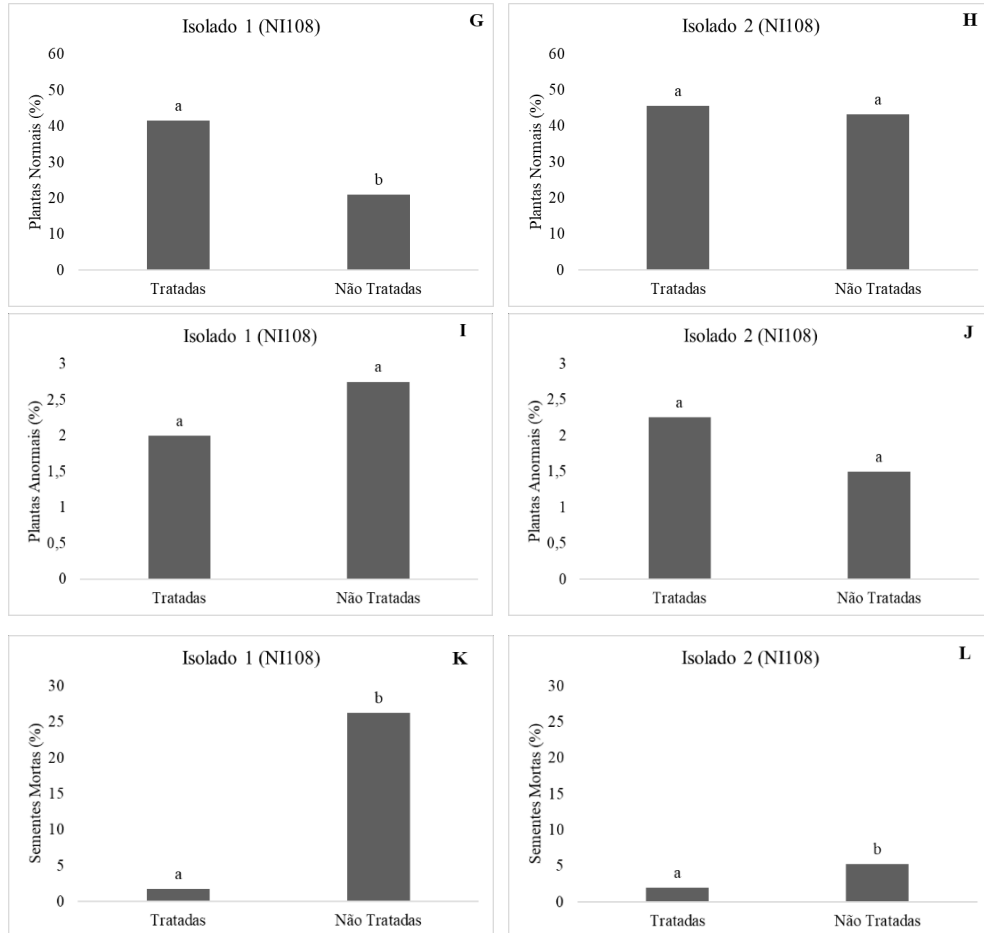


Figura 3 - Valores percentuais de germinação de sementes de soja inoculadas (NI72 e NI108) tratadas e não tratadas dos isolados 1 e 2. NI72: Plantas normais: A – Isolado 1 e B – isolado 2. Plantas anormais: C - Isolado 1 e D – Isolado 2. Sementes mortas: E – Isolado 1 e F – Isolado 2. NI108: Plantas normais: G – Isolado 1 e H – isolado 2. Plantas anormais: I – Isolado 1 e J – Isolado 2. Sementes mortas: J – Isolado 1 e L – Isolado 2.

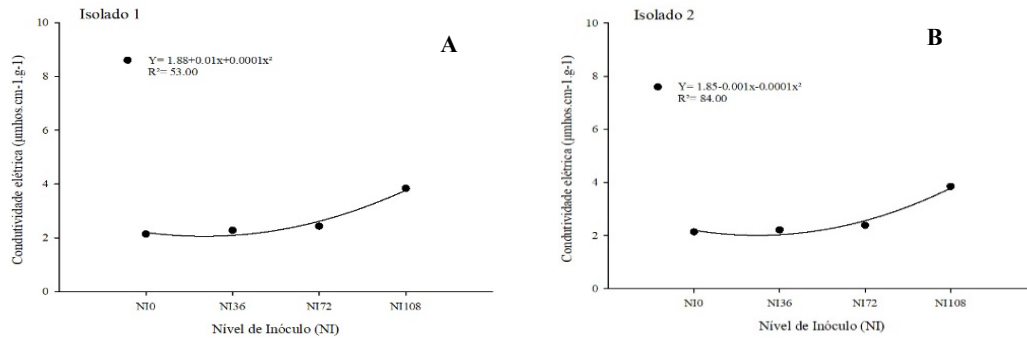
(Conclusão)



Fonte: Da autora (2024).

Os valores médios de vigor, avaliados pelo teste de condutividade elétrica, de ambos os isolados, revelam que *C. cassiicola* foi capaz de provocar efeitos mais acentuados, em sementes de soja no maior nível de inóculo, NI108, não havendo maiores distinções entre os valores referentes aos níveis de inóculo mais baixos (Figura 4 A e B).

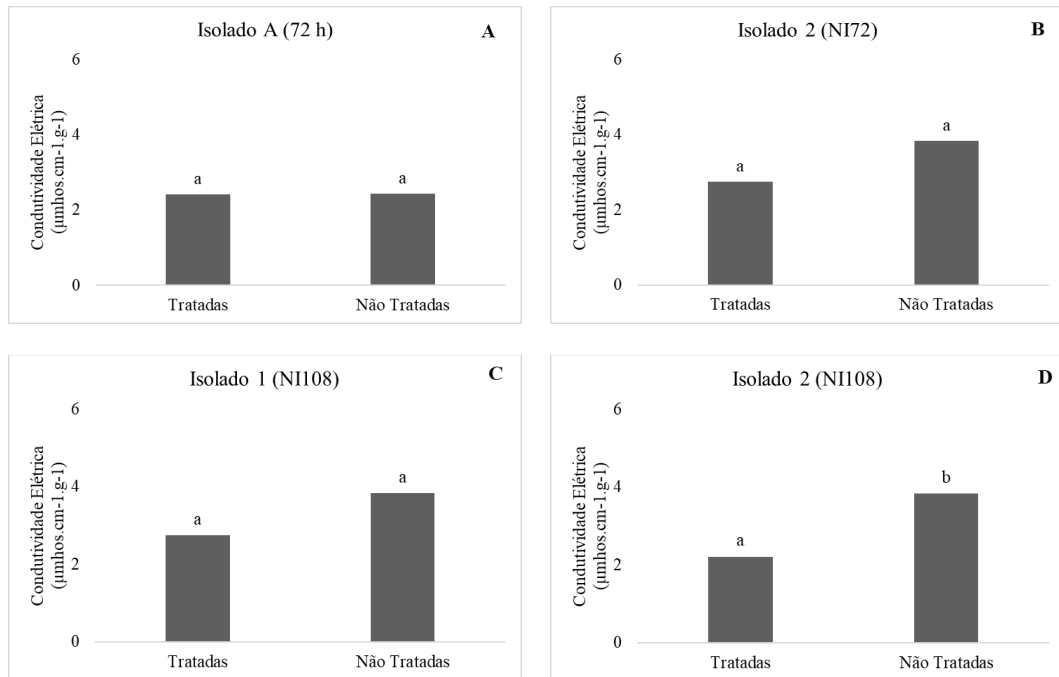
Figura 4 - Valores médios de condutividade elétrica ($\mu\text{S. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) de exsudatos de sementes de soja inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) dos isolados 1 e 2. A - isolado 1 e B - isolado 2.



Fonte: Da autora (2024).

Por sua vez, o efeito do patógeno, no vigor das sementes infectadas e tratadas com fungicidas, foi somente detectado e com diferença estatística para o isolado 2, em ambos os níveis de inóculo utilizados. (Figuras 5 A, B, C e D). Em geral, houve uma tendência de valores maiores de vigor em sementes que foram tratadas quimicamente.

Figura 5 - Valores médios de condutividade elétrica ($\mu\text{S. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) de exsudatos de sementes de soja inoculadas (NI72 e NI108) tratadas e não tratadas dos isolados 1 e 2. NI72: A – isolado 1 e B – isolado 2. NI108: C – isolado 1 e D – isolado 2.

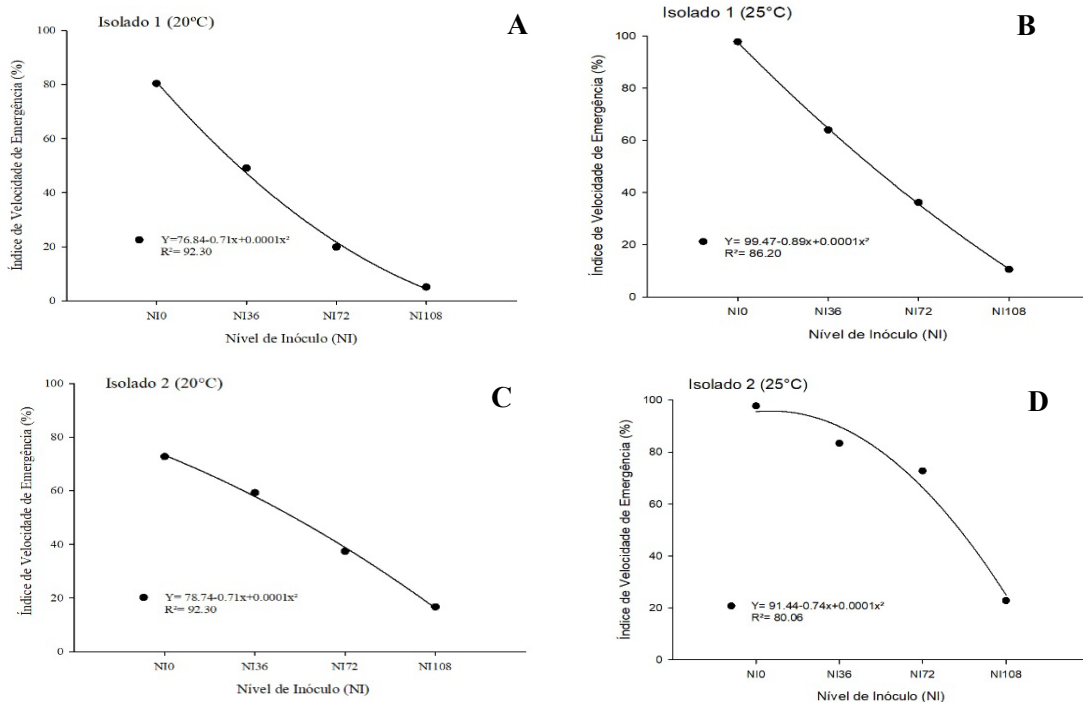


Fonte: Da autora (2024).

3.2 Efeitos de *C. cassiicola* no desenvolvimento inicial de soja, a partir de sementes inoculadas, com cultivo em condições controladas

Os resultados referentes ao índice de velocidade de emergência, IVE, que avaliam o vigor das sementes, em testes com o uso de substrato de cultivo, mostraram que o aumento do nível de inóculo dos isolados 1 e 2, na temperatura de 20 °C, levou à diminuição dos valores de IVE (Figuras 5 A e B), indicando que quanto maior o nível de inóculo do patógeno nas sementes, menor é a velocidade de emergência das plantas. Em condições de temperatura mais elevada, 25°C, houve um comportamento semelhante de ambos os isolados em relação à temperatura mais baixa, 20 °C (Figuras 6 C e D).

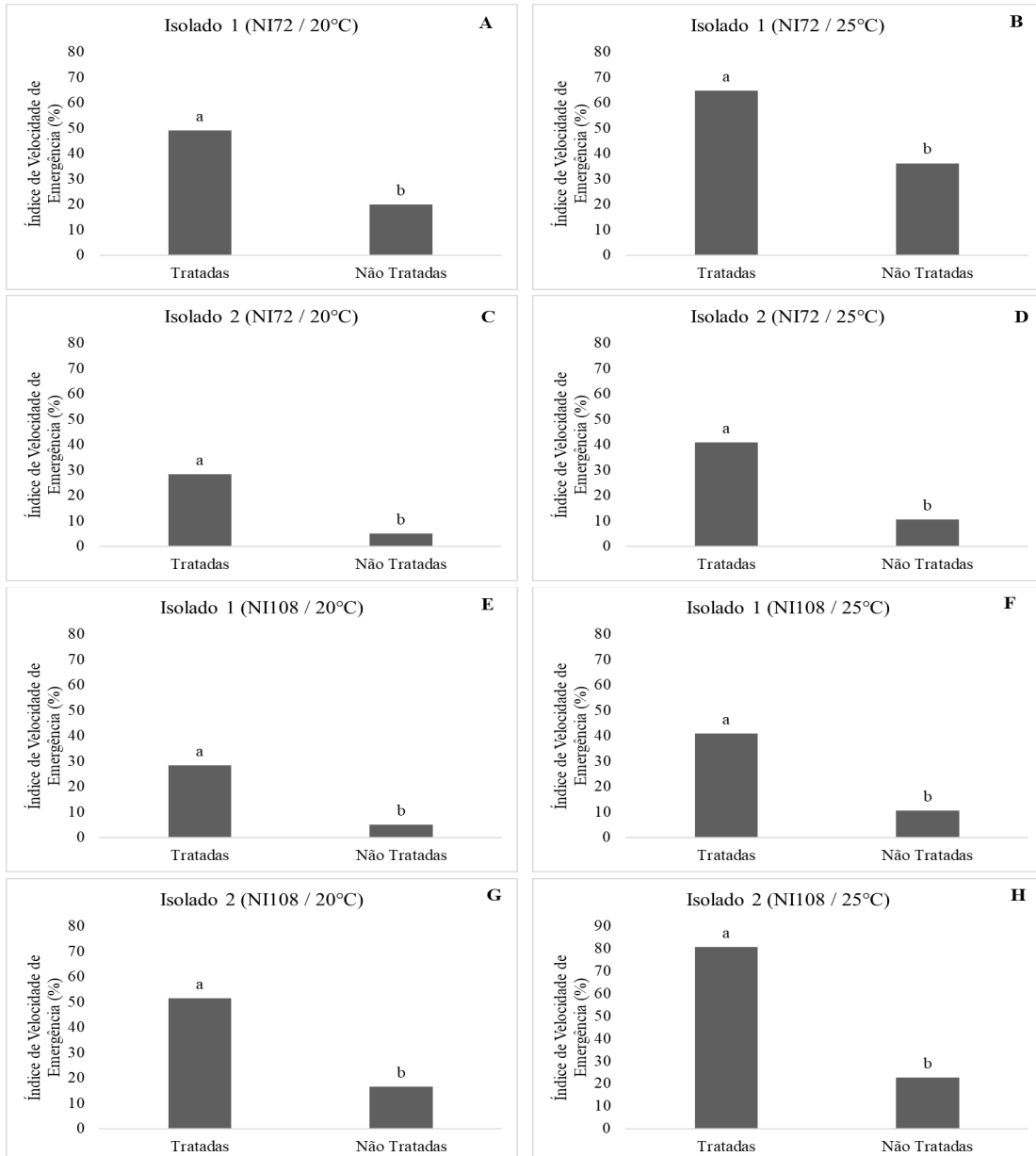
Figura 6 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de soja inoculadas com diferentes níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72 e NI108) dos isolados 1 e 2 sob as temperaturas de cultivo de 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

Os valores de índices de velocidade de emergência, observados em sementes inoculadas e tratadas, foram mais elevados, para ambos os níveis de inóculo dos dois isolados, em comparação com sementes inoculadas e não tratadas (Figuras 7 A, B, C, D, E, F, G e H).

