



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JACQUELINE DALBELO PUJA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* E SINTOMATOLOGIA DE MANCHA ALVO EM DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA**

---

Londrina  
2021  
**JACQUELINE DALBELO PUIA**

Engenheira agrônoma

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola*  
E SINTOMATOLOGIA DE MANCHA ALVO EM DIFERENTES  
CULTIVARES DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Pós-graduação em Agronomia da Universidade  
Estadual de Londrina, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri

Coorientadora: Dra. Sandra Cristina Vigo

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Puia, Jacqueline Dalbelo.

Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e sintomatologia de mancha alvo em diferentes cultivares de soja / Jacqueline Dalbelo Puia. - Londrina, 2021.

98 f. : il.

Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri.

Coorientador: Sandra Cristina Vigo.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. *Corynespora cassiicola* - Tese. 2. *Glycine max* - Tese. 3. Posição do dossel - Tese. 4. Período de incubação - Tese. I. Canteri, Marcelo Giovanetti . II. Vigo, Sandra Cristina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

JACQUELINE DALBELO PUIA

## **CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* E SINTOMATOLOGIA DE MANCHA ALVO EM DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador Dr. Marcelo Giovanetti Canteri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Rui Pereira Leite Junior  
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –  
IAPAR-EMATER-IDR-Paraná

---

Prof. Dra. Maria Isabel Balbi Peña  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de fevereiro de 2021

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela graça da vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo CAPES.

A minha família por todo o apoio, especialmente aos meus pais Joel e Jeanete pela paciência e incentivo nessa minha jornada.

Ao meu marido Adriano pela paciência, amor e carinho.

A todos os professores da Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - PR, pela dedicação em ensinar; pelos esclarecimentos e conhecimentos ofertados ao longo do curso.

Agradeço em especial ao Profº. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri e Profª. Drª. Sandra Cristina Vigo pela orientação, oportunidade, paciência, incentivo, disponibilidade e profissionalismo de ambos.

Agradeço a parceria do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR-EMATER, IDR-Paraná, em especial ao Dr. Humberto Androcioli, Me. Leandro Borsato e Dr. Yeshwant Mehta pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos colegas Leandro Borsato, José Rocha, Emily Danila, Isabela Brusarosco, Ana Moreira, Helen Paiva, Maria Júlia Sales, Janaina Netzel, Bruna Avelino e Bruna Ricini pelo companheirismo.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos. Obrigada!

PUIA, Jacqueline Dalbello. **Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e sintomatologia de mancha alvo em diferentes cultivares de soja.** 2021. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

A mancha alvo da soja causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* ocorre em todas as regiões sojícolas do Brasil, causando reduções de produtividade até 45% e perdas significativas na cultura. O objetivo do estudo foi caracterizar os parâmetros monocíclicos, resultantes da interação entre oito isolados de *C. cassiicola* e oito cultivares comerciais de soja, bem como determinar os sintomas exibidos pelas plantas inoculadas neste patossistema. Dois experimentos foram instalados, um *in vitro* e outro sob condições de câmara climatizada. O delineamento experimental do ensaio *in vitro* foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 8 (meios de cultura x isolados), com cinco repetições. Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo os meios de cultura BDA e Suco V8 Ágar. Foram avaliadas a coloração, aspecto e taxa do crescimento micelial, produção, dimensões e número de septos dos conídios. O delineamento experimental do ensaio em câmara climatizada foi de blocos casualizados em arranjo fatorial 8 x 8 (isolados de *C. cassiicola* x cultivares de soja), com cinco repetições. Plantas em estádio fenológico V4, foram inoculadas com suspensão de cada isolado ( $2 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>). Para cada combinação isolado e cultivar de soja, foram quantificados o número de lesões, período de incubação, a incidência e tipo de manchas necróticas em órgãos vegetativos. No ensaio *in vitro*, verificou-se que o meio de cultura em que *C. cassiicola* é submetido influencia a cor e taxa de crescimento, mas não influencia o aspecto de micélio da colônia. Os aspectos de micélio aparentam estar relacionados ao hospedeiro de origem. Isolados oriundos de plantas de algodão apresentaram aspecto de micélio plano, enquanto isolados provenientes de plantas de soja tendem a apresentar micélio aéreo cotonoso. O meio Suco V8 Ágar proporcionou a maior taxa de crescimento para os isolados de *C. cassiicola* quando comparado ao meio BDA. A produção de conídios em isolados oriundos de plantas de soja é equivalente ou maior quando cultivados em meio Suco V8 Ágar. As características morfológicas dos conídios de *C. cassiicola* apresentaram grande variabilidade em relação ao próprio isolado e ao meio de cultivo. Quanto ao segundo ensaio, a severidade e período de incubação de mancha alvo são influenciados pelos isolados de *C. cassiicola*, cultivares de soja e a posição do trifólio nas plantas. O isolado ISO 4S ocasiona maior severidade de mancha alvo, em relação aos isolados ISO 2A, ISO 2S e ISO 11S. Menor severidade da doença ocorre para os cultivares de soja BMX Potência RR, BMX Força RR e NA 5909 RG, em relação ao cultivar BMX Elite IPRO. Independente do cultivar avaliado, o período de incubação tende a ser maior para o isolado ISO 4S. A quantidade de lesões e o período de incubação de *C. cassiicola* é maior no trifólio inferior e menor no trifólio superior das plantas. Cinco padrões de lesões foram identificados. Os isolados ISO 1S, ISO 4S e ISO 11S ocasionam sintomas mais severos. Maior porcentagem de folhas com lesões ocorreu nos cultivares BMX Elite IPRO, BRS 284, BMX Garra IPRO e NA 5909 RG. Lesões com menor severidade ocorreram nos trifólios da posição média das plantas de soja. Sintomas nos cotilédones, folhas unifolioladas, pecíolos e haste das plantas foram observados. O isolado ISO 4S inoculado nos cultivares BMX Potência RR e BMX Força RR ocasionou maior incidência de lesões. A incidência de lesões nos pecíolos, aumentou conforme a posição em que o pecíolo é inserido na haste principal.

**Palavras-chave:** Mancha alvo. *Glycine max*. Posição de trifólio. Período de incubação.

PUIA, Jacqueline Dalbelo. **Characterization of *Corynespora cassiicola* isolates and target spot symptomatology in different soybean cultivars.** 2021. 98 p. Dissertation (Master's in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Soybean target spot caused by the fungus *Corynespora cassiicola* occurs in all soybean regions in Brazil, causing yield reductions of up to 45% and significant crop losses. The objective of the study was to characterize the monocyclic parameters resulting from the interaction between eight isolates of *C. cassiicola* and eight commercial soybean cultivars, as well as to determine the symptoms exhibited by inoculated plants in this pathosystem. Two experiments were set up, one in vitro and the other under climate-controlled chamber conditions. The experimental design of the in vitro test was entirely randomized in a 2 x 8 factorial scheme (culture media x isolates), with five repetitions. The isolates were plated on Petri plates containing BDA and Juice V8 Agar culture media. The coloration, appearance and rate of mycelial growth, production, dimensions and number of septa of the conidia were evaluated. The experimental design of the chamber test was a randomized block design with an 8 x 8 factorial arrangement (*C. cassiicola* isolates x soybean cultivars), with five repetitions. Plants in the V4 phenological stage were inoculated with a suspension of each isolate ( $2 \times 10^4$  conidia mL $^{-1}$ ). For each isolate and soybean cultivar combination, the number of lesions, incubation period, incidence and type of necrotic spots on vegetative organs were quantified. In the in vitro assay, it was found that the culture medium in which *C. cassiicola* is subjected influences the color and growth rate, but does not influence the mycelium appearance of the colony. The mycelium aspects appear to be related to the host of origin. Isolates from cotton plants had a flat mycelium appearance, while isolates from soybean plants tended to have cottony aerial mycelium. Juice V8 Agar medium provided the highest growth rate for *C. cassiicola* isolates when compared to BDA medium. The production of conidia in isolates from soybean plants is equivalent or greater when grown on Juice V8 Agar medium. The morphological characteristics of *C. cassiicola* conidia showed great variability in relation to the isolate itself and the culture medium. As for the second assay, the severity and incubation period of target spot are influenced by *C. cassiicola* isolates, soybean cultivars and the position of the trefoil on the plants. The isolate ISO 4S causes higher target spot severity, compared to isolates ISO 2A, ISO 2S and ISO 11S. Lower severity of the disease occurs for the soybean cultivars BMX Potência RR, BMX Força RR and NA 5909 RG, in relation to the cultivar BMX Elite IPRO. Regardless of the cultivar evaluated, the incubation period tends to be longer for the isolate ISO 4S. The amount of lesions and the incubation period of *C. cassiicola* is greater in the lower trefoil and less in the upper trefoil of the plants. Five patterns of lesions were identified. The isolates ISO 1S, ISO 4S and ISO 11S cause more severe symptoms. The highest percentage of leaves with lesions occurred on BMX Elite IPRO, BRS 284, BMX Garra IPRO, and NA 5909 RG. Less severe lesions occurred on the midrib trifoli in soybean plants. Symptoms on the cotyledons, unifoliolate leaves, petioles and stem of the plants were observed. The isolate ISO 4S inoculated on the cultivars BMX Potência RR and BMX Força RR caused the highest incidence of lesions. The incidence of lesions on petioles increased according to the position in which the petiole is inserted in the main stem.