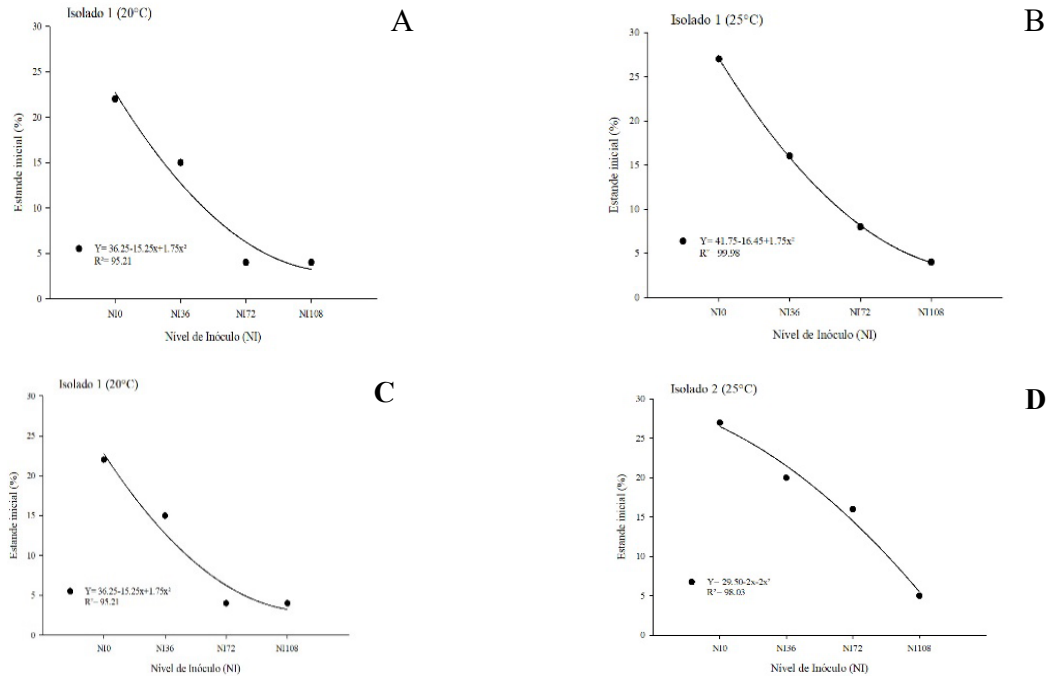
Figura 7 - Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de soja inoculadas com *Corynespora cassicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

Pelos valores de estande inicial, (Figuras 8 A- D), observou-se que o efeito de ambos os isolados do patógeno foi crescente e inversamente proporcional aos níveis de inóculo nas sementes nas duas condições de temperatura de cultivo utilizadas.

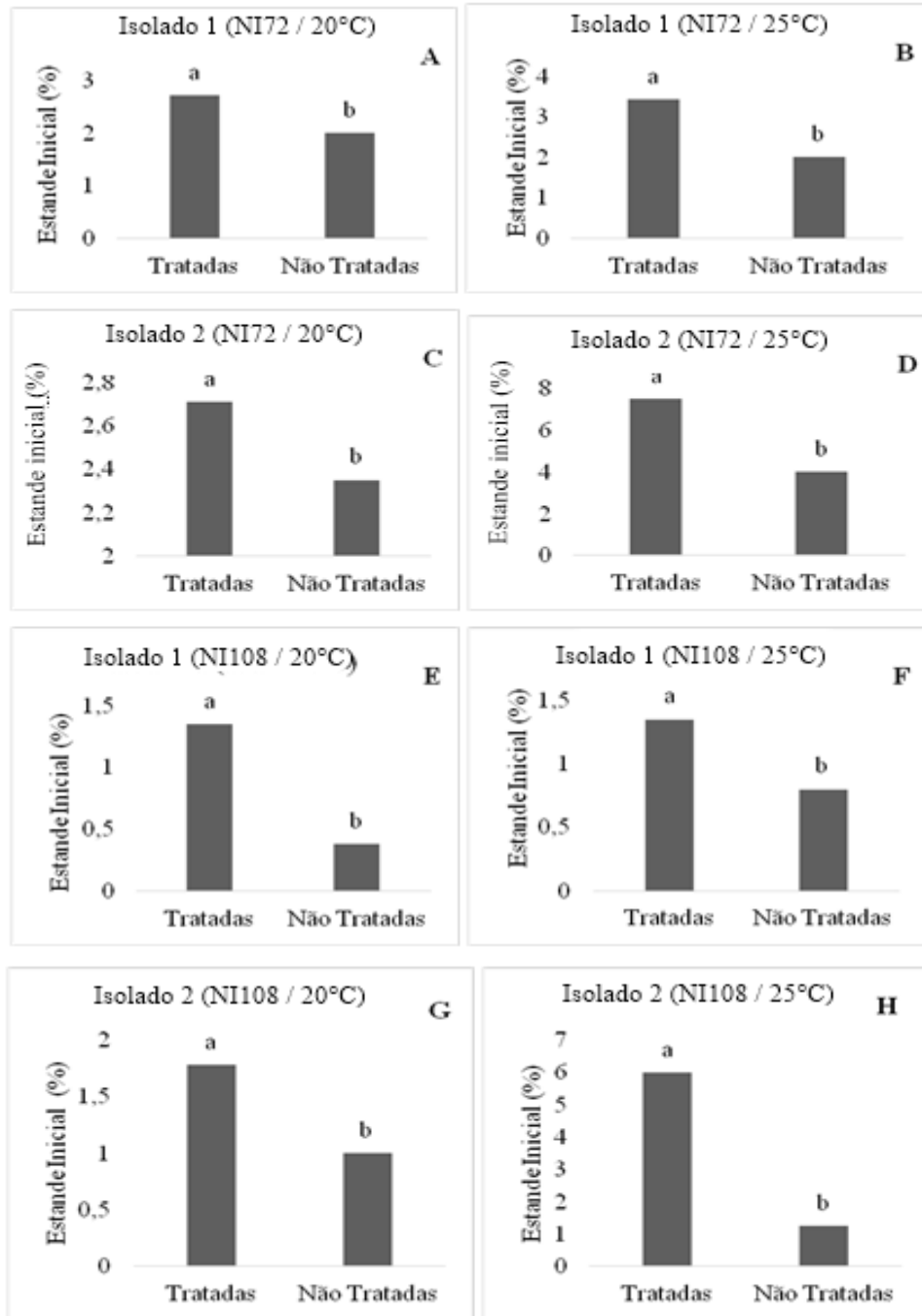
Figura 8 - Estande inicial de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassicola* (isolados 1 e 2), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25°C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

O tratamento de sementes proporciona valores estatisticamente superiores em relação ao estande inicial de plantas (Isolados 1 e 2, temperaturas 20 e 25°C). Observa-se que o tratamento das sementes portadoras do patógeno proporcionou um maior percentual de plantas emergidas em relação às sementes inoculadas e não tratadas (Figuras 9 A, B, C, D, E, F, G e H).

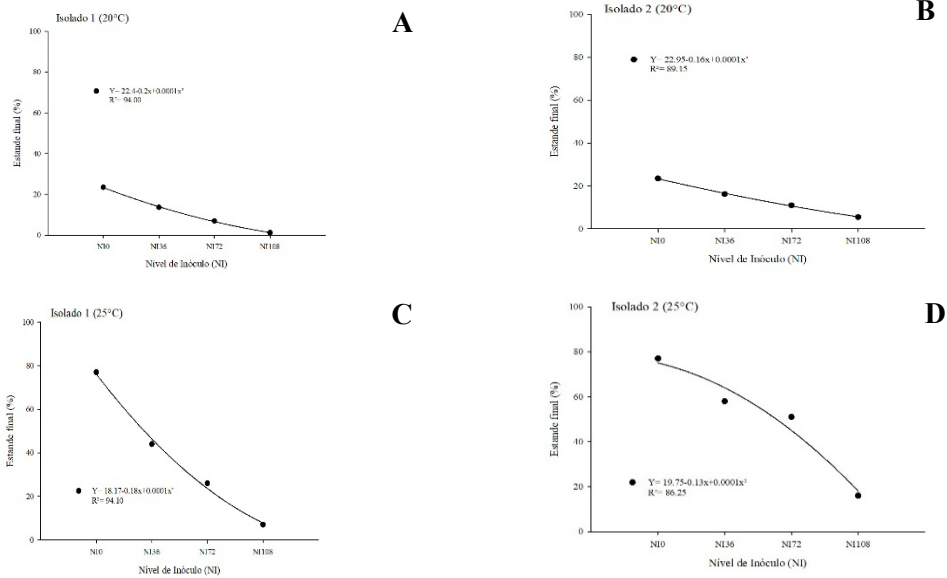
Figura 9 - Estande inicial de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

Pelos valores de estande final, (Figuras 10 A- D), observa-se que o efeito de ambos os isolados do patógeno foi crescente e inversamente proporcional aos níveis de inóculo nas sementes nas duas condições de temperatura de cultivo utilizadas.

Figura 10 - Estande final de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2) em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) e mantidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20°C; C – isolado 1, 25 °C e D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

A exemplo do que foi observado, para o estande inicial, o tratamento de sementes proporcionou também valores de estande final superiores aos valores referentes às sementes não tratadas nessas condições dos ensaios, (Isolados 1 e 2, temperaturas 20 e 25°C) (Figuras 11 A, B, C, D, E, F, G e H).

Figura 11 - Estande final de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.

(Continua)

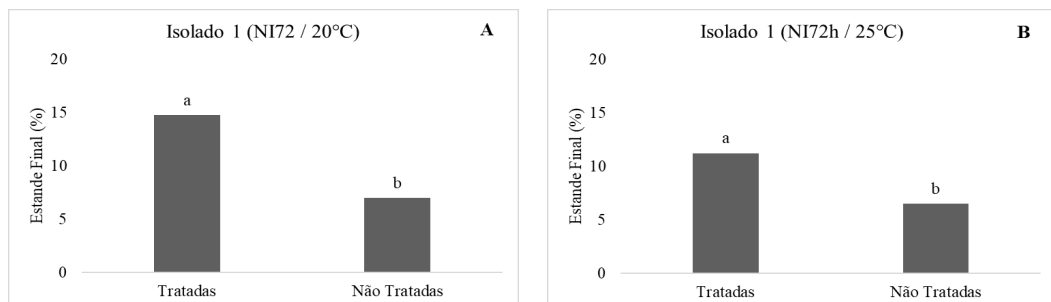
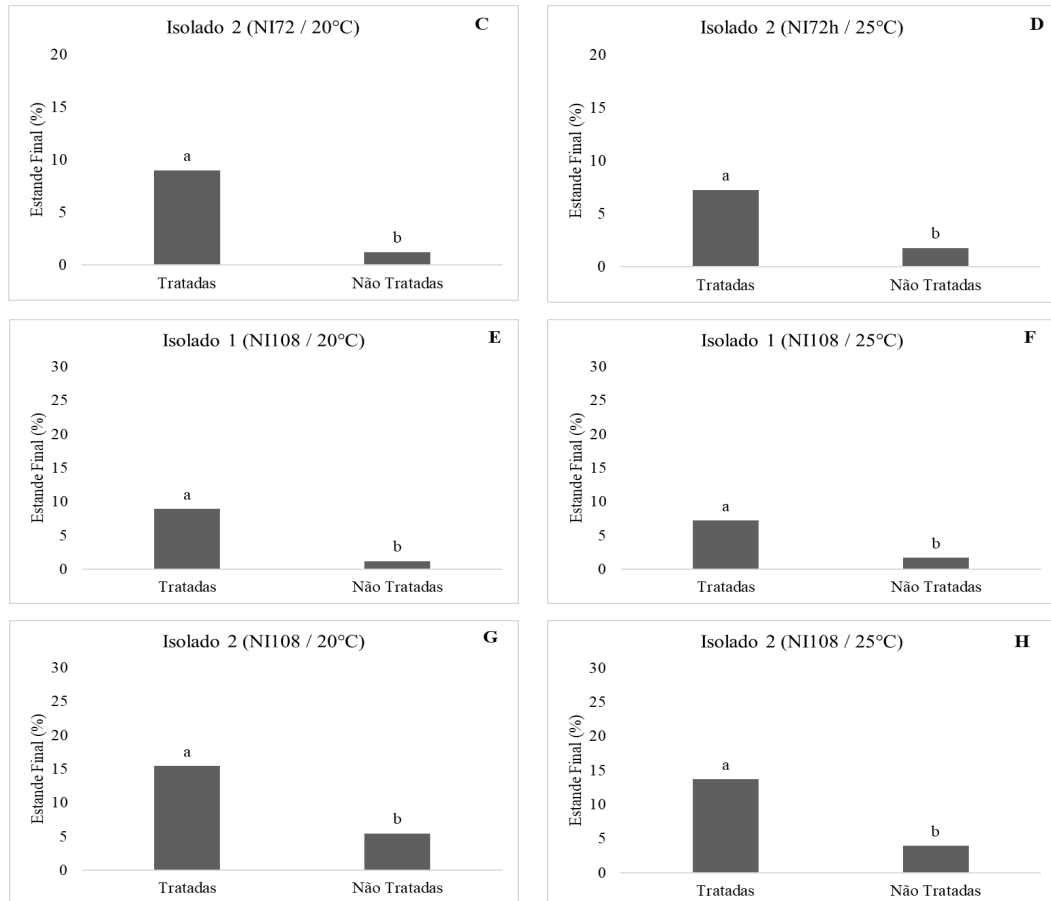


Figura 11 - Estande final de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.

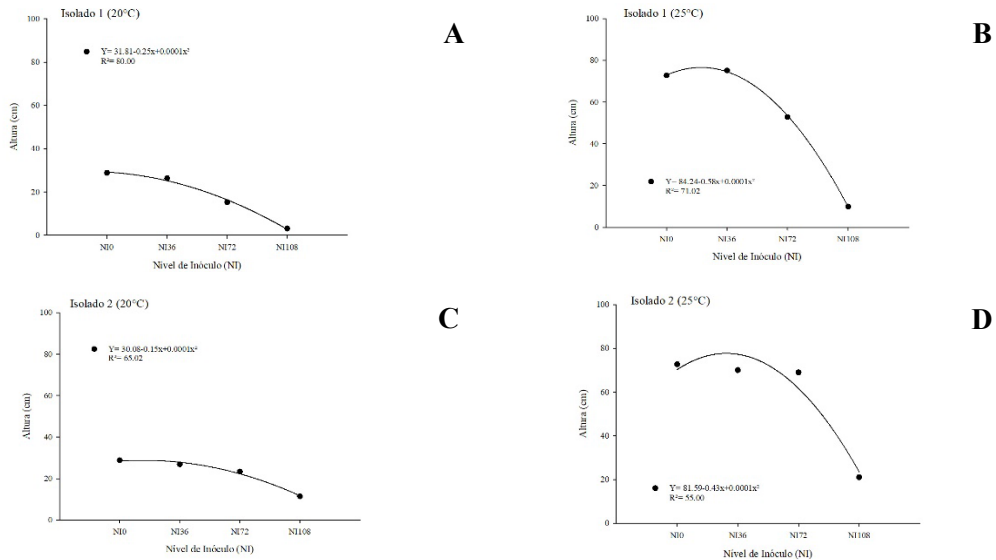
(Conclusão)



Fonte: Da autora (2024).

De modo geral, em relação à altura de plantas, quando relacionados aos isolados 1 e 2, observou-se interação significativa entre as temperaturas de cultivo e os potenciais (níveis) de inóculo em todos os tratamentos. O aumento do nível de inóculo provocou reduções da altura das plantas, indicando uma proporcionalidade inversa entre os níveis de inóculo e valores de altura das plantas (Figuras 12 A e B).

Figura 12 - Altura de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em cinco níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72, NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25°C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

Pelas avaliações da altura de plantas resultantes de sementes de soja tratadas e não tratadas, observou-se que o tratamento de sementes tende a promover valores mais elevados, quando se relacionaram os dois isolados ao nível de inóculo NI72 sob a temperatura de 20°C. O mesmo resultado foi observado, nas avaliações a 20 e 25°C, para ambos os isolados no nível de inoculo NI108.

Figura 13 - Altura de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.

(Continua)

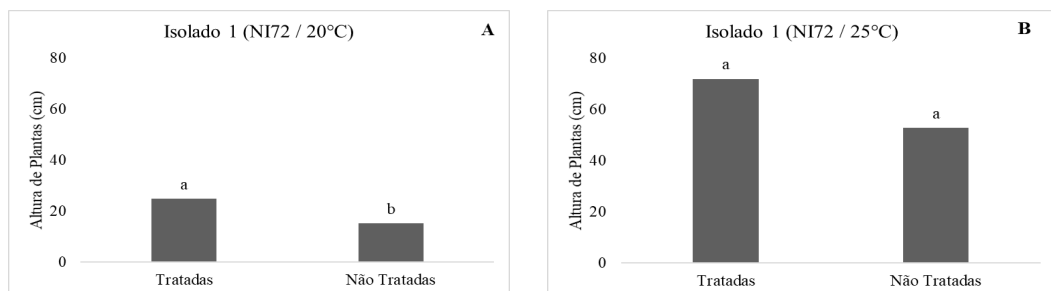
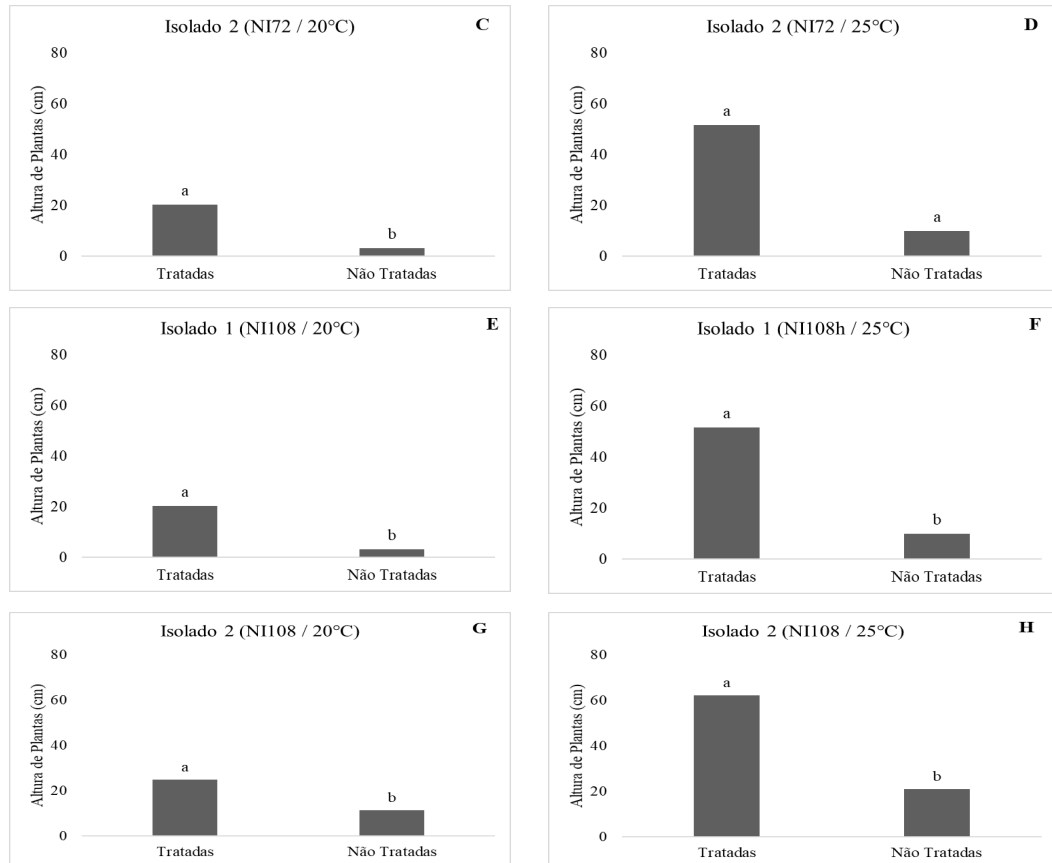


Figura 13 - Altura de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.

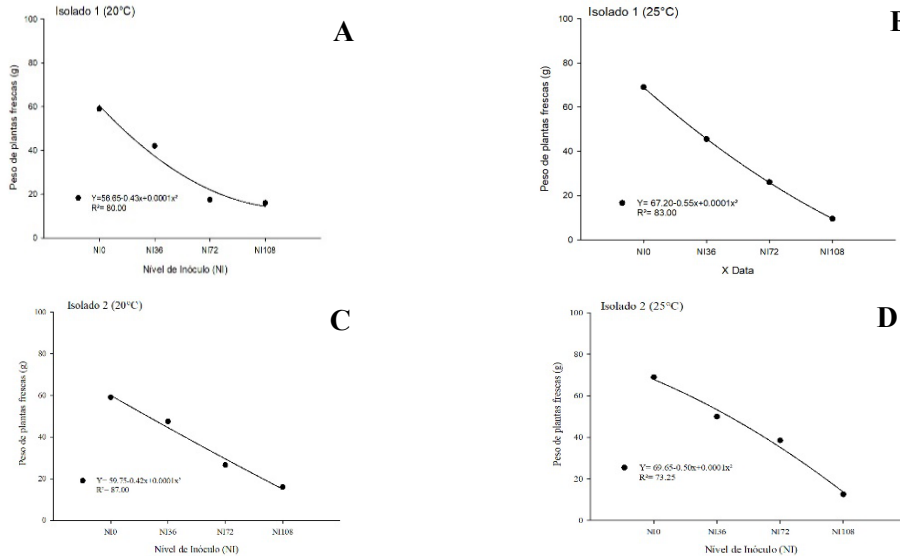
(Conclusão)



Fonte: Da autora (2024).

Em relação às avaliações de peso de plantas frescas, Figuras 14 A e D, nota-se que *C. cassiicola* foi capaz de reduzir os valores dessa variável de maneira proporcional aos aumentos dos níveis de inóculo, utilizados neste ensaio, independente do isolado e das temperaturas de cultivo utilizadas neste estudo.

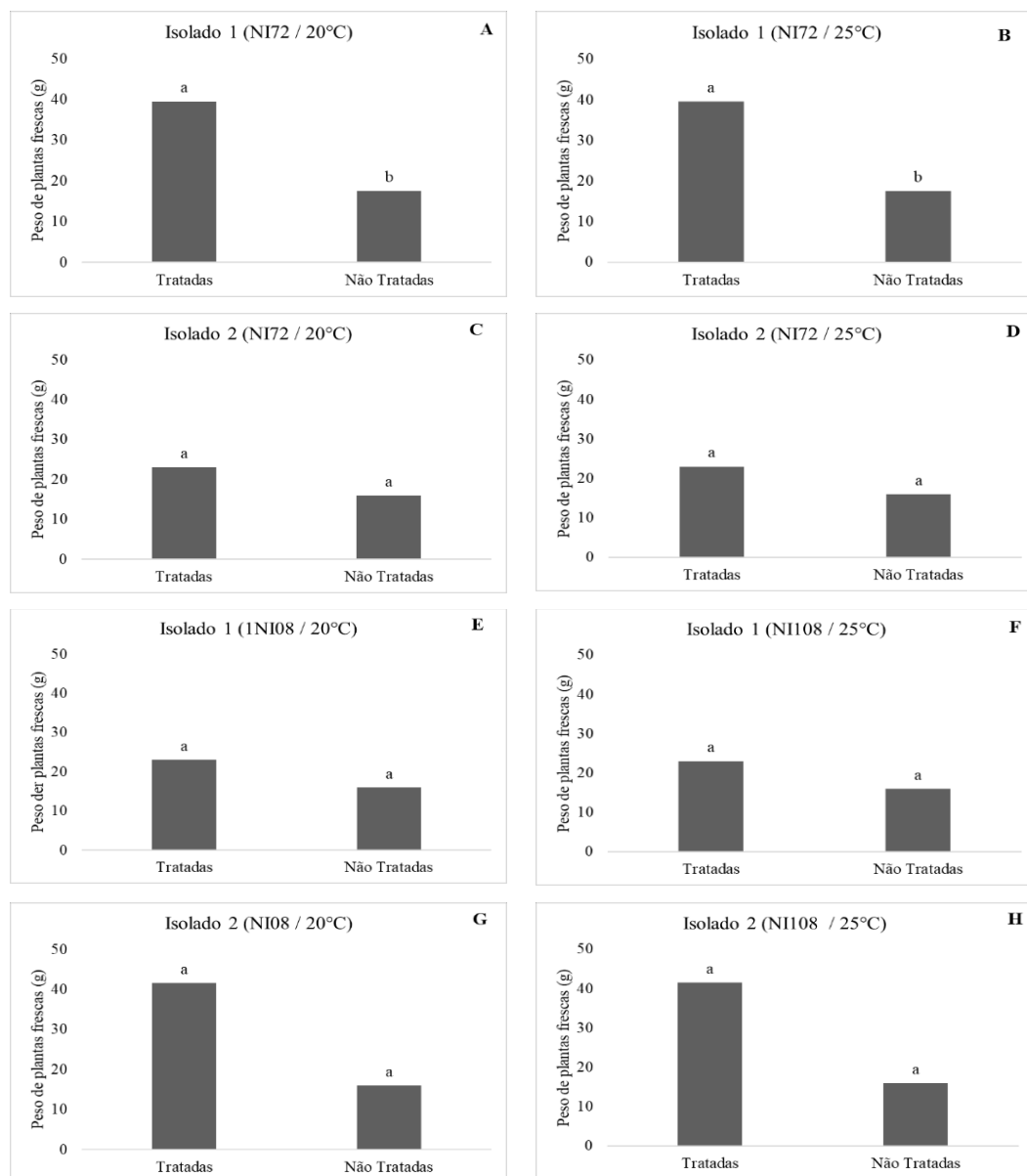
Figura 14 - Peso de plantas frescas de plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em quatro níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72 e NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25°C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

Os resultados das avaliações envolvendo o tratamento químico de sementes de soja neste trabalho, Figuras 15 A, B, C, D, E, F, G e H, mostram que houve uma variação de comportamento entre os isolados e diferenças entre temperaturas de cultivo utilizados neste ensaio. Em plantas oriundas de sementes com nível de inóculo de NI72, após 28 dias da semeadura, observou-se que, na temperatura de 20°C, houve diferença entre os pesos avaliados para o isolado 1, o que não ocorreu com o isolado 2, nessa mesma temperatura (Figura 15 C). Plantas desenvolvidas a 25°C, resultantes de sementes inoculadas com os isolados 1 e 2, evidenciaram que o tratamento de sementes é capaz de assegurar valores mais elevados e estatisticamente significativos de peso de plantas frescas correspondentes ao NI72, em relação a sementes não tratadas, independente do isolado. Em níveis de inóculos mais elevados, o tratamento fungicida das sementes não apresentou diferença estatística somente para o isolado 1, 20°C.

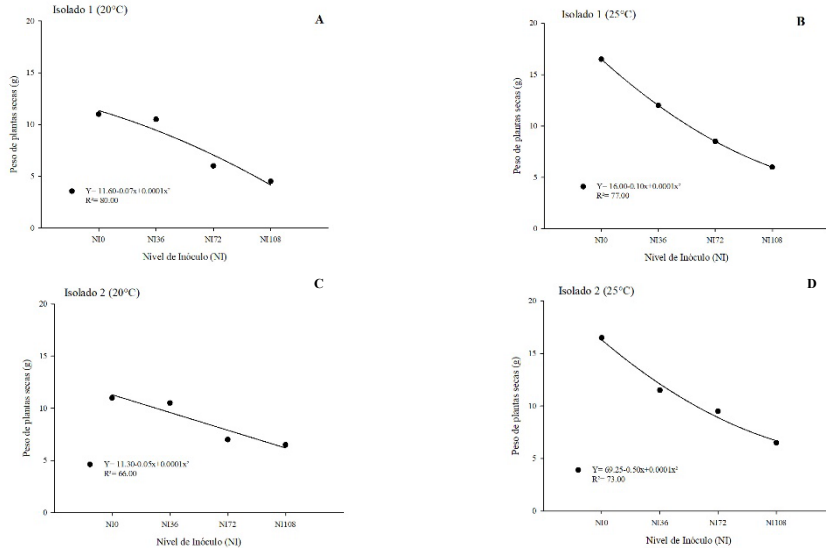
Figura 15 - Peso de plantas frescas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

No que se refere ao peso de plantas secas, cujos resultados estão expostos nas Figuras 16 (A – D), observa-se que os efeitos do agente da mancha-alvo nesta variável, partindo-se de sementes com diferentes níveis de inóculo do patógeno, são crescentes e proporcionais às reduções dos valores de pesos das plantas secas avaliadas.

Figura 16 - Peso de plantas secas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2) em quatro níveis de inóculo (NI0, NI36, NI72 e NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25°C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

Pelos resultados referentes à avaliação de peso de plantas secas oriundas de sementes tratadas e não tratadas com fungicidas, Figuras 17 (A, B, C, D, E, F, G, H), nota-se que o tratamento químico promoveu valores das variáveis analisadas superiores às sementes não tratadas, em todas as circunstâncias avaliadas, exceto para o cultivo a 20 °C e sementes com nível de inóculo NI108 do isolado 2, em que não houve diferença estatística entre sementes tratadas e não tratadas.

Figura 17 - Peso de plantas secas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.