**Key-words:** Target spot. *Glycine max*. Trefoil position. Incubation period.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	18
<b>3 <i>Corynespora cassiicola</i> na soja .....</b>	19
3.1    HISTÓRICO.....	19
3.1.1. DANOS.....	20
3.1.2. ETIOLOGIA .....	21
3.2    CICLO DA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NO PATOSSISTEMA <i>C. CASSIICOLA</i> -SOJA..	22
3.2.1. SOBREVIVÊNCIA.....	22
3.2.2. HOSPEDEIROS.....	22
3.2.3. DISSEMINAÇÃO.....	23
3.2.4. INFECÇÃO .....	23
3.2.5. COLONIZAÇÃO.....	24
3.3    SINTOMATOLOGIA .....	24
3.4    ESTRATÉGIAS DE CONTROLE.....	26
3.5    PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS.....	28
3.5.1. PERÍODO DE INCUBAÇÃO E LATENTE .....	28
3.5.2. PERÍODO INFECCIOSO .....	29
3.5.3. ESTUDOS COM <i>CORYNESPORA CASSIICOLA</i> NA SOJA.....	30
<b>4 ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE OITO ISOLADOS DE <i>Corynespora cassiicola</i> EM DOIS MEIOS DE CULTURA.....</b>	31
4.1    RESUMO .....	31
4.2    ABSTRACT .....	32
4.3    INTRODUÇÃO .....	33
4.4    MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO .....	34
4.4.2 COLETA DAS AMOSTRAS .....	34
4.4.3 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CULTIVO DO PATÓGENO .....	35
4.4.4 AVALIAÇÕES.....	36
4.4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
4.5    RESULTADOS .....	38

4.5.1	Pigmentação e aspecto da colônia .....	38
4.5.2	Taxa de crescimento micelial .....	39
4.5.3	Produção de conídios .....	40
4.5.4	Dimensões dos conídios .....	42
4.5.5	Número de septos.....	42
6.5.6	DISCUSSÃO .....	43
4.6	CONCLUSÕES.....	47

## **5 ARTIGO B: INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE LESÕES QUANTO À POSIÇÃO DE TRIFÓLIOS NA INFECÇÃO DE *C. cassiicola* EM GENÓTIPOS DE SOJA .....** 48

7.1	RESUMO .....	48
7.2	ABSTRACT .....	49
7.3	INTRODUÇÃO .....	50
7.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	51
5.4.1	Local de execução.....	51
7.4.2	CULTIVARES DE SOJA UTILIZADOS.....	52
7.4.3	ISOLADOS DE <i>CORYNESPORA CASSII/COLA</i> .....	52
7.4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	52
7.4.5	CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO .....	53
7.4.6	AVALIAÇÕES.....	53
7.4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
5.5	RESULTADOS .....	54
5.5.1	LESÕES EM DIFERENTES TRIFÓLIOS DE SOJA .....	54
7.5.2	PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI).....	57
7.5.3	DISCUSSÃO.....	58
5.6	CONCLUSÕES.....	62

## **6 ARTIGO C: INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES DE MANCHA ALVO EM FOLHAS UNIFOLIOLADAS, PECÍOLOS E HASTE DE PLANTAS DE SOJA .....** 63

8.1	RESUMO .....	63
8.2	ABSTRACT .....	64
8.3	INTRODUÇÃO .....	65
8.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	66

6.4.1	Local de execução.....	66
8.4.2	CULTIVARES DE SOJA E ISOLADOS DE <i>CORYNESPORA CASSII/COLA</i> UTILIZADOS.....	66
8.4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	67
8.4.4	CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO .....	67
8.4.5	AVALIAÇÕES.....	68
8.4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	68
8.5	RESULTADOS .....	69
8.5.1	CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES .....	69
8.5.2	INFLUÊNCIA DA POSIÇÃO DO TRIFÓLIO NA CLASSIFICAÇÃO DE LESÕES .....	72
8.5.3	INFECÇÃO DE <i>C. CASSII/COLA</i> EM DIFERENTES TECIDOS VEGETAIS .....	73
8.5.4	FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO POR <i>C. CASSII/COLA</i> EM DIFERENTES TECIDOS VEGETAIS .....	74
8.5.5	DISCUSSÃO .....	77
8.6	CONCLUSÕES .....	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
8	REFERÊNCIAS .....	83

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Sintomas foliares de mancha alvo, em ambiente climatizado, 14 dias após a inoculação dos conídios por pulverização em tecido foliar de soja. (a) Manchas com tecido necrosado e halo clorótico típicas de mancha alvo em folhas de soja; (b) Manchas com tecido necrosado com expansão da lesão; (c) Manchas com centro preto de infecção cercado por anéis concêntricos de tecido necrosado; (d) Manchas com centro preto de infecção com grades halos cloróticos; (e) Manchas necróticas sem halo; (f) Manchas castanho-avermelhado sem expansão da lesão.....25
- Figura 1.1** – Localidades onde foram realizadas coletas de amostras de folhas de algodão e de soja com sintomas de mancha alvo para obtenção de isolados de *Corynespora cassiicola*.....35
- Figura 1.2** – Características morfológicas de isolados *Corynespora cassiicola* aos 12 dias de incubação em meio de cultura Suco V8 Ágar e BDA,  $T^o = 25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 horas, Londrina - PR, 2020. (A) Vista superior da placa em meio Suco V8 Ágar; (B) Vista inferior da placa em meio Suco V8 Ágar; (C) Imagens de microscópio de conídios de *C. cassiicola*; (D) Vista superior da placa em meio BDA; (E) Vista inferior da placa em meio BDA; (F) Imagens de microscópio de conídios de *C. cassiicola*.....39
- Figura 2.1** – Número de lesões 4 cm<sup>-2</sup> (média (soma dos postos)) nos 1<sup>º</sup>, 2<sup>º</sup> e 3<sup>º</sup> trifólios de soja após 12 dias da inoculação com diferentes isolados de *Corynespora cassiicola*, Londrina - PR, 2020.....55
- Figura 2.2** – Número de lesões 4 cm<sup>-2</sup> (média (soma dos postos)) nos 1<sup>º</sup>, 2<sup>º</sup> e 3<sup>º</sup> trifólios de soja após 12 dias da inoculação com diferentes cultivares de soja inoculadas com isolados de *Corynespora cassiicola*, Londrina - PR, 2020.....57
- Figura 2.3** – Períodos de incubação nos 1<sup>º</sup>, 2<sup>º</sup> trifólios de soja após 12 dias da inoculação com diferentes isolados de *Corynespora cassiicola*, sob condições de câmara climatizada (temperatura de 26  $\pm$  1 °C, umidade relativa de 80  $\pm$  10% e fotoperíodo de 12 horas, claro/escuro) .....58
- Figura 3.1** – Classificações de sintomas presentes em folíolos de cultivares de soja inoculadas com *Corynespora cassiicola*; (a) 1= pequenas manchas necróticas (0,74 mm) com halos cloróticos pouco evidentes; (b) 2= pequenas manchas necróticas (1,80 mm) com halos cloróticos evidentes; (c) 3= pequenas manchas

necróticas (2,35 mm) com grandes halos cloróticos; (d) 4= grandes manchas necróticas (6,30 mm) com halos cloróticos evidentes; (e) 5= grandes manchas necróticas (9,30 mm) com grandes halos cloróticos (Figura 3.1). Experimento realizado sob condições controladas de câmara climatizada, ( $T= 25 \pm 2 ^\circ\text{C}$ ; U.R.%= 85 a 90; Fotoperíodo 12/12), Londrina - PR, 2020.....70

**Figura 3.2** – Frequência relativa de notas 1 a 5 correspondentes aos sintomas de mancha alvo em trifólios de soja, após 12 dias da inoculação com diferentes isolados de *Corynespora cassiicola*, Londrina - PR, 2020.  $\Sigma$ : somatório de trifólios com notas iguais ou acima de 3.....71

**Figura 3.3** – Frequência relativa de notas (1 a 5) correspondentes aos sintomas de mancha alvo em trifólios de soja, após 12 dias da inoculação com diferentes cultivares de soja, Londrina - PR, 2020.  $\Sigma$ : somatório de trifólios com notas iguais ou acima de 3.....72