(Continua)

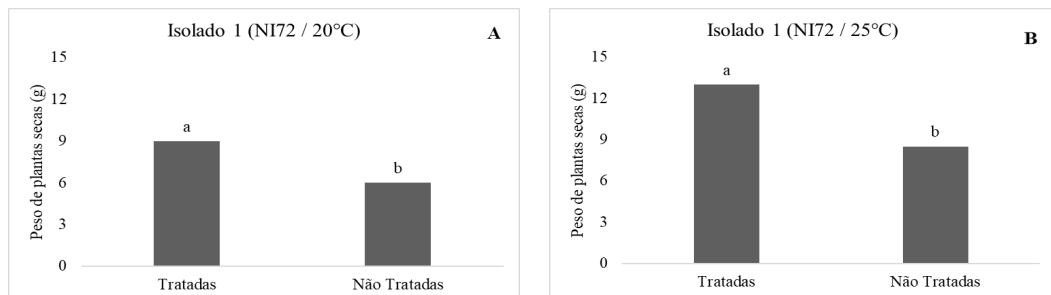
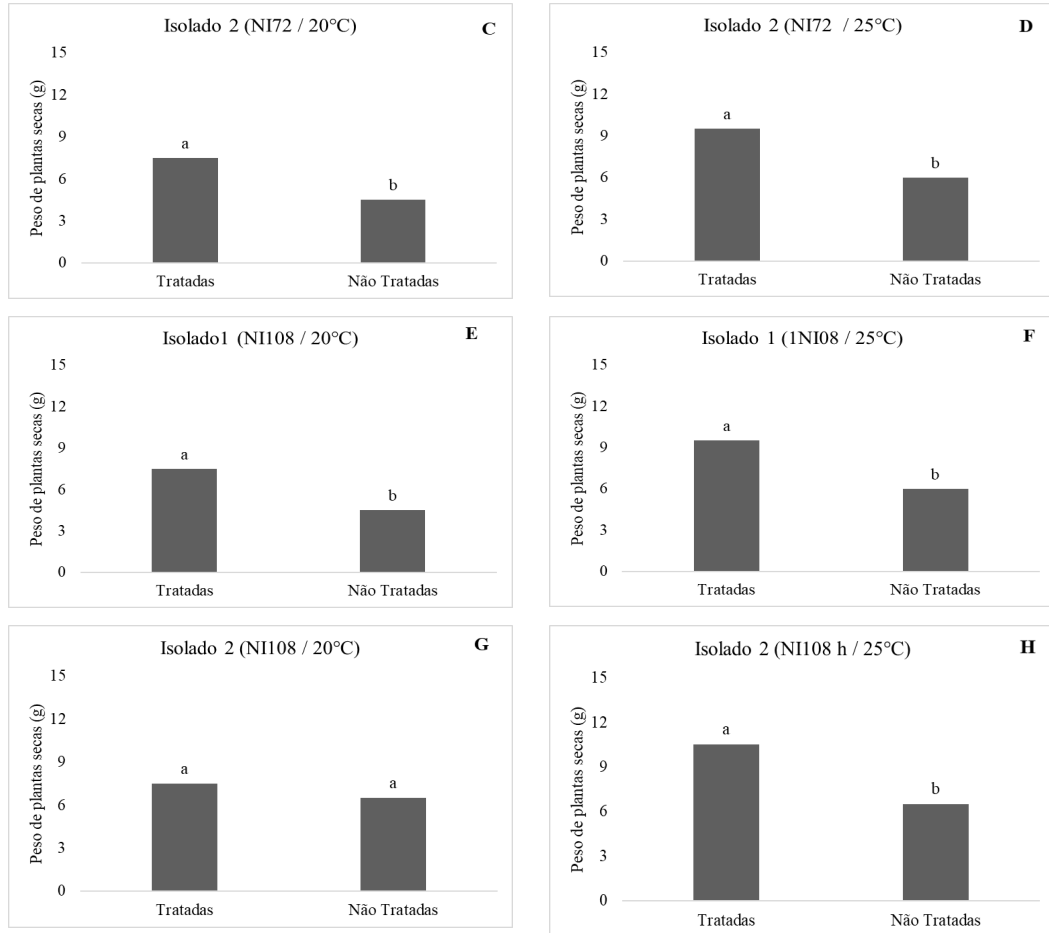


Figura 17 - Peso de plantas secas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.

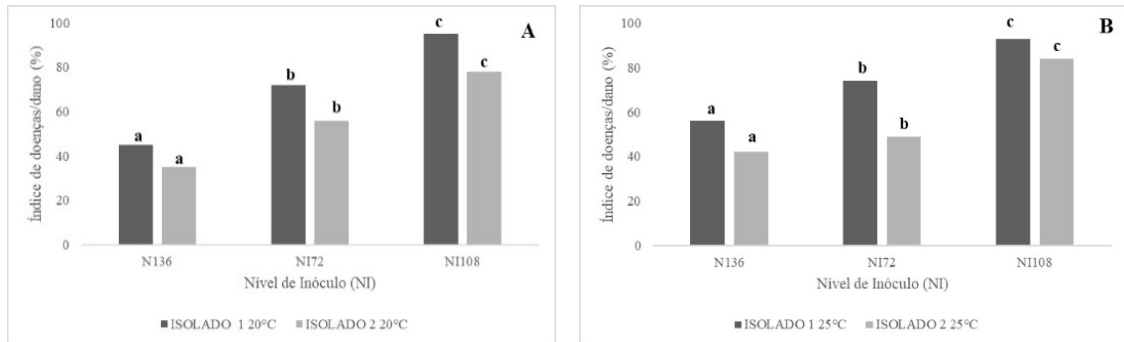
(Conclusão)



Fonte: Da autora (2024).

Pela avaliação do índice de dano/doença, Figuras 18 (A e B), que leva em conta os efeitos quantitativos da doença, a partir das sementes, considerando-se sintomas visíveis e indiretos, verifica-se que os valores dessa variável são crescentes e proporcionais de forma direta ou inversa, em função das variáveis consideradas nesta avaliação. O isolado 1 proporcionou maior percentual de danos, nas temperaturas de 20 e 25°C, totalizando 95 e 95% em NI108, enquanto o isolado 2 apresentou 79,3 e 82% em NI108.

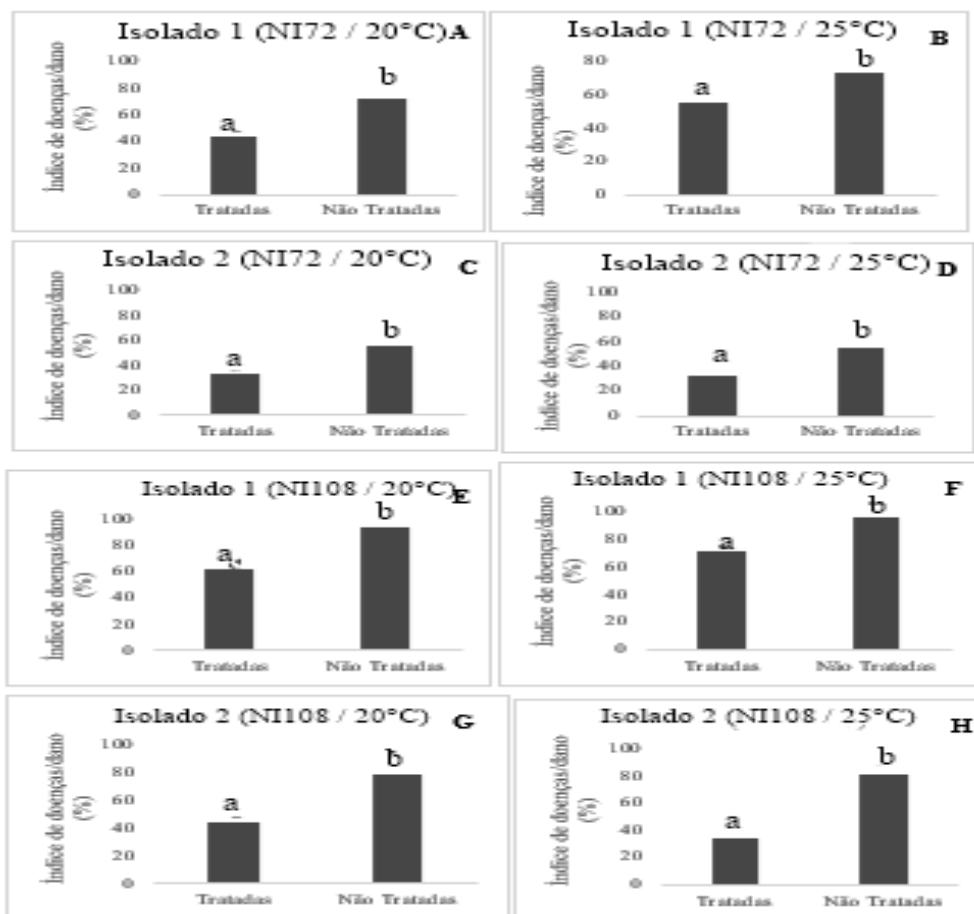
Figura 18 - Índice de doenças/dano em plantas soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassiicola* (isolados 1 e 2), em quatro níveis de inóculo (NI136, NI72 e NI108) e mantidas a 20°C e 25°C. A – isolados 1 e 2, 20 °C e B – isolados 1 e 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

Os resultados apresentados do índice de doenças/dano demonstraram que sementes inoculadas tratadas quimicamente apresentaram valores percentuais menores, com significância estatística, quando relacionados com sementes inoculadas não tratadas. (Figura 19 A, B, C, D, E, F, G e H).

Figura 19 - Índice de doenças/dano em plantas de soja emergidas de sementes inoculadas com *Corynespora cassicola* (isolados 1 e 2), em dois níveis de inóculo (NI72 e NI108), tratadas e não tratadas e mantidas a 20 e 25°C. NI72: A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C e D – isolado 2, 25 °C. NI108: E – isolado 1, 20 °C; F – isolado 1, 25 °C; G – isolado 2, 20 °C e H – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

4 DISCUSSÃO

De modo geral, os resultados deste estudo indicam que a associação de *Corynespora cassiicola* em sementes de soja é capaz de provocar danos variáveis e severos a partir de sua presença nas sementes. Pelos dados de avaliações de laboratório, fornecidos pelos testes de germinação e vigor, foi possível verificar que os danos podem atingir níveis severos para os usuários das sementes, visando a cultivos para os diversos fins. Fica claro que, por esses testes, a presença do referido patógeno nas sementes pode afetar significativamente a sua germinação e o vigor, o que significa prejuízos econômicos e comprometimento de cultivos futuros pela disseminação de inóculo desse patógeno. Importante ressaltar que o inóculo introduzido nas áreas de cultivo pode sobreviver em restos culturais ou na forma dormente conforme é relatado em literatura (Almeida *et al.*, 2005; Chun-Xia *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2018).

A presença do patógeno nas sementes, em níveis variados de inóculo, o que é revelado pelo percentual de incidência e intensidade (potencial) de inóculo registrados nas sementes, pode determinar uma intensidade variável de danos, com reflexos imediatos no cultivo ou posteriormente do ponto de vista epidemiológico.

Em relação aos resultados de avaliações dos efeitos do patógeno, a partir da semeadura em substrato de cultivo, com ambiente controlado, nota se que, em geral, os danos causados por *C. cassiicola*, no desenvolvimento inicial das sementes de soja, seguem o padrão já registrado em outros patossistemas em soja, casos de *Colletotrichum truncatum* (Silva Júnior *et al.*, 2021), *Sclerotinia sclerotiorum* (França *et al.*, 2021), *Phomopsis sojae* (Andrade, 2019) e outros. Nesses patossistemas, o nível de inóculo inicial dos patógenos nas sementes constitui um fator que, dependendo de sua intensidade, é capaz de provocar danos proporcionais a esses valores.

Sob temperatura de cultivo mais baixa, os danos causados pelo agente da mancha-alvo, neste trabalho, foram, de modo geral, mais acentuados. Isso pode ser atribuído ao fato de que, em condições de ambiente mais desfavorável ao desenvolvimento da soja, as doenças, como no caso da mancha-alvo, encontram condições mais favoráveis para se desenvolverem com mais agressividade no cultivo em campo (Rondon; Lawrence, 2021).

Em relação à inclusão do fator tratamento químico de sementes, neste trabalho, pôde-se observar que os efeitos causados por *C. cassiicola* podem ser reduzidos substancialmente.

No entanto, com base nos resultados de avaliações de algumas variáveis, ficou claro que, em níveis de inóculo mais elevados nas sementes, a eficácia do tratamento fungicida torna-

se comprometida não havendo diferenças estatísticas entre sementes tratadas e sementes não tratadas.

Por esses resultados, fica evidenciado também que, em temperaturas mais elevadas, que são mais favoráveis à germinação das sementes e o posterior desenvolvimento das plantas de soja, o tratamento químico sanitário de sementes proporciona controle da ação de *C. cassiicola* presente inicialmente nas sementes. De modo geral, o índice de doenças/dano mostra que *C. cassiicola* é capaz de afetar com severidade o desempenho das sementes de soja, portadoras de seu inóculo, havendo variações, em função das variáveis consideradas para esse tipo de avaliação.

Com base na avaliação dos efeitos do patógeno, considerando-se o tratamento de sementes, observa-se que houve uma elevada eficácia do tratamento realizado com fungicidas. Apesar de não haver erradicação completa do patógeno, presente inicialmente nas sementes, fica claro que o nível dos danos atribuídos a esse patógeno é significativamente reduzido pelo tratamento químico. Essa constatação levanta a importância de uma reflexão sobre a necessidade de se considerar o nível (potencial) de inóculo dos patógenos nas sementes, ao lado da incidência, em análises sanitárias de sementes. Sobre a atuação dos dois isolados de *C. cassiicola* utilizados, foi possível perceber que, embora ambos os isolados tenham sido originados de soja, eles apresentaram comportamentos diferenciados, em relação a algumas das variáveis utilizadas neste estudo. Isso sugere que estudos adicionais com um maior número de isolados, que representem as diferentes circunstâncias, em que a soja é cultivada no Brasil, sejam realizados, tendo-se em mente considerar diferentes regiões de cultivo no país e os diferentes genótipos de soja atualmente em uso pelos produtores em geral.

5 CONCLUSÃO

A presença de *C. cassicola* em sementes de soja pode causar danos diversos e severos à germinação e vigor das sementes, além de afetar o desenvolvimento posterior das plantas.

Em condições de temperatura mais baixa, que é menos favorável ao cultivo da soja, a ocorrência de *C. cassicola* em sementes é mais prejudicial ao desempenho das sementes infectadas.

Os danos causados por *C. Cassicola*, em associação com sementes de soja, podem variar de acordo com o isolado do patógeno e com seus níveis de inóculo inicial nas sementes.

O tratamento de sementes de soja com fungicida constitui uma medida eficaz, para reduzir os danos provocados por *C. Cassicola*, a partir de sementes infectadas.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic, 2005. 948 p.
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* (org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2.
- ANDRADE, L. E. F. **Variação e efeitos de potencial de inóculo natural de *Drechslera oryzae* e *Phomopsis sojae* em lotes de sementes de arroz e soja**. 2019. 40 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. **Com novo recorde, produção de grãos na safra 2022/23 chega a 322,8 milhões de toneladas**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5157-com-novo-recorde-producao-de-graos-na-safra-2022-23-chega-a-322-8-milhoes-de-tonaladas>. Acesso em: 10 out. 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009a. 399 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009b. 200 p.
- CHUN-XIA, Z. *et al.* Biological characteristics of *Corynespora cassiicola* causing *Corynespora* leaf fall disease. **Plant Protection**, Kuala Lumpur, v. 36, n. 2, p. 98-101, 2010.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cuidados no cultivo da soja em anos de El Niño**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/84815370/cuidados-no-cultivo-da-soja-em-anos-de-el-nino>. Acesso em: 1 dez. 2023a.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja em números: safra 2022/2023**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 15 out. 2023b.
- FRANÇA, S. K. S. D. *et al.* Quantification and conceptual validation of the inoculum potential of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and bean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 43, p. 1-11, 2021.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **El Niño pode causar impactos na agricultura brasileira**. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/noticias/el-ni%C3%B1o-pode-causar-impactos-na-agricultura-brasileira>. Acesso em: 1 dez. 2023.
- KRZYŻANOWKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. 218 p.
- LOPEZ, D. *et al.* Genome-Wide analysis of *Corynespora cassiicola* leaf fall disease putative effectors. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 276, 2018.

MACHADO, J. C. *et al.* Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. *In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM*, 26., 2001, Angers. **Proceedings** [...]. Angers: ISTA, 2001. p. 62.

MACHADO, J. C. *et al.* Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 37-63, 2012.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 75, p. 22-34, Mar. 1962.

MCKINNEY, H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, DC, v. 26, n. 3, p. 195-217, Jan. 1923.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A. Computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, 1995.

RONDON, M. N.; LAWRENCE, K. The fungal pathogen *Corynespora cassiicola*: a review and insights for target spot management on cotton and Soya bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 169, n. 6, p. 329-338, 2021.

SILVA JÚNIOR, M. B. da *et al.* Effect of temperature on *Colletotrichum truncatum* growth, and evaluation of its inoculum potential in soybean seed germination. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 160, p. 999-1004, Apr. 2021.

TERAMOTO, A. *et al.* In vitro sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 43, p. 281-289, 2017.

ARTIGO 4 - TRANSMISSIBILIDADE DE *CORYNESPORA CASSIICOLA* EM SEMENTES DE SOJA TRATADAS E NÃO TRATADAS COM FUNGICIDAS QUÍMICOS

Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.

RESUMO

A mancha-alvo, causada por *Corynespora cassiicola*, é uma das principais doenças que afetam a soja no Brasil, podendo provocar perdas elevadas no campo. A transmissão desse patógeno das sementes para as plântulas/plantas pode variar, de acordo com diversos fatores, em especial, com as condições ambientais e os níveis iniciais de inóculo. Os objetivos deste estudo foram quantificar a taxa de transmissão de *C. cassiicola* de sementes de soja infectadas para plantas resultantes em cultivo sob condições controladas e diante do tratamento sanitário de sementes. A inoculação das sementes foi realizada pela técnica de condicionamento hídrico, com o intuito de obter sementes com diferentes níveis de inóculo, em função do tempo de exposição das sementes ao fungo em cultura pura, sendo os níveis denominados NI36, NI72, NI108 com adição de fungicidas nos níveis de inóculo NI72 e NI108. Sementes inoculadas, tratadas e não tratadas, foram semeadas individualmente e mantidas, em câmaras de cultivo vegetal sob duas temperaturas, 20 e 25 °C, por um período de 28 dias. Houve transmissão do patógeno tanto em plantas assintomáticas quanto sintomáticas, com e sem o tratamento químico de sementes, tendo o tratamento das sementes sido capaz de reduzir significativamente as taxas de transmissão do patógeno. A maior taxa de transmissão total (95%) ocorreu, em plantas originárias de sementes, com nível de inóculo NI108 do isolado 1 do fungo a 25 °C (sem o tratamento de sementes) e 63% no nível NI108h do mesmo isolado à temperatura de 20°C (com tratamento de sementes).

Palavras-chave: patologia de sementes; nível de inóculo; mancha-alvo; soja.

ABSTRACT

Target spot, caused by *Corynespora cassiicola*, is one of the main diseases affecting soybeans in Brazil and can cause high losses in the field. The transmission of this pathogen from seeds to seedlings/plants can vary according to several factors, especially environmental conditions and initial inoculum levels. The objectives of this study were to quantify the transmission rate of *C. cassiicola* from infected soybean seeds to the resulting plants in cultivation under controlled conditions and in the face of sanitary seed treatment. The seeds were inoculated using the water conditioning technique to obtain seeds with different inoculum levels depending on the length of time the seeds were exposed to the fungus in pure culture, the levels being called NI36, NI72, and NI108 with the addition of fungicides at inoculum levels NI72 and NI108. Inoculated, treated, and untreated seeds were sown individually and kept in plant growth chambers at two temperatures, 20 and 25 °C, for 28 days. There was transmission of the pathogen in both asymptomatic and symptomatic plants, with and without chemical seed treatment and seed treatment reduced the transmission rates of the pathogen significantly. The highest total transmission rate (95%) occurred in plants originating from seeds with the NI108 inoculum level of isolate 1 of the fungus at 25 °C (without seed treatment) and 63% at the NI108h level of the same isolate at a temperature of 20 °C (with seed treatment).

Key words: seed pathology; inoculum level; targeted spot; soybean.

1 INTRODUÇÃO

A mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, é atualmente uma das principais doenças que acometem a cultura da soja em algumas regiões produtoras no Brasil. O fungo é encontrado em praticamente todas as regiões de cultivo no país, em que outras espécies hospedeiras, como é o caso do algodão, são cultivadas com a finalidade de compor programas de rotação com o cultivo de soja. O agente causal da mancha-alvo da soja pode sobreviver, em restos de cultura e em sementes desse hospedeiro, sendo a semente um veículo de disseminação do patógeno entre regiões de cultivo.

Do ponto de vista fitossanitário, o conhecimento sobre a associação entre *Corynespora cassiicola* e sementes de soja é extremamente importante ao estabelecimento de estratégia de manejo da mancha-alvo, sendo esse tipo de interação ainda um aspecto pouco investigado nas condições brasileiras. Importante salientar que o uso de sementes portadoras de patógenos pode ser responsável por uma série de danos diretos no campo de cultivo, além de constituir-se um meio de disseminar e introduzir as doenças nas regiões produtoras (Godoy *et al.*, 2013; Koenning; Creswell, 2006; Panique, 2007).

Um dos aspectos que chamam atenção no cultivo de espécies propagadas por sementes é seu papel como fonte inicial de inóculo de inúmeros patógenos em campos de cultivo. Dependendo da natureza do patógeno e do hospedeiro e de outros fatores bióticos e abióticos, o desenvolvimento das doenças pode ser agravado ou reduzido em níveis variados. Nesses casos, o conhecimento da taxa de transmissão do inóculo, a partir das sementes, a progênie nas áreas de cultivo torna-se de extrema relevância ao manejo correto das doenças em questão. A redução da taxa de transmissão dos patógenos, por meio de tratamentos sanitários das sementes, tem sido uma forma das mais eficazes e viáveis de prevenir a ação de inúmeras doenças na cultura em desenvolvimento. Para a cultura da soja, existem relatos de consequências desastrosas a essa espécie, decorrentes da associação e transmissão via sementes de determinados patógenos como *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*; *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium pallidoroseum*, *Cercospora* sp, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, entre outros (Andrade, 2019; França *et al.*, 2021; Goulart; Utiamada, 2020; Silva Júnior *et al.*, 2021).

Especificamente para o caso de *C. cassiicola* e sementes de soja, o nível de conhecimento sobre seu grau de associação e as taxas de transmissão do patógeno via sementes de soja pode ser considerado baixo e insuficiente para o estabelecimento de um programa de manejo seguro da doença. Nesse sentido, estudos sobre avaliações de eficácia do tratamento

sanitário de sementes de soja, que mencionam mancha-alvo ou seu agente causal, não são, em sua maioria, embasados em metodologias seguras direcionadas para esse caso.

Pela literatura, pouco se conhece sobre a transmissibilidade de *C. cassiicola* por sementes de seus hospedeiros, incluindo soja. Para esse patossistema, Goulart e Utimada (2020) demonstraram a transmissão do referido patógeno, a partir de sementes de soja, tendo-se como base a análise de plântulas/plantas, com sintomas típicos da doença, sem levar em conta a presença do patógeno nos tecidos de plantas assintomáticas. Por estudos envolvendo outros patossistemas em soja e outras espécies vegetais, como *C. lindemuthianum* – feijão comum, *Stenocarpella macrospora* – milho, *Sclerotinia sclerotiorum* – soja, feijão e girassol (França *et al.*, 2021; Gadaga; Siqueira; Machado, 2020; Siqueira *et al.*, 2014; Zancan *et al.*, 2015), verifica-se que parcelas significantes de plantas assintomáticas dos hospedeiros podem abrigar inóculo dos respectivos patógenos e isso constitui potencial foco de infecção em etapas posteriores nos cultivos decorrentes.

Diante desse cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar e quantificar a transmissibilidade de *C. cassiicola* de sementes de soja para progênie, em fase inicial de desenvolvimento, levando-se em consideração alguns fatores interferentes, como diferentes isolados e níveis de inóculo do patógeno, condições ambientais de cultivo e o tratamento químico sanitário de sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Origem e multiplicação dos isolados de *Corynespora cassiicola*, perfil das sementes utilizadas, inoculação de sementes e teste de sanidade

Foram utilizados dois isolados de *Corynespora cassiicola*, para a realização do trabalho, sendo um obtido da coleção micológica do Agrônoma Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, codificado, como 9601 (1) e outro isolado da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, codificado como LAPS 312 (2). Ambos os isolados foram originalmente obtidos de plantas de soja procedentes de diferentes regiões de cultivo no Brasil. Inicialmente os dois isolados foram cultivados em substrato, contendo batata, dextrose e ágar (BDA), em placas de Petri, com incubação em câmara do tipo BOD à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Ao final desse período, foram obtidas culturas monospóricas dos isolados para uso na inoculação das sementes.

As sementes de soja utilizadas, pertencentes à cultivar M5917 IPRO, não apresentavam registros de resistência/susceptibilidade à mancha-alvo. Pelos resultados dos testes de laboratório aplicados preliminarmente, segundo Brasil (2009a, 2009b), as sementes utilizadas neste estudo apresentavam-se isentas de *C. cassiicola* e um percentual de germinação de 91%.

2.2 Inoculação das sementes

Para a obtenção de sementes de soja com diferentes níveis de inóculo de *C. cassiicola*, foi utilizada a metodologia de condicionamento hídrico (Machado *et al.*, 2001, 2012). Inicialmente as sementes foram desinfestadas, utilizando hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e lavadas três vezes com água destilada e secas entre folhas de papel germitest em sala climatizada a 20°C por 48 horas. Colônias de *C. cassiicola* foram obtidas, a partir de culturas monospóricas, desenvolvidas em placas de Petri de 15cm com meio BDA + manitol, com potencial hídrico ajustado a $-1,0\text{ MPa}$ (Michel; Radcliffe, 1995). Após sete dias, as sementes foram distribuídas sobre as colônias fúngicas, em camadas simples, tendo-se o cuidado de posicionar as sementes em contato físico direto com o fungo. As sementes foram mantidas

sobre as colônias fúngicas por períodos de 36, 72, 108 horas, equivalentes aos níveis de inóculo do patógeno, estabelecidos para este estudo, com denominações: NI36, NI72 e NI108 respectivamente e acondicionadas em câmaras do tipo BOD, sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. As sementes foram retiradas e secas, em folhas de papel germitest, em sala climatizada, por um período de 48 horas. Para avaliação do efeito do restritor hídrico, as sementes foram também colocadas em placas de Petri, contendo apenas o meio BDA acrescido de manitol pelos mesmos períodos de tempo já mencionados e, em seguida, submetidas à secagem da mesma maneira descrita para sementes inoculadas. Além de uma testemunha absoluta NI0 (sem manitol e não inoculada), foi adicionado ao experimento um tratamento químico das sementes com o produto (Metalaxil-M + Fludioxonil) nos dois níveis de inóculo: NI72 e NI108.

2.3 Teste de sanidade

Para o cálculo das taxas de transmissão, foi utilizado Blotter test que detecta e confirma a presença de *C. cassiicola* nos diferentes níveis de inóculo do patógeno. Por esse teste, as sementes de soja inoculadas foram distribuídas sobre três discos de papel de filtro, umedecidos com ágar água (5g de ágar/L), acrescidos de 2,4-D (diclorofenoxiacetato de sódio – concentração de 10ppm), acondicionadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Foram utilizadas cinco repetições de 40 sementes por placa, mantidas em câmaras do tipo BOD com fotoperíodo de 12 h, a 20°C , em câmara de incubação de sementes, por sete dias. Após esse período, as sementes foram examinadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e microscópio ótico (Brasil, 2009b). Os resultados foram expressos em porcentagem de incidência.

2.4 Avaliação da transmissão de *Corynespora cassiicola* em câmara de cultivo vegetal

Cem sementes de soja de cada tratamento foram distribuídas individualmente em copos plásticos de 300 mL contendo uma mistura autoclavada de substrato comercial (Tropstrato HA hortaliças saco de 25 kg) com areia na proporção 1:1. Os copos foram dispostos em grupos de 25 por bandeja de tamanho 48 x 29 x 10 cm, sendo cada bandeja correspondente a uma repetição. O experimento foi conduzido, em duas câmaras de cultivo vegetal, com temperaturas ajustadas em $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas luz (luz do dia NSK T10 40W 6500K FL40T10-6 60Hz)/12 horas escuro. Foi avaliada, diariamente, a emergência de plantas

sintomáticas e assintomáticas da doença em questão. Plantas sintomáticas foram assepticamente colocadas e incubadas em placas de Petri, contendo o meio BDA, para a confirmação da presença de *C. cassiicola* nos tecidos avaliados. Após 28 dias da semeadura (d.a.s), todas as plantas assintomáticas foram coletadas e fragmentos de 2 cm de extensão na altura do colo (C) e última inserção das folhas (IF) foram desinfestados em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e três vezes em água destilada e esterilizada, por 1 minuto e secos em papel esterilizado. Todos os fragmentos foram depositados, em placas de Petri com o meio BDA e incubadas, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias, os fragmentos foram analisados individualmente, no microscópio estereoscópico, para a observação de estruturas características *C. cassiicola*.

A presença de *C. cassiicola* em pelo menos um dos fragmentos examinados por planta foi suficiente para a confirmação da transmissão de *C. cassiicola* da semente para a planta emergida.

2.5 Detecção de *C. cassiicola* em fragmentos de plantas assintomáticas por meio da técnica PCR convencional

2.5.1 Extração do DNA

Fragmentos de plantas assintomáticas foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido até adquirir a consistência de um pó fino. As culturas fúngicas puras de *C. cassiicola*, utilizadas como controle positivo, foram cultivadas, durante sete dias em meio BDA e a maceração foi realizada da mesma forma que utilizada para os fragmentos de plantas. Três subamostras de 40 g foram retiradas de cada amostra. Para extração de DNA, foi utilizado o kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), conforme instruções do fabricante. Para a amplificação dos fragmentos específicos, em sementes inoculadas, foi utilizado o primer GA4-F/GA4-R (Dixon *et al.*, 2009). O mesmo primer foi testado por Sousa, Siqueira e Machado (2016) para detecção de *C. cassiicola* em sementes de soja.

2.5.2 PCR convencional

Para o desenvolvimento da PCR, foi utilizado o kit All Taq Master Mix (QIAGEN). A amplificação foi realizada em 20 µl da reação em que foi adicionado um mix, contendo AllTaq Master Mix (AllTaq DNA Polimerase, tampão AllTaq PCR e dNTPs) (1,5 µl), Master Mix

Tracer (48 µl) e primers (180 µl). A amplificação do fungo foi inicialmente de desnaturação de 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 segundos, anelamento de 58 °C por 30 segundos e extensão de 72 °C por 45 segundos e extensão final de 72 °C por 5 minutos. 20 µl foi utilizado para separar os produtos da PCR em gel de agarose 1,2% corado com GelRed (Biotium), com corrida eletroforética realizada a 120 V. Os produtos da PCR foram observados em transluminador UV.

2.6 Análises estatísticas

Para o teste de sanidade, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC). As análises de variância foram realizadas individualmente, para cada isolado, além do controle (não inoculado).