**Figura 3.4** – Frequência relativa de notas (1 a 5) correspondentes aos sintomas de mancha alvo em trifólios de soja, após 12 dias da inoculação com diferentes isolados de *Corynespora cassiicola*, Londrina - PR, 2020.  $\Sigma$ : somatório de trifólios com notas iguais ou acima de 3.....73

**Figura 3.5** – Sintomas de mancha alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* em plantas de soja, sob condições de câmara climatizada, Londrina, 2020. Folhas unifolioladas com lesões de mancha alvo (a), lesões escuras e deprimidas no pecíolo (b) e haste (c), cotilédones com presença de micélio fúngico (d), conídios obtidos de cotilédones com esporulação observados em lâminas sobre microscópio óptico (e) e planta com sintomas da doença (f).....74

**Figura 3.6** – Frequência de tecidos vegetais de cultivares de soja com lesões ocasionados por diferentes isolados de *C. cassiicola*, após 12 dias de inoculação, Londrina, PR, 2020.....76

**Figura 3.7** – Frequência de pecíolos com lesões ocasionados por *C. cassiicola* em relação a posição do trifólios na planta de soja, após 12 dias de inoculação. Londrina - PR, 2020. ....77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> – Código, ano e local de coleta e espécie hospedeira dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> utilizados em análises culturais e morfológicas.....	36
<b>Tabela 1.2</b> – Aspectos culturais e morfológicos da colônia, taxa de crescimento, produção de esporos, comprimento, largura e número de septos dos conídios de oito isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> obtidos de algodão e de soja em meios de cultura BDA e Suco V8 Ágar (V8) após 12 dias de incubação a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12/12 h, Londrina - PR, 2020.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DAI	Dias após a inoculação
ISO	Isolado
PI	Período de Incubação
PL	Período Latente
V8	Suco V8 Ágar

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é uma potência agrícola, destacando-se na produção de grãos, carnes e biocombustíveis, entre outros. A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) representa a principal oleaginosa anual produzida e consumida no mundo e é o principal produto do agronegócio brasileiro (TECNOLOGIAS, 2020).

Na safra 2020/21 a estimativa de produção de soja no Brasil é de aproximadamente de 133,7 milhões de toneladas em uma área de 38,2 milhões de hectares sendo atualmente o maior produtor mundial de soja (CONAB, 2021).

A soja desempenha papel fundamental nas relações econômicas brasileiras. No entanto, as doenças impedem que a cultura atinja todo o seu potencial de produção. Existem cerca de 40 doenças que afetam a commodity, dentre elas a mancha alvo, doença que ocorre em caráter epidêmico. O aumento da incidência da doença na cultura da soja nas últimas safras no cenário agrícola nacional, Isto tem sido favorecido pelo aumento da semeadura de cultivares suscetíveis, à utilização de culturas hospedeiras em sucessão e à resistência do fungo aos fungicidas (GODOY et al., 2016; 2017; 2019; 2020).

A mancha alvo da soja é causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A.Curtis) C.T. Wei. Foi relatado primeiramente no Brasil em 1974 no estado do Paraná, e logo após no estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 1976a). No ano de 1988 a mancha alvo foi identificada nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (YORINORI, 1989; MEHTA et al., 2005). Na década de 90, ocorreu o relato da doença no cerrado brasileiro. Posteriormente passou a ser encontrada em praticamente todas as regiões de cultivo do Brasil (GODOY et al., 2013; 2020).

Os sintomas da doença podem ser observados em folhas, caules, vagens e sementes (SINCLAIR, BACKMAN et al., 1989; RIBEIRO et al., 2017). O fungo sobrevive em restos culturais e infecta mais de 530 espécies de plantas de interesse agronômico (FARR; ROSSMAN, 2019), entre elas importantes culturas como o algodão, mamão, seringueira, soja, tomate, feijão, crotalária e diversas plantas daninhas, como trapoeraba (*Commelina bengalensis* L.), latana (BARRETO et al., 1995; PEREIRA et al., 2003; PASSOS et al., 2010) e assa-peixe (CUTRIM; SILVA, 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Além da ampla gama de hospedeiros, o fungo sobrevive em plantas voluntárias, sementes infectadas, restos de cultura e em estruturas de sobrevivência conhecidas como clámidósporos (OLIVEIRA et al., 2012).

Epidemias causadas por *C. cassiicola* tornaram-se severas onde as

culturas de soja e algodão são cultivadas em rotação (GALBIERI et al., 2014). Atualmente, a mancha alvo tornou-se uma doença que ocorre na cultura do algodão. Foi relatada no algodão primeiramente nos Estados Unidos em 2012 causando desfolha de aproximadamente 70% (FREIRE, 2017). Epidemias severas tem sido registrado nos maiores produtores mundiais da soja (EUA, Brasil e Argentina), devido a rotação de soja e algodão, acarretando em crescente incidência da mancha alvo nas últimas safras (SUMABAT et al., 2018; GODOY et al., 2020).

A disseminação do fungo ocorre principalmente pelo vento e por gotas de chuva (ALMEIDA et al., 2005). Os primeiros sintomas da mancha alvo em soja aparecem entre 5 e 7 dias após a penetração do fungo, com prolongado molhamento foliar e temperaturas de 20 a 30 °C (AGRIOS, 1988). *C. cassiicola* produz esporos nas duas faces da folha de soja, sendo mais abundantes na face adaxial (ALMEIDA et al., 2005). O fungo produz conidiofóros eretos, ramificados e conídios com dimensão de 4-11 x 44-135 µm (SNOW; BERGGREN, 1989). O patógeno tem crescimento rápido e esporula em meios de cultura como Batata dextrose ágar (BDA), Suco V8 Ágar e Czapec, em temperatura ótima de 28 °C (SINCLAIR; BACKMAN, 1989).

Entre as estratégias de manejo da doença são recomendadas: uso de cultivares resistentes, tratamento de sementes, rotação/sucessão de culturas não hospedeiras e pulverizações com fungicidas (GODOY et al., 2016).

Apesar de testes de inoculações cruzadas mostrarem que isolados de *C. cassiicola* são mais agressivos quando inoculados no hospedeiro de origem, evidenciando especialização patogênica, os isolados obtidos de soja e de algodão no Brasil são semelhantes e infectam as duas culturas (CUTRIM, 2003; GALBIERI et al., 2014).

Existem variações genéticas entre os isolados fúngicos. Isto pode ser resultado da pressão de seleção, das condições ambientais e de cultivo nas regiões dos quais os isolados são provenientes, refletindo em uma relação patógeno-hospedeiro diferenciada entre isolados fúngicos e cultivares de soja (AGUIAR, 2015).

Por esta razão, é muito importante avaliar constantemente o comportamento dos isolados com base em seu hospedeiro original, visando esclarecer cada vez mais a interação patógeno-hospedeiro entre cultivares de soja e isolados de *C. cassiicola*. Assim, poderá haver direcionamento de estudos que permitam a adoção de táticas de manejo mais eficientes e a obtenção de cultivares resistentes.

As condições necessárias para o estabelecimento de uma doença são a presença de hospedeiro suscetível, de patógeno virulento e ambiente favorável para a

infecção, colonização e reprodução do fitopatógeno (AGRIOS, 2005). A junção desses três fatores forma o triângulo da doença, onde a interação desses fatores resulta no desenvolvimento da doença (BEDENDO; AMORIM, 2011).

O fator mais relevante da interação patógeno-hospedeiro é o ambiente, visto que mesmo na presença de um patógeno virulento e um hospedeiro suscetível, é capaz de evitar o surgimento de epidemias (CAMPBELL; MADENN, 1990). O conhecimento do triângulo da doença tem permitido a adoção de medidas de controle visando reduzir as perdas causadas por uma epidemia.

A epidemia é formada por uma série de processos biológicos, processos envolvem taxas de mudança e o tempo (TIVOLI et al. 2012). A inclusão do fator tempo no ciclo de infecção, permite a conceituação de diversos períodos de interesse epidemiológico, dentre eles, o período de incubação, o período latente e o período infeccioso (ZADOKS; SCHEIN, 1979).

Devido ao aumento da incidência da mancha alvo no Brasil, principalmente na cultura da soja, este estudo tem por objetivo gerar informações acerca dos parâmetros epidemiológicos de *C. cassiicola* na soja e a diferenciação morfológica entre isolados de *C. cassiicola*.

A dissertação é apresentada na forma de artigos:

**Artigo A** Caracterização morfológica de isolados de *Corynespora cassiicola* em dois meios de cultura.

**Artigo B** Influência do número de lesões quanto à posição de trifólios na infecção de *C. cassiicola* em genótipos de soja.

**Artigo C** Incidência e caracterização de lesões de mancha alvo em folhas unifolioladas, pecíolos e haste de plantas de soja.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. HISTÓRICO DA CULTURA DA SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] pertencente à família Fabaceae, tem como centro de origem o continente Asiático (MA, 1984). No Brasil a cultura foi introduzida no estado da Bahia em 1882. No entanto, foi no estado do Rio Grande do Sul que a soja passou a ser cultivada em grande escala (BLACK, 2000). Nas décadas de 60 e 70 a soja chegou ao Brasil, tornando-se a maior cultura em área cultivada a partir da década de 1990 (CÂMARA, 2000).