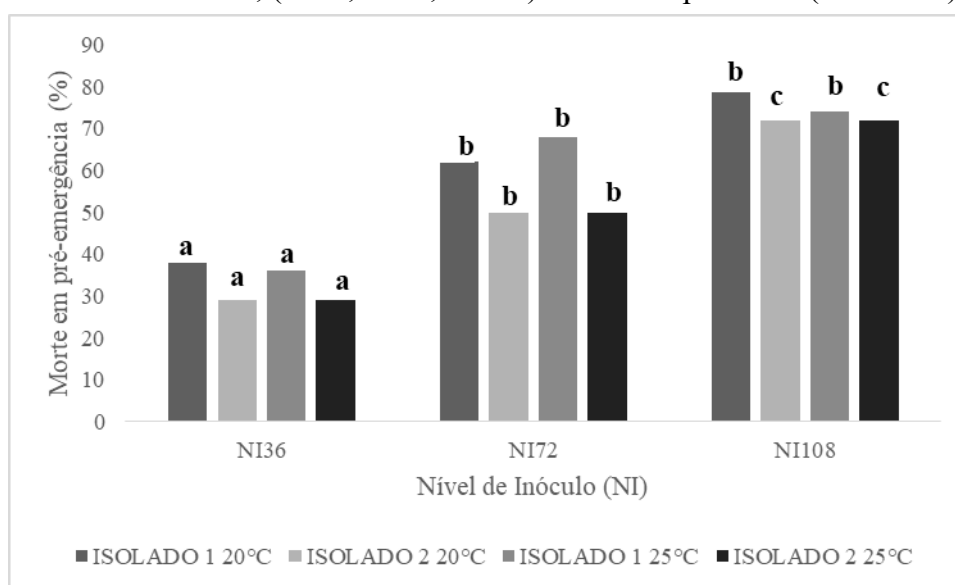
Para as variáveis morte em pré-emergência e taxas de transmissão, com observação de plantas sintomáticas e assintomáticas, foi realizada a análise exploratória dos dados, efetivada para a verificação de presença de outlayer, normalidade e homoscedasticidade, a fim de verificar a sua força e confiabilidade. Após a análise inicial e a confirmação da normalidade, foi feita a análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade. Nas variáveis que apresentaram diferença significativa pelo teste R, foi feito o estudo de correlação e, para as que apresentaram de média à forte correlação, foi feito o estudo de regressão para ajuste de equação. Nas variáveis, em que não houve ajuste de equação, apresentando correlação fraca entre as variáveis respostas e os tratamentos, mas apresentaram diferenças significativas no teste F, foi aplicado o teste de skott-knott, a 5%, para análise múltipla de médias. Todas as análises foram realizadas utilizando os pacotes tidyverse, corr, vegan, deplyr e agricolae do programa estatístico RStudio.

Para a taxa de transmissão total, consideraram-se todos os percentuais das taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas e morte em pré-emergência.

3 RESULTADOS

Os valores percentuais de mortes de sementes e plântulas de soja atribuídos à ação dos isolados de *C. cassiicola*, em dois ambientes de cultivo com temperaturas de 20 e 25° C, expressos na Figura 1, mostram que houve uma proporcionalidade direta desses valores, em relação aos níveis de inóculo dos dois isolados presentes nas sementes utilizadas neste estudo. De modo geral, houve uma tendência de maior agressividade do isolado 1. Os valores máximos percentuais de mortes de sementes/plântulas, na temperatura de 20°C, foram de 78,5 e 72%, enquanto, na temperatura de 25°C, foram de 74 e 72% (isolados 1 e 2, no nível de inóculo NI108). Estatisticamente, o isolado 2, em ambas as temperaturas, apresentou uma ação progressiva significativa na percentagem de mortes em relação ao nível de inóculo (Figura 1).

Figura 1 - Percentual de morte de sementes/plântulas de soja em pré-emergência, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108) e duas temperaturas (20 e 25°C).

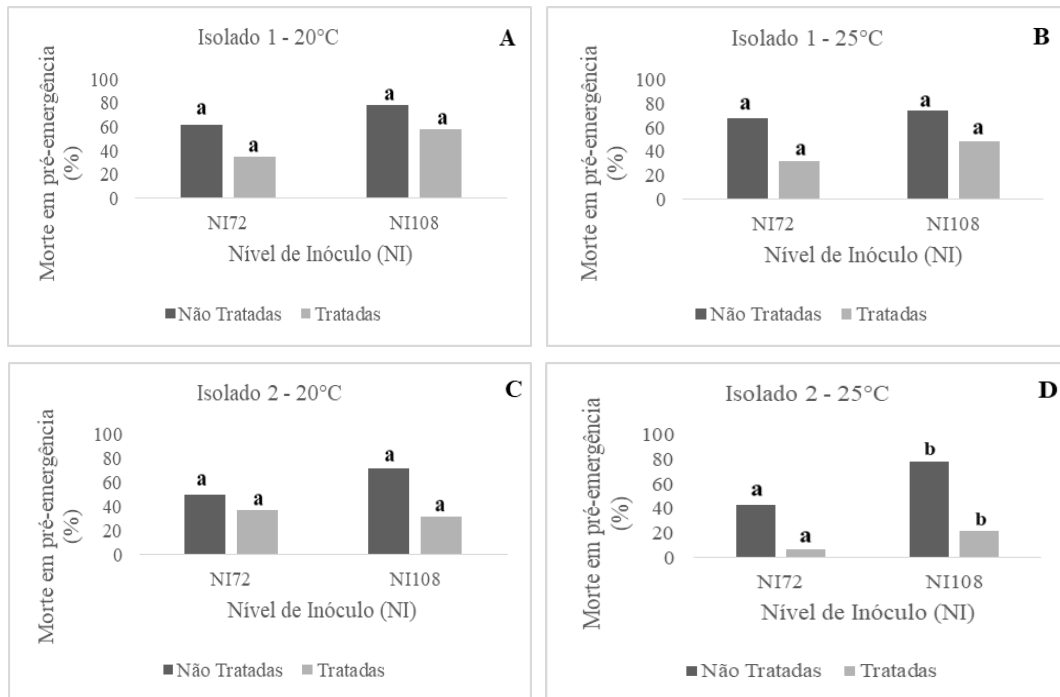


Fonte: Da autora (2024).

Por sua vez, para sementes tratadas com fungicidas, resultados na Figura 2, observa-se que, nos níveis de inóculo NI72 e NI108, não houve diferença entre os tratamentos para ambos os isolados, embora tenha havido uma tendência de redução desses valores em sementes tratadas com fungicida. Em nível de inóculo menor a 20°C (Figura 2 A e C), a redução do percentual de sementes/plântulas mortas, proporcionada pelo tratamento fungicida, foi da ordem de 50%. O mesmo ocorreu para isolado 1, à temperatura de 25°C (Figura 2 B). Em geral, os efeitos do patógeno foram mais severos na temperatura de 25°C, isolado 2, em que os

resultados apresentaram 43 e 78% (NI72 e NI108, sem tratamento) e 7% e 22% (NI72 e NI108, com tratamento) (Figura 2 D).

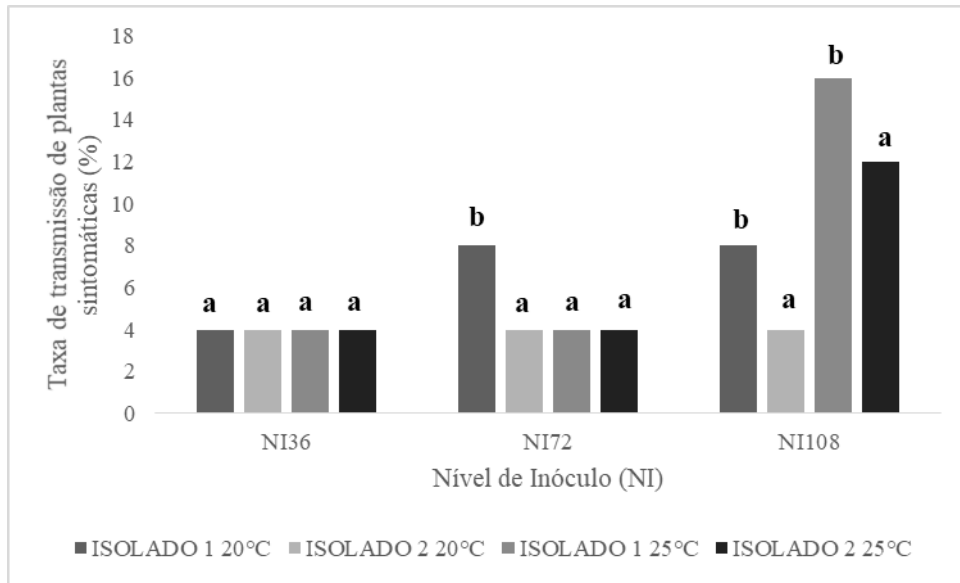
Figura 2 - Percentual de morte de sementes/plântulas de soja em pré-emergência, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo nas sementes (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas em cultivos a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 1, 25 °C; C – isolado 2, 20 °C; D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

A taxa de transmissão calculada, com base em plantas sintomáticas, considerando-se o cultivo a 20°C, isolado 1, diferenciou-se estatisticamente entre os níveis de inóculo do patógeno em sementes. A menor taxa de transmissão, 4%, foi registrada em sementes com nível de inóculo NI36; taxas mais elevadas, 8%, foram observadas em plantas sintomáticas oriundas de sementes com níveis de inoculo de NI72 e NI108. Em relação ao isolado 2, não houve diferença estatística entre os níveis de inóculo, apresentando todos uma taxa de transmissão média de 4%. Na temperatura de 25°C, para ambos os isolados, houve diferença estatística em NI108 com percentual de transmissão de 16% e 12%, respectivamente (Figura 3).

Figura 3 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes à progênie com formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).



Fonte: Da autora (2024).

Por sua vez, o efeito do patógeno, na taxa de transmissão de plantas sintomáticas, considerando-se sementes infectadas e tratadas com fungicidas, foi somente detectado e com diferença estatística para o isolado 1, em cultivo à temperatura de 25°C, em sementes com nível de inóculo NI72 (Figuras 4 A, B, C e D). Em geral, houve uma tendência de valores menores de taxa de transmissão de *C. cassiicola* em sementes que foram tratadas contra o patógeno.

Figura 4 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes à progênie com formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20 °C; C – isolado 1, 25 °C; D – isolado 2, 25 °C.

(Continua)

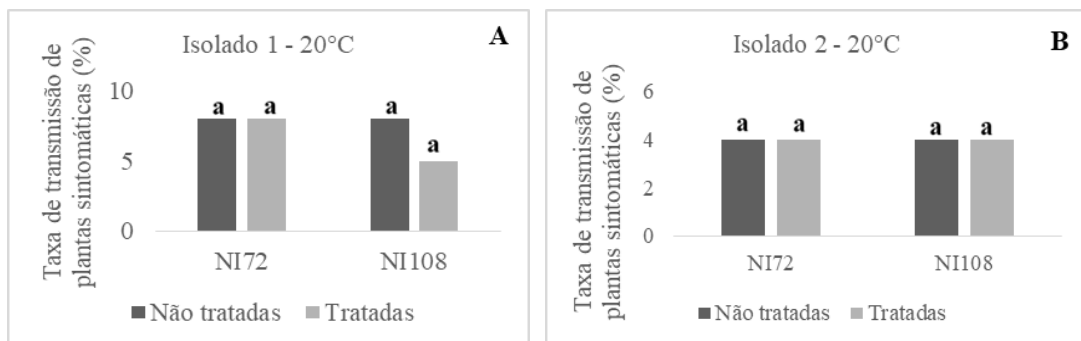
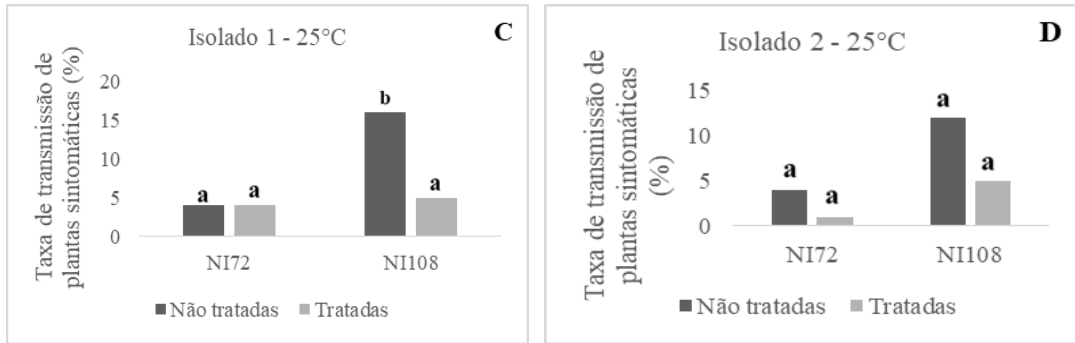


Figura 4 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes à progênie com formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20 °C; C – isolado 1, 25 °C; D – isolado 2, 25 °C.

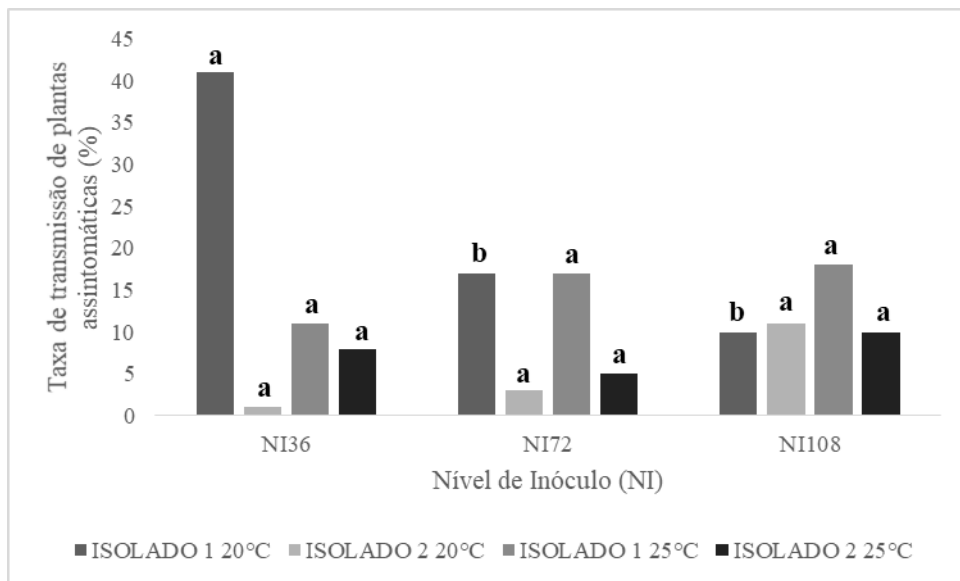
(Conclusão)



Fonte: Da autora (2024).

Os resultados referentes à taxa de transmissão de *C. cassiicola*, isolado 1 de sementes a plantas assintomáticas evidenciam que somente na temperatura de 20°C houve diferença estatística entre as temperaturas, isolados e níveis de inóculo, sendo o maior percentual observado em NI36 (41%). Para os níveis de inóculo mais elevados, os valores das taxas de transmissão foram de 17% e 10%, respectivamente (Figura 5).