Atualmente, a expansão do cultivo da soja é ampla no Brasil e em todo o mundo, devido ao fácil manejo, às condições favoráveis e à utilização de novas tecnologias no campo que impulsionam o desenvolvimento da cultura. Possui elevado teor de proteína nos grãos, 40%, sendo fonte nutricional animal e para óleo utilizado na produção de biocombustível e na alimentação humana (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

O Brasil atualmente é o maior produtor de soja, sendo o Mato Grosso o maior estado produtor, seguido do estado do Paraná (CONAB, 2021).

As doenças causadas por fungos apresentam graves implicações para o setor agrícola. Em torno de 40 doenças incidem na cultura da soja (TECNOLOGIAS, 2013). As doenças reemergentes, como a mancha alvo, têm aumentando nas últimas safras devido a vários fatores, como por exemplo, à resistência do fungo aos fungicidas mais comumente utilizados e do aumento da semeadura de cultivares suscetíveis.

A mancha alvo vem sendo encontrada em praticamente todas as regiões de cultivo do Brasil, ocasionando redução de produtividade variando entre 30 e 42 % (KOENNING; CRESWELL, 2006; MOLINA, 2019). O fungo *C. cassiicola* vem aumentado gradativamente a incidência nas lavouras ao longo dos anos, prejudicando outras culturas, como a cultura do algodão. Em algodão tem causado desfolha de aproximadamente 70% (FREIRE, 2017).

### 3 *Corynespora cassiicola* NA SOJA

#### 3.1 HISTÓRICO

No ano de 1900, plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) e soja na China foram infectadas por um fungo que produzia conídios grandes marrons e/ou oliváceos (WEI, 1950). Na década de 1930, o fungo foi identificado como *Cercospora vignicola* Kawamura (TAI, 1936; TENG, 1939). Uma década depois, Liu (1948) identificou um fungo como *Helminthosporium vignae* Olive em feijão caupi no Japão.

O fungo *C. cassiicola* Berk. & M. A. Curtis (WEI, 1950) pertence ao filo *Ascomycota*, classe Dothiomycetes e ordem Pleosporales (ALMEIDA, 1976a). Esta espécie é o agente causal da doença conhecida como mancha alvo, causando perdas em grandes culturas como soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e algodão (*Gossypium hirsutum*), atingindo perdas de 20 a 30% no rendimento da cultura (KREYCI; MENTEM, 2013; VENTURINI, 2014).

É normalmente encontrada próximo aos trópicos, com grande ocorrência nas folhas, raízes e hastes de várias plantas hospedeiras (SHIMOMOTO et al., 2011). Podendo ser capaz de infectar mais de 530 espécies de plantas em até 400 gêneros diferentes (DIXON et al., 2009; FARR; ROSSMAN, 2019).

Na América do Sul, a mancha alvo na soja foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1974, no estado do Paraná, e logo após no estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 1976a). Cerca de dez anos mais tarde, em 1986, foram encontrados sintomas de podridão radicular e manchas foliares no município de Castro, no Paraná. No ano seguinte, a doença foi detectada nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (YORINORI, 1988).

A mancha alvo começou a aumentar sua prevalência e severidade principalmente na segunda metade da fase reprodutiva da cultura da soja, o que levou à doença ser incluída no grupo de doenças de estação tardia (PLOPER, 2011). No entanto, vários relatos consideram a mancha alvo diferente deste complexo de doenças, pois os primeiros sintomas podem ser detectados no estágio de floração, simultaneamente com o fechamento do dossel, quando são observados períodos de alta umidade (TERAMOTO et al., 2013a).

A mancha alvo é encontrada em muitas áreas produtoras de soja do Brasil, sendo uma doença de grande importância na região do cerrado, onde ocorre com maior frequência. A doença é potencialmente destrutiva em cultivares suscetíveis em épocas de elevada precipitação pluvial (PHILLIPS, 1989).

Silva et al. (2002) relatam em 1994, que os danos e perdas causados pela mancha alvo na soja não eram significativos, sendo considerada como uma doença irrelevante até no ano de 2000. Atualmente, a está sendo observada em todas as regiões produtoras de soja do Brasil.

Na cultura da soja, a mancha alvo e a podridão radicular de *Corynespora* são doenças que podem ser atribuídas à mesma espécie, *C. cassiicola*. Estudos de Spencer e Walters (1969), com 14 isolados monoconidiais obtidos nos Estados Unidos, determinaram por meio da inoculação em soja e feijão a existência de duas raças distintas de *C. cassiicola*. Diferenças morfológicas, patogênicas e culturais entre esses isolados sugere a existência de variação em nível de espécie.

### 3.1.1. Danos

Na cultura da soja a mancha alvo vem causando prejuízos econômicos, ocorrendo principalmente no final do ciclo da cultura. A doença atualmente é potencialmente destrutiva em cultivares suscetíveis e em épocas de elevada precipitação pluviométrica (PHILLIPS, 1989).

Os sintomas da doença na soja são caracterizados pelas lesões com anéis concêntricos de coloração escura nas folhas, que reduzem a área foliar sadia, interferindo diretamente no processo de fotossíntese e consequentemente diminuindo a produção de grãos (GODOY et al., 2016a; BEDENDO, 1995a). Em cultivares suscetíveis pode ocorrer desfolha prematura das folhas, assim como o apodrecimento das vagens e lesões em hastes.

Estudos com a mancha alvo na cultura da soja no Mississipi nos EUA, revelaram que os danos causados variaram de 18 a 32% (HARTWIG, 1959). Na safra de 2004, foram estimados danos de 20% a 40% nos EUA (KOENNING; CRESWELL, 2006).

No Brasil, na safra de 1995/96, foi verificada a ocorrência da mancha alvo causando desfolha prematura e danos entre 40 e 45% no estado do Paraná (YORINORI, 1996).

### 3.1.2. Etiologia

O fungo *Corynespora cassiicola* é um patógeno hemibiotrófico, pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Dothideomycetes, subclasse Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales, família Corynesporascaceae, (AGRIOS, 2005). *C. cassiicola* é um fungo cosmopolita e inespecífico.

O patógeno quando cultivado em meio de cultura apresenta micélio floculento de coloração branca, tornando-se mais tarde cinza escuro. Possui frutificação sem formação de estroma (ELLIS, 1971b; SNOW; BERGGREN JÚNIOR, 1989). Os conidióforos emergem das lesões, isoladamente ou em pequenos grupos, tendo os conídios inseridos no ápice, isoladamente ou em pequenas cadeias (VEIGA, 2008). Os conidióforos são caracterizados por serem eretos ou levemente curvados, medindo entre 44 a 380 µm, ramificados, normalmente de coloração pálida a marrom-claro (ELLIS, 1971b).

Os conídios são pigmentados, multi-septados e podem variar na coloração, desde hialina a marrom-clara (BLAZQUEZ, 1991). Em condições laboratoriais e de casa de vegetação, os conídios são observados em cadeia de dois a seis, sendo retos ou ligeiramente curvados no ápice, cilíndricos e com hilo pronunciado na base (SNOW; BERGGREN, 1989). Os conídios apresentam comprimento médio de 134,7 mm e diâmetro médio de 7,7 mm, com 2 a 28 septos (KOENNING et al., 2006).

A estrutura de resistência de *C. cassiicola* são os clámidósporos. Estes são hialinos, com formato oval e dimensão entre 16 a 30 por 14 a 20 µm, sendo formados em culturas mais velhas (SINCLAIR, 1989).

O patógeno tem como temperatura ótima para o crescimento micelial entre 18 a 21 °C, com mínima que permite o crescimento *in vitro* de 5 a 7 °C e máxima de 34 a 39 °C (SINCLAIR, 1989).

A composição do meio de cultura determina a qualidade e a quantidade do crescimento micelial e da esporulação dos fitopatógenos. Além do meio de cultura, outros fatores essenciais para estimular a esporulação dos patógenos são temperatura e luminosidade (RIBEIRO, 2011). Em relação aos meios de cultura indicados para o cultivo de fungos não há um que seja padrão, ocasionando diversas interpretações em mesmas condições do ambiente, tornando-se necessário a comparação de meios de cultura para o crescimento e formação de esporos (GAVA, 2002).

### 3.2 CICLO DA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NO PATOSSISTEMA *C. cassiicola*-SOJA

#### 3.2.1. Sobrevida

O fungo *C. cassiicola* sobrevive em sementes de soja infectadas e pode se manter no solo em pousio por até dois anos, atuando como fonte primária de inóculo para novas epidemias (ALMEIDA et al., 2001). A longevidade do inóculo de *C. cassiicola* pode variar em função da capacidade de sobrevida dependendo do ambiente e da habilidade competitiva na ausência do hospedeiro (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Nas sementes de soja, o micélio do fungo se mantém viável, por um período de 6 a 7 meses, localizado no embrião, permanecendo inativo até iniciar o processo germinativo (AMORIM, 1995; AVOZANI; FERREIRA, 2012).

A sobrevida de *C. cassiicola* pode ocorrer a partir de plantas voluntárias, sementes, restos culturais e em hospedeiros alternativos (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).

Os clámidósporos são conídios com parede espessa que se originam quando as células das hifas tornam-se arredondadas e se separam. O clámidósporo é uma estrutura especializada de resistência, para sobrevida em condições ambientais adversas, atuando como esporos de repouso (GOULD, 2010). Os conídios são esporos assexuados imóveis, que são dispersos no ar e servem para disseminar o patógeno rapidamente ao longo dos meses de verão (GOULD, 2010).

#### 3.2.2. Hospedeiros

Existe evidências relatando a ampla gama de hospedeiros de *C. cassiicola*, o que levou os patologistas a considerá-lo uma espécie cosmopolita e inespecífica, devido à sua capacidade de infectar diversas espécies (ELLIS, 1971a; PEREIRA et al., 2003).

O fungo pode infectar mais de 530 espécies de plantas de 400 gêneros, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas (SMITH et al., 2008; FARR; ROSSMAN, 2018; FARR; ROSSMAN, 2019). Em alguns hospedeiros, também é relatado que *C. cassiicola* cresce como um endófito ou saprófito inespecífico (GOND et al., 2007; PROMPUTTHA et al., 2007).

Além da soja (*Glycine max* L. Merril), o fungo infecta outras espécies de culturas de grande valor econômico, nesta lista estão incluídas: acerola (SILVA;

RODRIGUES; SOARES JÚNIOR, 1997), algodão (FULMER et al., 2012), alface (SANTOS et al., 2007), feijão (MENDES et al., 1998), mamão (YAN-XIANG et al., 2011), pepino (CUTRIM; SILVA, 2003), pimentão (SHIMOMOTO et al., 2008), seringueira (YAN-XIANG et al., 2011), e tomate (LOPES; ÁVILA, 2005). Algumas espécies de plantas daninhas também podem ser infectadas, como assa-peixe (*Vernonia polyanthes*), lantana (BARRETO et al., 1995) e trapoeraba (*Commelina bengalensis* L.) (CUTRIM; SILVA, 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

### 3.2.3. Disseminação

A disseminação de *C. cassiicola* pode ocorrer via sementes infestadas ou infectadas, implementos agrícolas contendo restos de culturas e pelo vento (CAMPOS et al., 2005). O principal meio de disseminação dentro e entre lavouras ocorre principalmente pela ação do vento, responsável pela remoção e transporte de conídios, dificultando o seu manejo (FREIRE, 2017). A liberação de conídios do fungo ocorre de forma passiva (MESQUINI, 2012). Maude (1996) denominou esses propágulos como "esporos secos".

Os conídios ou esporos secos, são disseminados pelo vento infectando novos tecidos, determinando os ciclos secundários da doença que vão caracterizar o caráter epidêmico da mancha alvo (ALMEIDA et al., 2005). Segundo Pernezny e Simone (1993) a liberação de conídios está mais concentrada no período da manhã. A remoção e a dispersão dos conídios deste patógeno são favorecidas pelo tempo seco (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010).

A disseminação a longas distâncias mais eficiente é por sementes, as plântulas oriundas desta semente contaminada contribui para o aumento de inóculo na área, devido à presença de conídios em cotilédones e hipocótilo provenientes de lesões primárias (CAMPOS et al., 2008).

### 3.2.4. Infecção

A infecção, processo que compreende o início da germinação é favorecida por prolongado período de molhamento foliar com temperaturas de 22 °C a 30 °C (AMORIM; PASCHOLATI, 2011; SINCLAIR, 1982).

Após a deposição dos conídios na superfície do hospedeiro, ocorre a fixação por meio dos apressórios que emitem o tubo germinativo para dar início a

penetração, processo que ocorre de forma direta através da superfície da epiderme (AGRIOS, 1988; AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

A temperatura ótima para a germinação de conídios de *C. cassiicola* é de 23 °C, com limiar térmico inferior de 7 °C e o superior de 39 °C (MULITERNO de MELO, 2009). A umidade relativa do ar igual ou superior a 80% favorece o desenvolvimento da doença, e o déficit hídrico inibe o crescimento do fungo (SNOW; BERGGREN, 1989; FUNDACRUZ, 2006).

Condições de precipitações pluviais no ciclo da cultura da soja, acima de 800 mm, resultam no aumento da severidade da mancha alvo (FUNDACRUZ, 2006). May de Mio et al., (2002), relataram que molhamento foliar contínuo, além da temperatura, é importante para o desenvolvimento de epidemias da doença.

### 3.2.5. Colonização

A colonização, fase parasítica, é caracterizada pela retirada de nutrientes da planta. *C. cassiicola* é um fungo parasita necrotrófico, processo que ocorre com a morte das células da planta antes mesmo de invadi-las (LAMOTTE et al., 2007).

O desenvolvimento e a invasão dos tecidos do hospedeiro, ocorre pela produção da toxina cassiicolin que é liberada nas células degradando os tecidos adjacentes ao local da infecção, extraíndo os nutrientes das células mortas do hospedeiro (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).

Após a penetração do fungo, os primeiros sintomas aparecem entre 5 a 7 dias, quando as plantas são submetidas a temperatura de 20 a 32°C e umidade relativa do ar acima de 80% (AGRIOS, 1988). A produção de conídios do patógeno pode ser observada nas duas faces das folhas, mas são mais predominantes na face adaxial (ALMEIDA et al., 2005).

## 3.3 SINTOMATOLOGIA

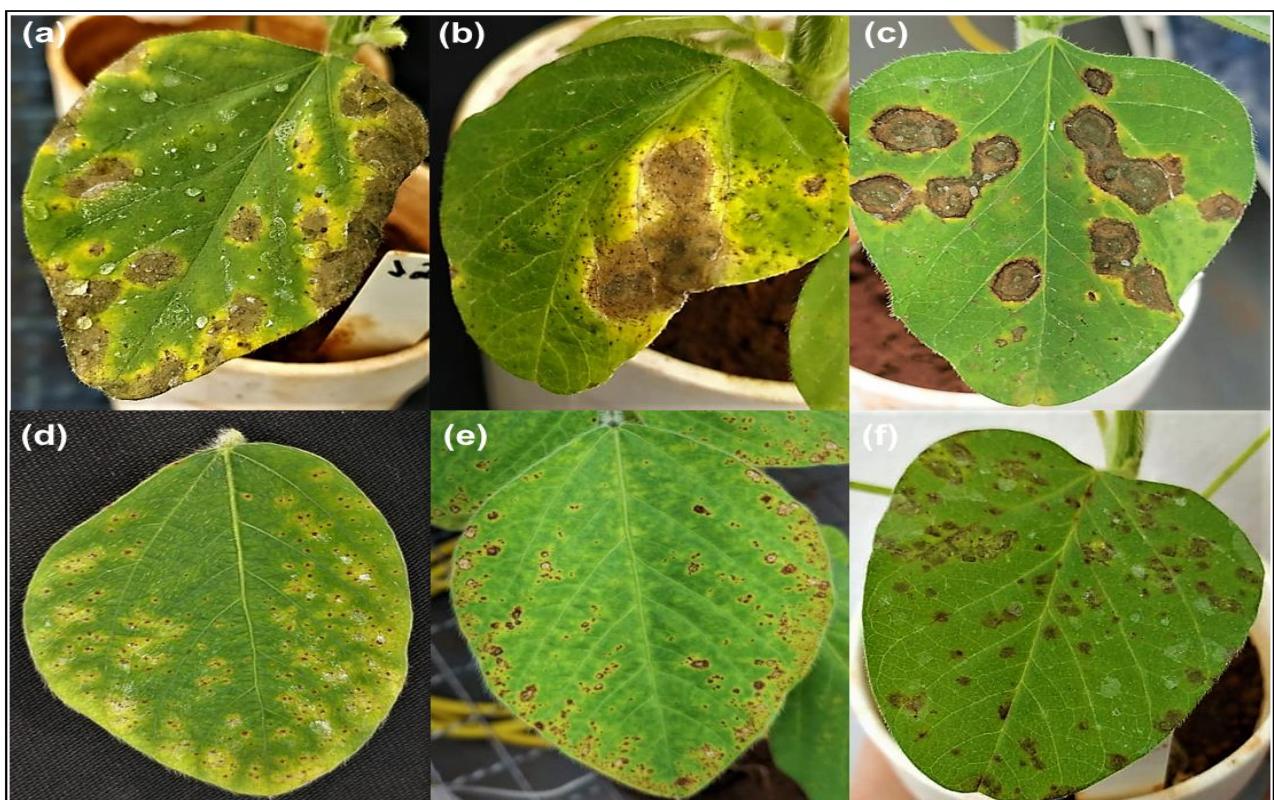
Os sintomas típicos causados por *C. cassiicola* na soja são observados nas folhas. As lesões iniciam por pontuações pardas, com halo amarelo, e evoluem para manchas circulares necróticas de até 2 centímetros de diâmetro circundadas por halo clorótico de coloração castanho-clara a castanho-escura (SNOW; BERGGREN, 1989).