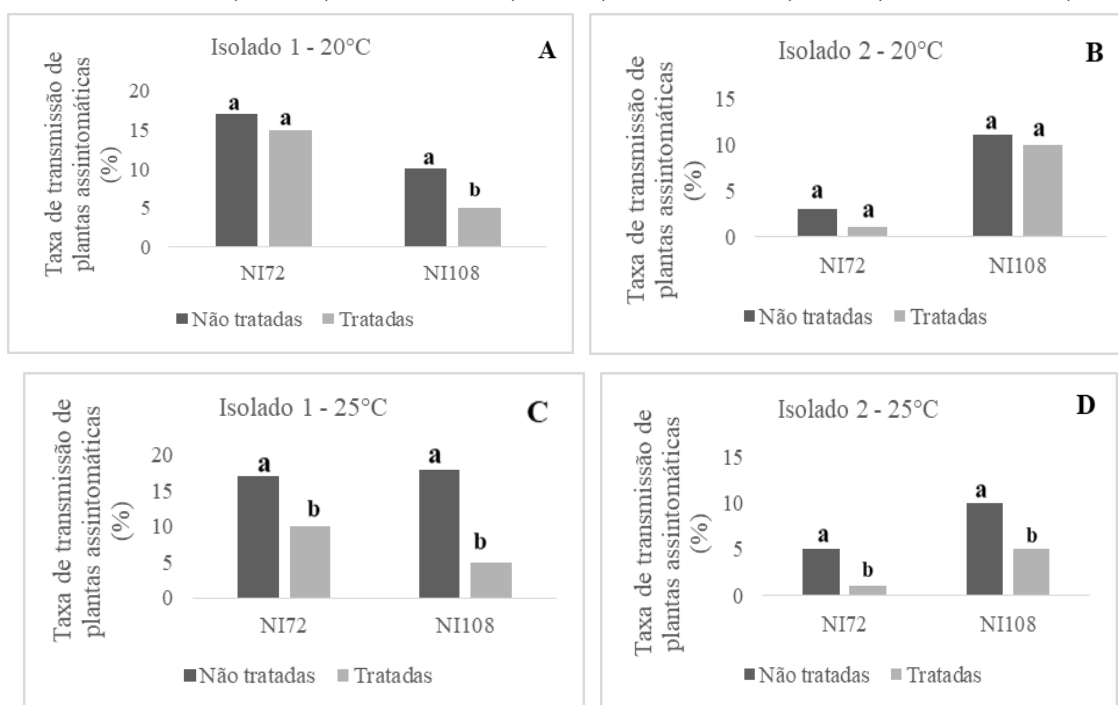
Figura 5 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes à progênie sem formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).



Fonte: Da autora (2024).

As sementes infectadas e tratadas com fungicidas, de modo geral, apresentaram uma menor taxa de transmissão de plantas assintomáticas, quando comparadas ao tratamento, sem a aplicação do produto fungicida nas sementes (Figuras 6 A, B, C e D). Observa-se também que, na temperatura de 25°C, para o isolado 1, em nível de inóculo NI108, houve um maior controle do patógeno, com o uso do tratamento químico de sementes, cuja taxa de transmissão de plantas oriundas de sementes tratadas infectadas foi de 5%, enquanto as plantas desenvolvidas, a partir de sementes infectadas não tratadas, apresentou 18% de taxa de transmissão de plantas assintomáticas) (Figura 6 C).

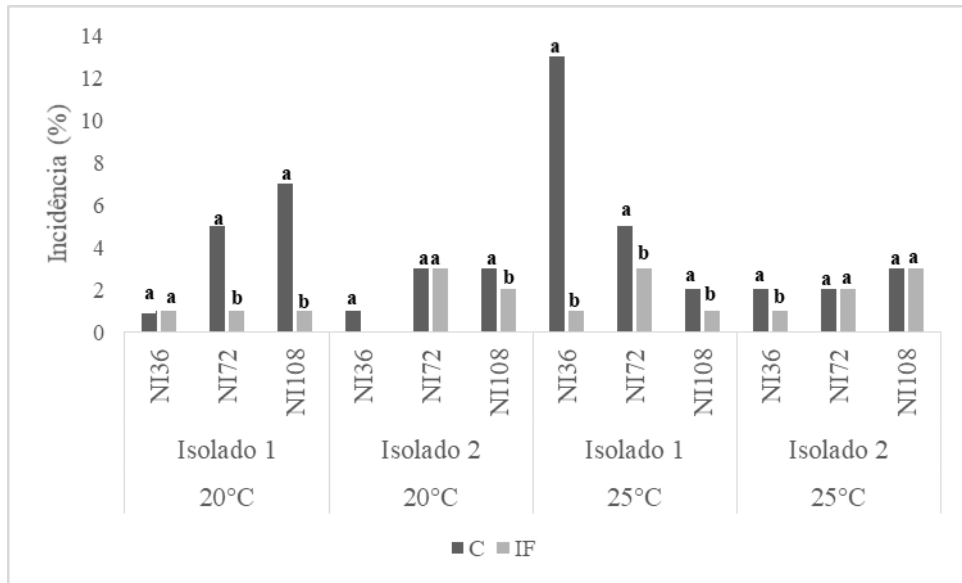
Figura 6 - Taxa de transmissão de *Corynespora cassiicola* de sementes à progênie sem formação de sintomas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20 °C; C – isolado 1, 25 °C; D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

Para a taxa de transmissão de *C. cassiicola* de sementes para plantas assintomáticas, considerando a região da planta analisada, o colo (C) e a área de inserção da última folha (IF), a diferença entre essas duas avaliações foi observada sem padrão consistente nesse tipo de interação, em que todos os fatores estudados indicaram a presença de *C. cassiicola*. (Figura 7).

Figura 7 - Incidência de *Corynespora cassiicola* em plantas assintomáticas, seccionadas em: colo (C) e inserção foliar (IF), em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108) e duas temperaturas (20 °C e 25 °C).



Fonte: Da autora (2024).

O tratamento de sementes neste estudo mostrou ser uma ferramenta capaz de reduzir em níveis significativos a incidência do patógeno em fragmentos do colo (C) e última inserção de folha (IF) (Isolados 1 e 2, temperaturas 20 e 25°C) (Figuras 8 A e B).

Figura 8 - Incidência de *Corynespora cassiicola* em plantas assintomáticas, seccionadas em: colo (C) e inserção foliar (IF), em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – NI72; B – NI108.

(Continua)

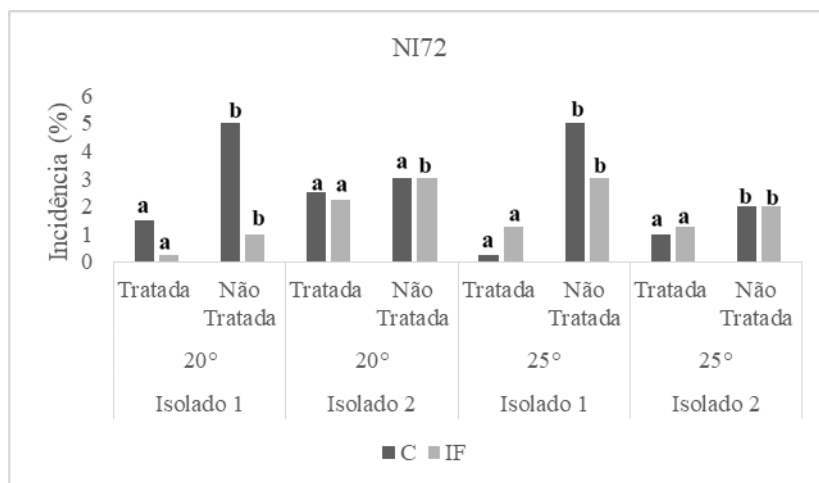
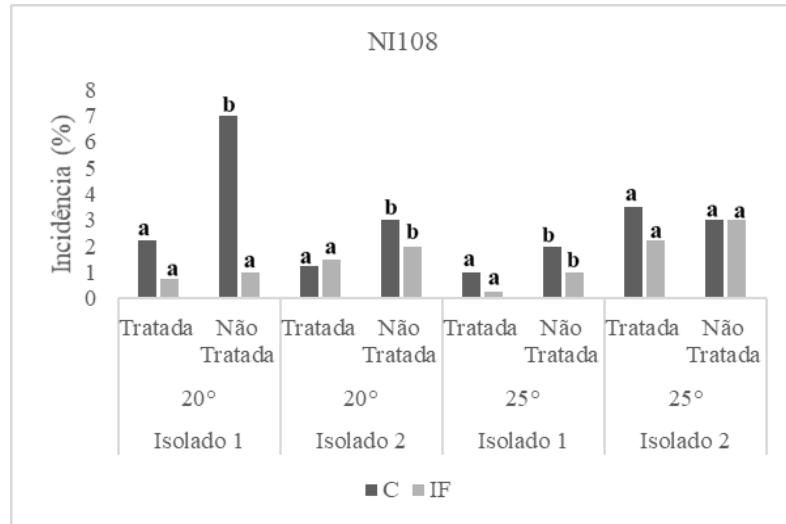


Figura 8 - Incidência de *Corynespora cassiicola* em plantas assintomáticas, seccionadas em: colo (C) e inserção foliar (IF), em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – NI72; B – NI108.

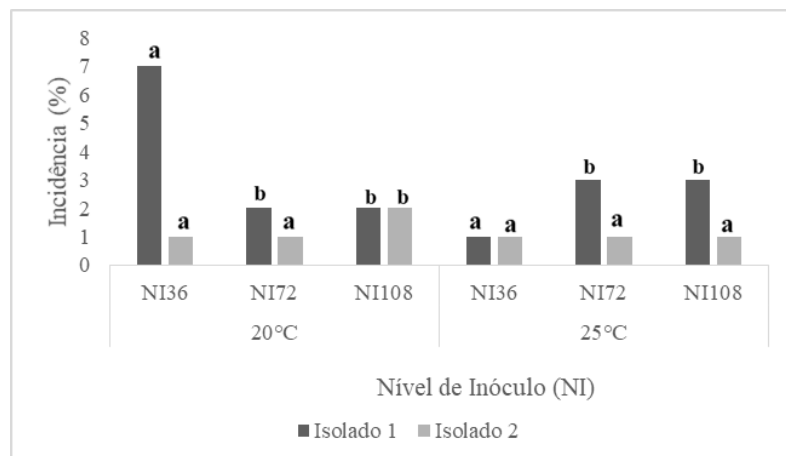
(Conclusão)



Fonte: Da autora (2024).

Nas avaliações feitas, por meio da técnica de PCR Convencional, para detectar a presença de *C. cassiicola*, nos fragmentos de plantas emergidas assintomáticas, em todos os níveis de inóculo do patógeno (Figuras 9 e 11), observou-se que a maior incidência do fungo foi de 7% com o isolado 1, no nível de inóculo NI36 e, em cultivo, à temperatura de 20 °C, enquanto testes conduzidos, na temperatura de 25 °C, verificou-se a incidência de 3% do isolado 1 em NI72 e NI108 (Figura 9).

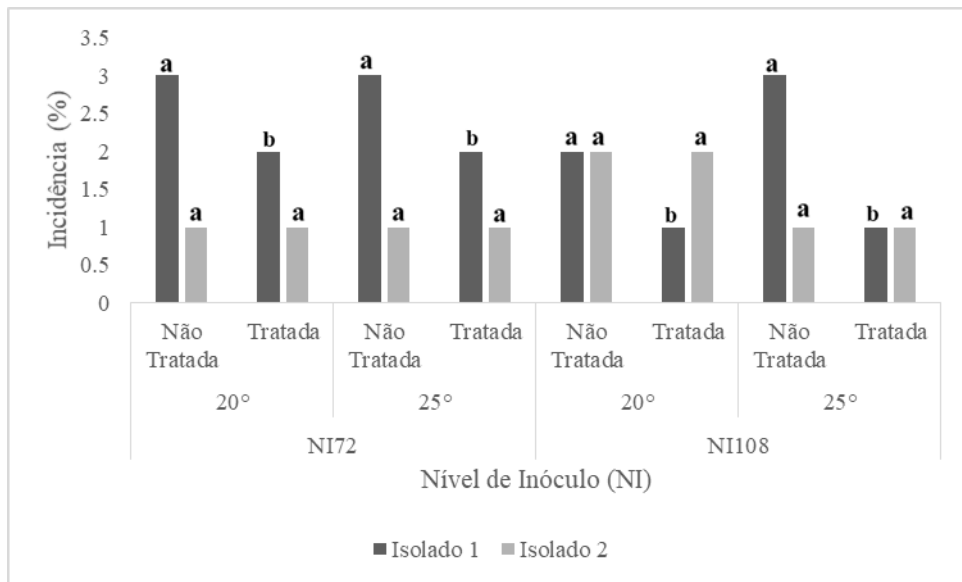
Figura 9 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, em diferentes níveis de inóculo, (NI36, NI72, NI108), por meio a técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

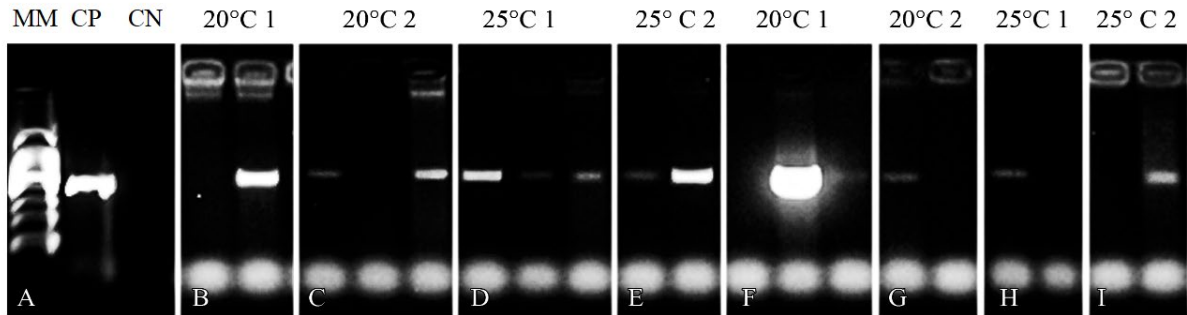
Nas avaliações moleculares (PCR Convencional) realizadas, para detectar a presença de *C. cassiicola*, nos fragmentos oriundos de sementes infectadas e tratadas com fungicidas, constatou-se que, em fragmentos de plantas assintomáticas sem o tratamento químico de sementes, houve uma maior incidência do patógeno, isolado 1, nas temperaturas de 20 e 25 °C e níveis de inóculo NI72 e NI108. Estatisticamente, quando comparado o isolado 2, as temperaturas e níveis de inóculo em estudo, não se verificou diferença entre as médias (Figura 10 e 11).