O nome da doença se deve aos anéis concêntricos, mais escuros no centro

e halos amarelos presentes nas manchas, que lembram o formato de um alvo (ALMEIDA et al., 2005).

Os sintomas observados em casa de vegetação e câmaras climatizadas da doença são: ponto de infecção escuro cercado por pequenos ou grandes halos cloróticos (Figura 1 a; 1b e 1c); mancha necrótica sem halo clorótico (Figura 1d); e manchas marrom-avermelhadas (Figura 1e).

**Figura 1** - Sintomas foliares de mancha alvo, em ambiente climatizado, 14 dias após a inoculação dos conídios por pulverização em tecido foliar de soja. (a) Manchas com tecido necrosado e halo clorótico típicas de mancha alvo em folhas de soja; (b) Manchas com tecido necrosado com expansão da lesão; (c) Manchas com centro preto de infecção cercado por anéis concêntricos de tecido necrosado; (d) Manchas com centro preto de infecção com grades halos cloróticos; (e) Manchas necróticas sem halo; (f) Manchas castanho-avermelhado sem expansão da lesão.



Fonte: A própria autora

Os sintomas são menos severos em temperaturas entre 20 e 30 °C, sendo observado principalmente no fechamento do dossel e entrelinhas da cultura (MELO; REIS

2010). Sob condições de temperaturas abaixo das citadas acima não são observados sintomas da doença (SINCLAIR, 1989; TERAMOTO et al., 2013b).

Após infectar a planta hospedeira, o patógeno pode liberar "cassiicolin", uma toxina que mata tecidos adjacentes ao local da infecção. Várias espécies de plantas, incluindo a soja, apresentam sintomas semelhantes quando são realizadas inoculações de conídios ou injetando a toxina purificada (BARTHE et al., 2007). Os sintomas podem variar em função dos diferentes níveis de resistência das cultivares de soja e do isolado de *C. cassiicola* (DIXON et al., 2009).

### 3.4 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

Para controle de mancha alvo na cultura da soja são recomendada a adoção de um conjunto de medidas, como o uso de cultivares resistentes, produção de sementes sadias, tratamento de sementes com fungicidas, rotação de culturas e pulverizações com fungicidas sistêmicos (ALMEIDA et al., 2005; GODOY et al., 2016b).

Segundo Avozani (2011), para um manejo eficiente da mancha alvo, deve-se incluir a redução do inóculo primário pelo uso de sementes sadias, porém estudos de avaliação da eficácia do fungicida no controle da mancha alvo nas sementes são escassos. O controle de baixa eficiência do carbendazim tem sido relatado (XAVIER et al., 2013), portanto o uso deste princípio ativo pode estar comprometido para o tratamento de sementes no controle de *C. cassiicola*.

A eficiência da rotação de culturas é um ponto controverso. Enquanto Almeida et al. (2001) sugeriram a adoção de monocotiledôneas para reduzir o inóculo primário de *C. cassiicola*, a atividade saprofítica não específica do patógeno pode reduzir a eficiência deste manejo. O plantio de algodão após a soja deve ser evitado, uma vez que ambos são hospedeiros de *C. cassiicola* (MOLINA et al., 2018).

A seleção de cultivares com base na resistência à *C. cassiicola* deve ser uma medida prioritária para o manejo integrado da doença. Silva et al. (2008) relataram que o aumento da intensidade da mancha alvo no Brasil pode ser devido à fatores relacionados ao melhoramento genético no desenvolvimento de novas cultivares. Geralmente tem se buscado resistência à nematoides, resultando em cultivares de soja com maior suscetibilidade à *C. cassiicola*.

Nas sementes de soja, o controle de *C. cassiicola* é realizado por tratamento químico de sementes, que visa a erradicação do patógeno (XAVIER et al., 2013). Para o

controle químico no tratamento das sementes de soja, são recomendadas diversas misturas: tiabendazole (10% P) 170g + tiram (70%P) 105g/ 100Kg de semente; ou carbendazim (150 g/L) + thiram (350 g/L) SC 200mL/ 100Kg de sementes (REIS; REIS, 2007). Nas últimas safras, vem aumentando os relatos de menor eficiência no controle de mancha alvo por carbendazim (XAVIER et al., 2013).

O manejo da mancha alvo, considerada doença de final de ciclo na cultura da soja, é realizado através de aplicação de fungicidas (GODOY; CANTERI, 2004). O uso de fungicidas químicos é recomendado quando cultivares suscetíveis atingirem severidade entre 10% e 15%, com redução da produtividade de grãos superior a 12% (MEYER et al., 2013).

Os fungicidas são avaliados em ensaios em rede que visa a avaliação da eficiência de controle no alvo-biológico em diferentes regiões do Brasil para a safra 2019/20 (GODOY et al., 2019). A menor sensibilidade de *C. cassiicola* a fungicidas foi observada para carbendazim (benzimidazol) (MBC), com eficiência de apenas 26%, em 20 experimentos instalados de 15 instituições de estudos de várias regiões.

Na safra de 2019/20, as misturas de fluxapiroxade + protioconazol, azoxistrobina + tebuconazol + mancozebe e bixafen + protioconazol + trifloxistrobina obtiveram a maior eficiência no controle de mancha alvo entre os produtos registrados (78% e 76%), seguido de fluindapir + protioconazol (73%). As maiores produtividades na soja, foram observadas para os tratamentos com azoxistrobina + protioconazol + mancozebe (4229 kg ha<sup>-1</sup>), bixafen + protioconazol + trifloxistrobina (4167 kg ha<sup>-1</sup>), fluindapir + protioconazol (4110 kg ha<sup>-1</sup>) e fluxapiroxade + protioconazol (4087 kg ha<sup>-1</sup>) (GODOY et al., 2020).

Estudos com experimentos em rede dos anos anteriores, têm demonstrado que os fungicidas com maior eficiência no controle da mancha alvo, são os que contém protioconazol e fluxapiroxade (MOLINA et al., 2019a).

O uso de fungicidas multissítios (mancozebe) também ajudam no controle da mancha alvo, tendo importância principal em regiões onde tem sido relatada menor sensibilidade de *C. cassiicola* a fungicidas sítio-específicos (GODOY et al., 2020).

Os fungicidas do grupo do carbendazim (Methyl benzimidazole carbamate - MBC), tem apresentado baixa eficiência de controle nos últimos anos (GODOY et. al, 2020). O fato pode estar relacionada com a capacidade de mutação E198A e F200Y no gene da β-tubulina o que confere resistência de *C. cassiicola* (GODOY et al., 2020).

A utilização de fungicidas é uma das ferramentas de controle, no entanto,

relatos de resistência de *C. cassiicola* aos grupos químicos, reforçam a necessidade de adoção de todas as estratégias no manejo da mancha alvo, com utilização de cultivares resistentes/ tolerantes, tratamento de sementes e rotação/diversificação de culturas com milho e outras espécies de gramíneas (GODOY et al., 2020).

### 3.5 PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS

O estudo das doenças em uma determinada população de plantas é conhecido como epidemiologia de doenças de plantas (NUTTER, 2007). A epidemiologia deve ser entendida como a ciência que nos conduz ao controle adequado de doenças de plantas (DE AZEVEDO, 1997).

Além disso, a epidemiologia procura relacionar os fatores básicos do patógeno, hospedeiro, ambiente e aspectos quantitativos da doença, com objetivo de propor soluções que venham diminuir as perdas de produtividade (ISLAM et al., 2017a).

O conceito epidemiológico é mais bem representado pelo tetraedro, onde a base representa a interação patógeno, hospedeiro e ambiente, e o vértice superior o ser humano (ZADOKS; SCHEIN, 1979). O ser humano pode interferir no processo de uma epidemia de maneira direta ou indireta, criando condições favoráveis ou desfavoráveis para que a doença se desenvolva (DE AZEVEDO, 1997). Para que ocorra uma epidemia é necessária uma interação harmônica entre os componentes do tetraedro, em função de patógenos virulentos, hospedeiros suscetíveis e ambientes propícios que coincidam no tempo e no espaço (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996; MADDEN et al., 2007).

A epidemia é formada por uma série de processos biológicos, conhecidos como processos epidemiológicos, estes por sua vez envolvem taxas de mudança ao longo do tempo (TIVOLI et al., 2012). A inclusão do fator tempo no ciclo de infecção permite a conceituação de diversos períodos de interesse epidemiológico, dentre eles, período de incubação, período latente e período infeccioso (ZADOKS; SCHEIN, 1979).

#### 3.5.1. Período de incubação e latente

O intervalo de tempo decorrido entre a deposição do patógeno na superfície do hospedeiro e o aparecimento dos primeiros sintomas é denominado de período de incubação (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

Período latente é o período de tempo decorrido entre a deposição do

patógeno na superfície do hospedeiro e o aparecimento dos primeiros sinais do patógeno, estruturas reprodutivas (BERGAMIN FILHO; KRANZ, 1996). Os conídios são liberados e disseminados por diferentes meios, sendo depositados no local de infecção, constituindo-se no inóculo primário. Sob condições favoráveis durante o ciclo de crescimento da planta, produzirá uma série de ciclos secundários, os quais contribuirão para o aumento rápido da doença (FLOR, 1955).

Em determinados patossistemas, o período de incubação, o tempo entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas, é medido em vez do período latente. Ao medir o período de incubação, assume-se que este e o período latente variam de maneira paralela (SCHAPER, 1951). Diferenças consideráveis entre esses dois períodos podem existir para as cultivares (VAN DER ZAAG, 1959; DEHNE, 1977).

Os valores dos parâmetros para o período de incubação podem ser estimados durante epidemias em curso, embora com algum esforço. Esse monitoramento pode ser feito marcando as folhas, registrando as lesões e capturas de esporos nas folhas próximas e relacionando-os com temperatura, períodos de molhamento foliar, eventos de chuva, etc (KRANZ et al., 1980).

O período latente e o período de incubação estão relacionados com a sensibilidade à temperatura, ao nível de resistência quantitativa do hospedeiro, à idade da planta, à densidade de infecção do inóculo, ao estado nutricional e a outros fatores que afetam a predisposição de plantas hospedeiras (KRANZ et al., 1980).

### 3.5.2. Período infeccioso

Outro processo importante é o período infeccioso, que representa o período de tempo em que uma lesão permanece produzindo estruturas reprodutivas (DE AZEVEDO, 1997). A velocidade de aumento da quantidade de doença em função do tempo é denominada taxa de infecção aparente ( $r$ ), que é calculada pela equação:  $dx/dt = rx$

O período infeccioso começa quando o período latente termina. A duração do período infeccioso também exerce uma grande influência em epidemias (VAN DER PLANK 1963; LUO; ZENG, 1995). Um parâmetro para medição do período infeccioso é a duração em dias ou qualquer outra escala de tempo durante o qual uma lesão individual se mantém infeciosa, produzindo porpágulos do patógeno (ZADOKS, 1971).

Os parâmetros para o inóculo nas lesões são a intensidade e a capacidade da esporulação. A intensidade da esporulação é medida como a quantidade de propágulos/

mm<sup>2</sup>, lesões/ dia, ou como esporos capturados em armadilhas de esporos, número de esporos/ unidade de tempo (KRANZ et al., 1980). A intensidade de esporulação é importante para o manejo da doença, mas de difícil avaliação, pois depende do número médio de lesões presentes em t<sub>i</sub> e da idade média da população de lesões (ZADOKS; SCHEIN, 1979).

Lesões jovens causadas por patógenos fúngicos tendem a esporular mais do que as mais antigas. Com o aumento da idade, a intensidade da esporulação diminui e finalmente cessa (KRANZ et al., 1980). Uma alta proporção de lesões jovens, portanto, produz mais inóculo que pode resultar em desenvolvimento mais rápido de epidemias, ou seja, maior taxa  $\mathbb{R}$  (KRANZ et al., 1980).

### 3.5.3. Estudos com *Corynespora cassiicola* na soja

Seaman et al. (1965) estudaram a patogenicidade de *C. cassiicola* em soja com diferentes temperaturas. Observaram sintomas menos severos com temperaturas entre 20 a 25 °C nas plantas, e *in vitro* crescimento ótimo dos isolados ocorreu a 20 °C.

Estudos *in vitro* realizados por Melo (2010) utilizando diferentes meios de cultura na presença e ausência de luz, visando o crescimento micelial de isolados de *C. cassiicola* de soja, revelaram uma maior esporulação do fungo no meio Czapek, com luz e fotoperíodo de 12/12. A mesma autora obteve resultados de temperatura ótima de 23 °C, mínima de 7 °C e máxima de 39 °C para a germinação de conídios.

Mello (2009) ainda estudou o efeito da inoculação em plantas de soja com diferentes concentrações de inóculo de *C. cassiicola*. A concentração de  $35 \times 10^3$  conídios mL<sup>-1</sup> causou uma intensidade satisfatória de mancha alvo, podendo ser utilizada em ensaios de quantificação. A cultivar BMX Potência RR apresentou alto nível de suscetibilidade e maior número e diâmetro de lesões.

Avozani (2011) estudou a agressividade de isolados de *C. cassiicola* e observou que as condições ideais para o desenvolvimento da doença em condições de casa de vegetação foram obtidas quando se adotou um conjunto de medidas: cultivar suscetível, temperatura de 21 a 25 °C, fotoperíodo de 12/12 horas, inoculação por aspersão, densidade de  $5 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup> e umidade de 80 a 95% por 48 horas com molhamento por aspersão após o aparecimento dos primeiros sintomas.

## 4 ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE OITO ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* EM DOIS MEIOS DE CULTURA

### 4.1 RESUMO

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, é encontrado em todas as regiões produtoras de soja do Brasil. O fungo é responsável por danos econômicos em mais de 400 gêneros de diversas espécies de plantas em países de clima tropical e subtropical. Este estudo objetivou avaliar aspectos culturais e morfológicos de oito isolados de *C. cassiicola*, provenientes de diferentes regiões brasileiras, em dois meios de cultura. O experimento foi conduzido no laboratório de Patologia de Sementes do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR-EMATER, Londrina-PR, em condições de câmara de crescimento. Amostras foliares de algodão e soja com sintomas típicos da doença foram coletadas em três Estados produtores de soja do Brasil e armazenados em coleção. Os isolados foram repicados para o centro de placas de Petri contendo os meios BDA e Suco V8 Ágar. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 8 (meios de cultura x isolados) com cinco repetições. Foram avaliadas a coloração, aspecto e taxa do crescimento micelial. Além disso, determinou-se a produção, dimensões e número de septos dos conídios. A comparação das variáveis entre os meios de cultura e isolados de *C. cassiicola* foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis ou Tukey a 5% de probabilidade. As colorações miceliais dos isolados foram predominantemente cinza escuro e marrom claro, na parte superior e inferior das placas, respectivamente. Independente do meio de cultura, o aspecto micelial dos isolados oriundos de algodão foi plano, enquanto que, para isolados provenientes de soja o aspecto micelial foi aéreo cotonoso. O meio Suco V8 Ágar proporcionou a maior taxa de crescimento micelial (8,40 a 8,82 mm d<sup>-1</sup>) para todos os isolados de *C. cassiicola*. Em meio BDA, a produção de conídios foi maior em isolados oriundos de algodão (88,50 a 90,63 conídios mL<sup>-1</sup>) em relação aos isolados de soja (19,13 a 43,13 conídios mL<sup>-1</sup>). Houve grande variação na produção de conídios em meio Suco V8 Ágar, não existindo relação com a planta hospedeira de origem dos isolados. O comprimento e largura dos conídios variaram dependendo do isolado e do meio de cultura em que foi cultivado. Os isolados de *C. cassiicola* de algodão, quando cultivados em meio BDA apresentam maior número de septos nos conídios. Os dados demonstraram que os aspectos morfológicos de *C. cassiicola* podem sofrer variações em função do hospedeiro em que o patógeno é isolado e do meio de cultura em que é cultivado.

**Palavras-chaves:** Mancha alvo, crescimento micelial, produção de conídios, meio Suco V8 Ágar, meio BDA.

## 4.2 ABSTRACT

The fungus *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, is found in all soybean producing regions of Brazil. The fungus is responsible for economic damages in more than 400 genera of several plant species in countries with tropical and subtropical climates. This study aimed to evaluate cultural and morphological aspects of eight isolates of *C. cassiicola*, from different Brazilian regions, in two culture media. The experiment was conducted in the Seed Pathology Laboratory of the Paraná Rural Development Institute - IAPAR-EMATER, Londrina-PR, under growth chamber conditions. Cotton and soybean leaf samples with typical symptoms of the disease were collected from three soybean producing states in Brazil and stored in a collection. The isolates were repotted to the center of Petri plates containing BDA and Juice V8 Agar media. The experimental design was entirely randomized in a 2 x 8 factorial scheme (culture media x isolates) with five repetitions. Mycelial coloration, appearance and growth rate were evaluated. In addition, the production, dimensions and number of septa of the conidia were determined. The comparison of variables between culture media and *C. cassiicola* isolates was performed by the Kruskal-Wallis or Tukey test at 5% probability. The mycelial colorations of the isolates were predominantly dark gray and light brown at the top and bottom of the plates, respectively. Regardless of the culture medium, the mycelial appearance of the cotton isolates was flat, while for soybean isolates the mycelial appearance was aerial cottony. Juice V8 Agar medium provided the highest mycelial growth rate (8,40 to 8,82 mm d<sup>-1</sup>) for all *C. cassiicola* isolates. On BDA medium, conidia production was higher in isolates from cotton (88,50 to 90,63 conidia mL<sup>-1</sup>) compared to soybean isolates (19,13 to 43,13 conidia mL<sup>-1</sup>). There was great variation in conidia production on Juice V8 Agar medium, with no relationship to the host plant of origin of the isolates. The length and width of conidia varied depending on the isolate and the culture medium in which it was grown. The isolates of *C. cassiicola* from cotton, when grown on BDA medium showed a greater number of septa in the conidia. The data showed that the morphological aspects of *C. cassiicola* may vary depending on the host from which the pathogen is isolated and the culture medium in which it is grown.