Figura 10 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), por meio da técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

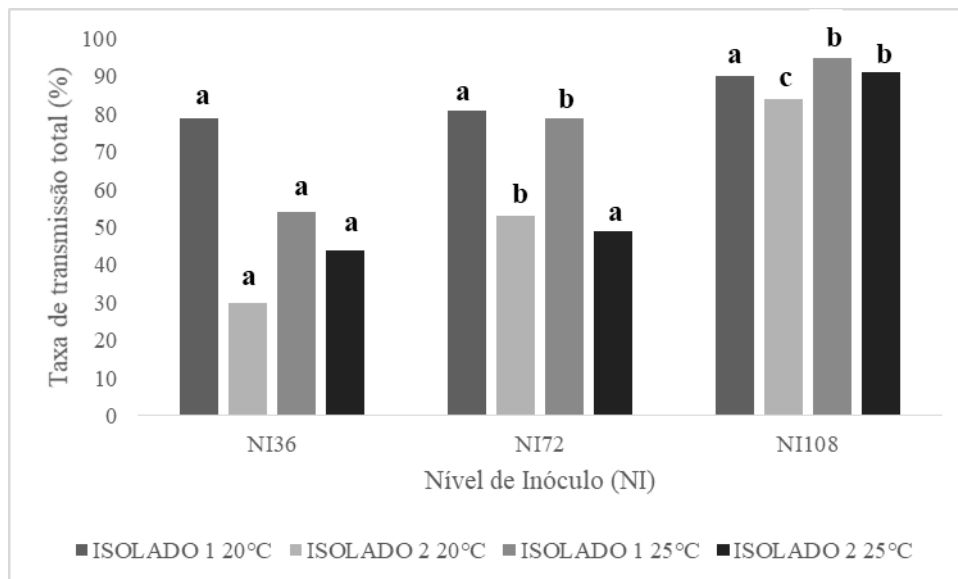
Figura 11 - Detecção dos isolados 1 e 2 de *Corynespora cassiicola*, por meio a técnica de PCR convencional, realizada em secções de plantas assintomáticas, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. (A) MM- Marcador molecular, CP- Controle positivo e CN- Controle negativo; Sem tratamento químico de sementes: (B) Isolado 1, 20°C; (C) Isolado 2, 20°C; (D) Isolado 1, 25°C; (E) Isolado 2, 25°C. Com tratamento químico de sementes: (F) Isolado 1, 20°C; (G) Isolado 2, 20°C; (H) Isolado 1, 25°C; (I) Isolado 2, 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

Os maiores valores de taxa de transmissão total, que é o somatório das taxas de transmissão em sementes/plântulas mortas, em plantas sintomáticas e plantas assintomáticas, foram observados, no nível de inóculo mais alto, em ambas as temperaturas e isolados utilizados neste estudo. Entre os tratamentos, o isolado 1, à temperatura de 25°C, em sementes com nível de inóculo NI108, apresentou a maior taxa de transmissão de *C. cassiicola*, 95%.

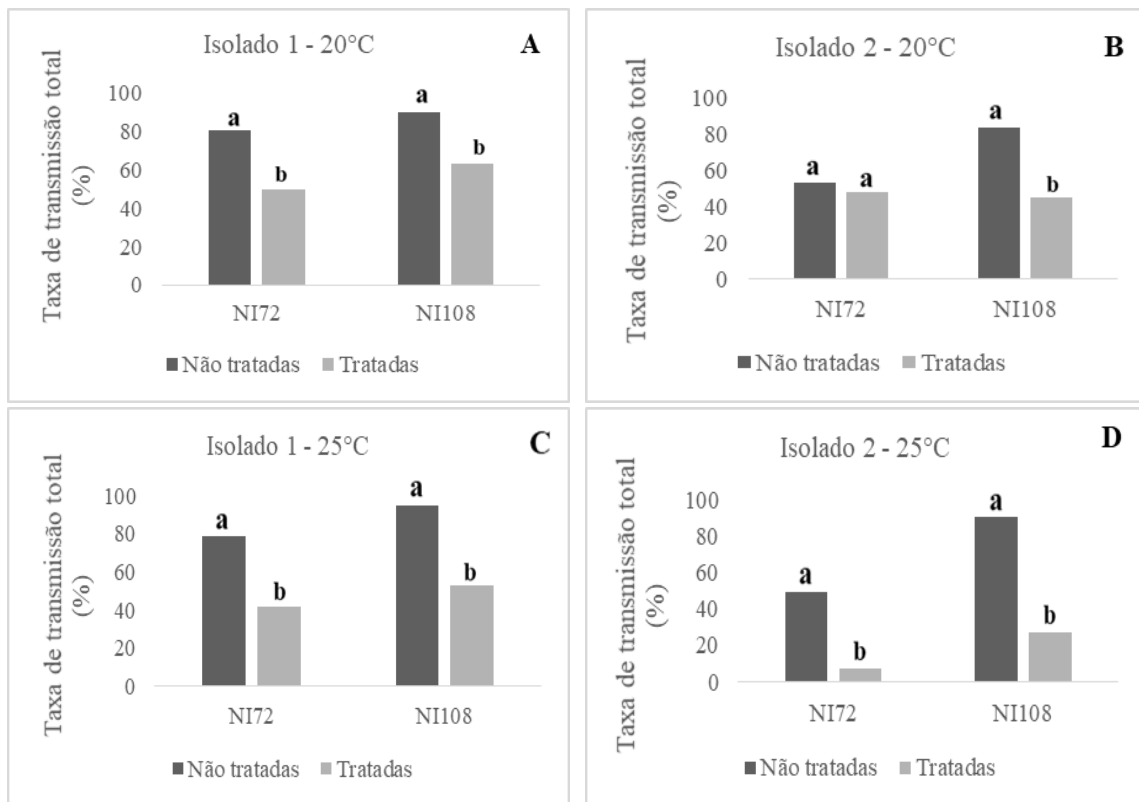
Figura 12 - Taxa de transmissão total de *C. cassiicola*, relativa ao somatório de sementes/plântulas com morte em pré-emergência, plantas sintomáticas e assintomáticas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C.



Fonte: Da autora (2024).

No que tange ao tratamento químico de sementes, foi possível verificar que esse tipo de procedimento constitui um fator de alto poder de redução da taxa de transmissão do agente da mancha-alvo (Figuras 13 A, B, C e D), sendo capaz de provocar diminuição de aproximadamente 50% da taxa de transmissão, na temperatura de 25°C, isolados 1 e 2 e sementes com os níveis de inóculo NI72 e NI108 (Figuras 13 C e D).

Figura 13 - Taxa de transmissão total de *C. cassiicola*, relativa ao somatório de sementes/plântulas com morte em pré-emergência, plantas sintomáticas e assintomáticas, em relação a dois isolados (1 e 2), em diferentes níveis de inóculo, (NI72, NI108), tratadas e não tratadas desenvolvidas a 20 e 25°C. A – isolado 1, 20 °C; B – isolado 2, 20 °C; C – isolado 1, 25 °C; D – isolado 2, 25 °C.



Fonte: Da autora (2024).

4 DISCUSSÃO

A transmissão de *C. cassiicola* pelas sementes de soja inoculadas artificialmente foi comprovada neste estudo, considerando-se diferentes fatores, como condições de temperatura, níveis de inóculo do patógeno nas sementes e variabilidade dos isolados do patógeno. O tratamento químico de sementes incluído neste estudo foi um fator que proporcionou a redução das taxas de transmissão do patógeno, porém não impedindo por completo esse processo.

Os resultados deste estudo indicam, de modo geral, que as condições de ambiente utilizadas não foram adequadamente favoráveis ao desenvolvimento de sintomas típicos da mancha-alvo, nas plantas emergidas até o período final de avaliações. Percebe-se que os valores médios de taxa de transmissão do patógeno, a partir de sementes inoculadas, foram relativamente mais baixos comparados com os resultados de avaliações em plantas assintomáticas. Importante ressaltar que, mesmo em sementes com níveis de inóculo mais baixos, caso de NI36, houve transmissão do patógeno, em níveis variados, que, do ponto de vista epidemiológico, são ainda comprometedores.

Trabalho conduzido por Goulart e Utiamada (2020), para esse mesmo patossistema e utilizando metodologia diferente de avaliação da transmissão do patógeno via sementes, mostrou que, em plantas sintomáticas, as taxas de transmissão atingiram valores de 42,2%, a partir de sementes com um nível de inóculo equivalente a NI48. Neste trabalho, os cálculos de taxa de transmissão foram baseados apenas em observação de plantas sintomáticas, no caso, necroses produzidos nos cotilédones, não se levando em conta a transmissão do patógeno em plantas assintomáticas.

Esse é o primeiro relato, de forma quantificada, da transmissão de *C. cassiicola*, a partir das sementes de soja infectadas artificialmente à progênie, levando-se em consideração plantas sintomáticas e assintomáticas, com confirmação pela técnica de PCR convencional.

Estudos na mesma linha de pesquisa com outros patossistemas, como *Exserohilum turcicum* em milho (Guimarães, 2020), *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* em milho (Siqueira *et al.*, 2014, 2016), *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (Gadaga; Siqueira; Machado, 2020), *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão e soja (França *et al.*, 2021), *Colletotrichum truncatum* em soja (Silva Júnior *et al.*, 2021), mostraram que as taxas de transmissão dos patógenos pelas sementes de seus respectivos hospedeiros e os efeitos decorrentes dessa interação variam, em função de diversos fatores, sendo o nível ou potencial de inóculo inicial nas sementes um dos mais importantes.

De modo geral, o padrão de transmissão de *C. cassicola* pelas sementes de soja, neste trabalho, com base no cálculo das taxas de transmissão de posse dos fatores utilizados nesta avaliação, segue o que tem sido observado com outros patossistemas. Vale salientar que os reflexos da transmissão de patógenos via sementes pode levar a consequências variadas; uma delas é a natureza do patógeno, em termos de habitat natural, como caso de solo ou parte aérea das plantas. No caso de *C. cassicola*, é importante considerar que se trata de um organismo da parte aérea de plantas hospedeiras, que tem a capacidade de sobreviver na forma micelial e clamidósporos em tecidos de plantas de restos culturais (Oliveira *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÃO

A taxa de transmissão total de *C. cassiicola* de sementes de soja à progênie é variável, em função de diversos fatores, podendo atingir níveis próximos a 100%.

A transmissão de *C. cassiicola* por sementes de soja pode ocorrer de forma assintomática, em determinadas circunstâncias, atingindo taxa média de 41%.

A morte em pré-emergência de sementes/plântulas e as taxas de transmissão total são diretamente proporcionais aos potenciais de inóculo de *C. cassiicola* em sementes de soja.

O tratamento químico de sementes é uma medida de manejo da mancha-alvo em soja de grande relevância por proporcionar reduções significativas da taxa de transmissão do patógeno via sementes.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. E. F. **Variação e efeitos de potencial de inóculo natural de *Drechslera oryzae* e *Phomopsis sojae* em lotes de sementes de arroz e soja.** 2019. 40 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009a. 399 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes.** Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009b. 200 p.
- DIXON, L. J. *et al.* Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 9, p. 1015-1027, 2009.
- FRANÇA, S. K. S. D. *et al.* Quantification and conceptual validation of the inoculum potential of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and bean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 43, p. 1-11, 2021.
- GADAGA, S. J. C.; SIQUEIRA, C. D. S.; MACHADO, J. D. C. Transmission potential of *Colletotrichum lindemuthianum* (race 65) in association with bean seeds under controlled conditions. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 42, p. 1-9, 2020.
- GODOY, C. V. *et al.* **Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Londrina: Embrapa Soja, 2013. (Circular técnica).
- GOULART, A. C. P.; UTIAMADA, C. M. *Corynespora cassiicola* in soybean seeds: incidence and transmission. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 36, p. 259-265, 2020.
- GUIMARÃES, M. D. R. F. **Interactions between *Exserohilum turcicum* and maize seeds: detection, effects and transmission of the pathogen.** 2020. 84 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.
- KOENNING, S. R.; CRESWELL, T. C. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in southeastern United States. **Plant Disease**, Quebec, v. 90, p. 974, 2006.
- MACHADO, J. C. *et al.* Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. **Proceedings** [...]. Angers: ISTA, 2001. p. 62.
- MACHADO, J. C. *et al.* Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 37-63, 2012.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A. Computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, 1995.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Chlamydospore formation by *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 37, n. 6, p. 415-418, 2012.

PANIQUE, T. N. **La mancha anillada de lasoya (*Corynespora cassiicola*)**. La Paz: Fundacruz, 2007.

SILVA JÚNIOR, M. B. da *et al.* Effect of temperature on *Colletotrichum truncatum* growth, and evaluation of its inoculum potential in soybean seed germination. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 160, p. 999-1004, Apr. 2021.

SIQUEIRA, C. S. *et al.* Potential for transmission of *Stenocarpella macrospora* from inoculated seeds to maize plants grown under controlled conditions. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 154-161, 2014.

SIQUEIRA, C. S. *et al.* Transmission of *Stenocarpella maydis* by maize seeds. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 2, p. 393-400, 2016.

SOUSA, M. V. D.; SIQUEIRA, C. D. S.; MACHADO, J. D. C. Conventional PCR for detection of *Corynespora cassiicola* in soybean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, p. 85-91, 2016.

ZANCAN, W. L. A. *et al.* Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled conditions. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 3, p. 775-784, 2015.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, é uma doença que vem assumindo uma grande importância no Brasil, nos últimos anos, atingindo níveis preocupantes, em cultivos de soja e algodão, em uma crescente área no país. Trata-se de uma doença cujo agente causal é associado às sementes de seus hospedeiros, não havendo, no entanto informações mais aprofundadas sobre esse tipo de interação. Presume-se que a rápida disseminação da doença seja decorrente de uso de sementes infectadas ou contaminadas com inóculo do referido patógeno. Essa situação torna-se mais preocupante, considerando-se que não se dispõe, até o momento, de genótipos resistentes à doença. Na ausência de conhecimentos mais concretos sobre o real papel das sementes, no ciclo da referida doença em algodão e soja, entende-se que é essencial que estudos sejam conduzidos com fundamentos sólidos de metodologias específicas que já estão disponíveis em trabalhos desenvolvidos com outros patossistemas.

Neste estudo, em que alguns dos principais fatores que interferem nas relações de patógenos com sementes de seus hospedeiros, como variabilidade genética e fisiológica do patógeno, níveis (potenciais) de inóculo do patógeno nas sementes, temperatura de cultivo e tratamento sanitário de sementes, no caso da soja, foram considerados, e os resultados podem ser considerados convincentes, para demonstrar os riscos que os agricultores correm com o uso de sementes de algodão e soja portadoras de *C. cassiicola*, bem como, para possibilitar a formulação de estratégias de manejo sanitário das sementes, visando ao controle dessas doenças.

Importante salientar que os efeitos de *C. cassiicola*, a partir das sementes, foram, em geral, mais severos em soja do que em algodão e esse fato pode ser atribuído, em grande parte, à origem dos isolados utilizados que procederam de isolamentos conduzidos, a partir de tecidos de soja com sintomas da doença.

Além dos efeitos causados, no desempenho das sementes, representados por reduções drásticas de germinação e vigor, culminando com reduções de estandes, altura e pesos de plantas, resultantes da ação do referido patógeno, é oportuno ressaltar o papel crucial de sementes infectadas ou contaminadas na disseminação do inóculo entre áreas de cultivo sem limites de distâncias geográficas.

Por tratar-se de um organismo necrotrófico com alta capacidade de sobrevivência, na ausência de hospedeiros em desenvolvimento, percebe-se que o uso de sementes livres de *C.*

cassicola ou em níveis toleráveis, mediante o tratamento de sementes, constitui uma medida das mais eficazes no manejo da mancha-alvo em algodão e soja.

Uma vez comprovada a ação danosa de *C. cassicola*, a partir de sua presença nas sementes de espécies hospedeiras, como soja e algodão, uma preocupação que surge, para a formulação de estratégia de manejo da mancha-alvo nesses hospedeiros, diz respeito à necessidade de se dispor de métodos adequados de diagnose do patógeno, em amostras de sementes dessas culturas, tendo em vista que o blotter test, comumente usado em análises de rotina, apresenta algumas dificuldades para a detecção rápida e mais segura do agente causal da mancha-alvo. O uso de técnicas moleculares, baseadas em análise de DNA por PCR convencional, representa uma ferramenta poderosa que deve ser incorporada, como parte de esquemas de detecção desse patógeno, em combinação com métodos biológicos. Por outro lado, estudos sobre a eficácia do tratamento de sementes, visando ao controle de *C. cassicola* presente nas sementes de soja e algodão, tornam-se também uma prioridade do ponto de vista de manejo dessa doença. Nesse sentido, o foco deve ser voltado tanto para o tratamento químico como para o uso de agentes biológicos, conforme tem sido feito com sucesso em outros patossistemas.