**Keywords:** Target spot, mycelial growth, conidia production, juice medium V8 Agar, BDA medium.

### 4.3 INTRODUÇÃO

O fungo *Corynespora cassiicola* Berk. & M. A. Curtis (WEI, 1950), presente em países de clima tropical e subtropical, causa doenças em mais de 530 espécies de plantas pertencentes a 400 gêneros diferentes (FAAR; ROSSMAN, 2019).

O fungo possui uma ampla gama de hospedeiros economicamente importantes, incluindo algodão (FULMER et al., 2012), feijão (MENDES et al., 1998), mamão (YAN-XIANG et al., 2011), pepino (CUTRIM; SILVA, 2003), pimentão (SHIMOMOTO et al., 2008), seringueira (YAN-XIANG et al., 2011), soja (SEAMAN; SHOERMAKER, 1965) e tomate (LOPES; ÁVILA, 2005).

A doença causada pelo fungo *C. cassiicola* na cultura da soja é conhecida como mancha alvo, e afeta folhas, caules, vagens e sementes (ALMEIDA et al, 2005). Nas folhas, as lesões iniciam-se por pontuações pardas com halo amarelo, evoluindo para manchas circulares necróticas castanho-claras a castanho-escuras de até 2 centímetros de diâmetro circundadas por um halo clorótico (SNOW; BERGGREN, 1989). As folhas severamente afetadas caem prematuramente (SINCLAIR, 1989).

O fungo sobrevive em detritos, sementes de soja, campos em pousio por até dois anos. Forma estruturas de sobrevivência chamadas clámidósporos (ALMEIDA et al., 2001; GODOY, 2014) que são estruturas especializadas de resistência em condições ambientais adversas, atuando como esporos de repouso (GOULD, 2010; AMORIM, 1995).

O crescimento de *C. cassiicola* em meio de cultura apresenta micélio de coloração branca, tornando-se mais tarde marrom claro a cinza escuro (SNOW; BERGGREN JÚNIOR, 1989). Os conidióforos originam-se isoladamente ou em pequenos grupos, ramificados, eretos ou ligeiramente curvados, cujo os conídios ocorrem sem formação de estroma (ELLIS, 1971b). Formados isoladamente ou em cadeias, os conídios são cilíndricos a obclavados, retos a ligeiramente curvos, hialinos a marrom ou oliváceos claros, podendo ter de zero a 28 septos, e hilo pronunciado na base (SNOW; BERGGREN, 1989; KOENNING et al. 2006).

Isolados de *C. cassiicola* provenientes da cultura da soja tem como temperatura ótima para o crescimento micelial entre 18 a 21 °C, com mínima que permite o crescimento *in vitro* de 5 a 7 °C e máxima de 34 a 39 °C (SINCLAIR, 1989).

Estudos sobre as características de desenvolvimento e morfologia de isolados de *C. cassiicola* em diferentes meios de cultivo são úteis para definir quais meios de cultura podem favorecer o crescimento e esporulação dos isolados. Na literatura são

reportadas variações morfológicas entre os isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes regiões brasileiras (NGHIA et. al, 2008; QI et. al, 2011; KURRE et. al., 2019).

Além disso, as informações sobre a fisiologia do patógeno e variações entre isolados de diferentes hospedeiros e localidades auxiliam na adoção das estratégias de manejo para controle da doença (DE AZEVEDO, 1997). Isto permite escolher a melhor técnica de multiplicação do patógeno e obter inóculo para a seleção de linhagens de plantas hospedeiras menos suscetíveis à doença para diferentes isolados.

Diante do exposto, este estudo objetivou determinar, nos meios de cultura BDA e Suco V8 Ágar, a capacidade de crescimento micelial e características morfológicas de oito isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes regiões do Brasil.

#### **4.4 MATERIAL E MÉTODOS**

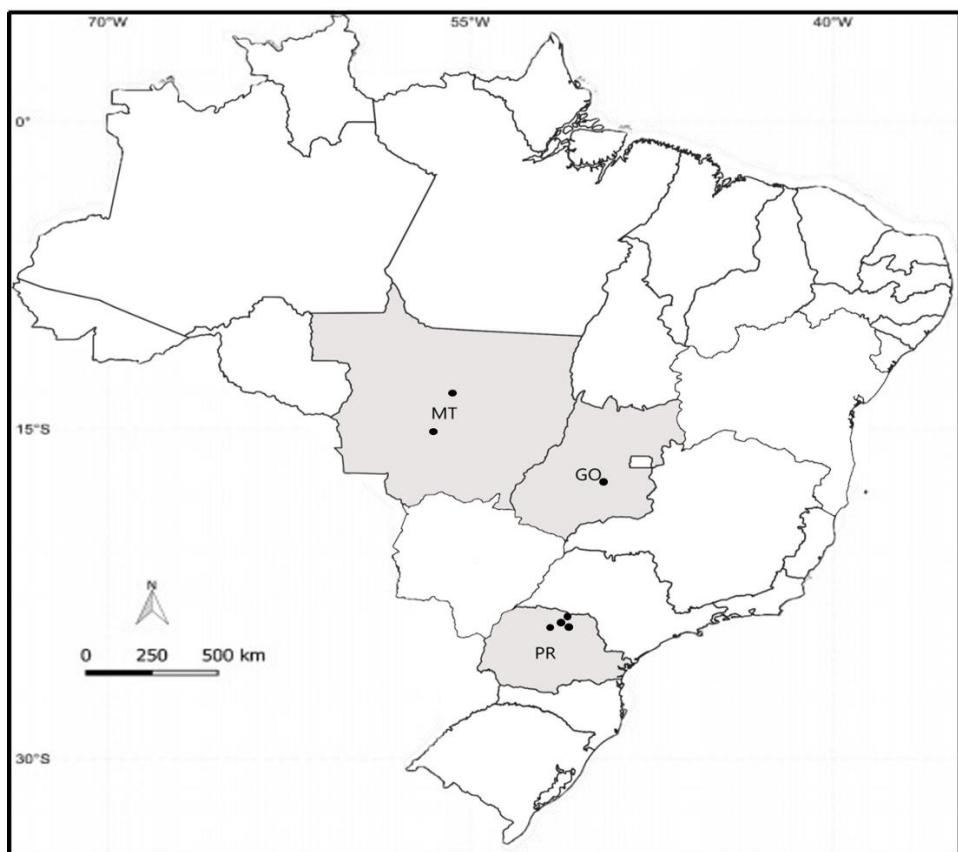
##### **4.4.1 Local de execução**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR-EMATER (IDR-Paraná) e Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina - PR.

##### **4.4.2 Coleta das amostras**

Amostras de folhas de algodão e de soja com sintomas típicos de mancha alvo foram coletadas na safra de 2018/19, em diferentes áreas de cultivo de soja e algodão abrangendo três Estados brasileiros (Figura 1.1). Estas amostras foram encaminhadas ao laboratório de Patologia de Sementes do IDR – Paraná para análise dos sintomas sob microscópio e posterior isolamento do patógeno.

**Figura 1.1** Localidades onde foram realizadas coletas de amostras de folhas de algodão e de soja com sintomas de mancha alvo para obtenção de isolados de *Corynespora cassiicola*.



**Fonte:** A própria autora

#### 4.4.3 Isolamento, purificação, identificação e cultivo do patógeno

Segmentos foliares (3 mm de diâmetro) de algodão e soja contendo lesões, foram submetidos à desinfestação superficial em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2% por 1 minuto, seguido de lavagens em água destilada esterilizada.

Os tecidos foram distribuídos em meio de cultura Suco V8 Ágar e mantidas a  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12/12 h de luz-escuro para isolamento do patógeno. Após quatro dias, observou-se o crescimento micelial do fungo que foi identificado com auxílio da chave do gênero *C. cassiicola* proposta por Ellis (1957).

O micélio de cada isolado foi então sub-cultivado em meio de cultura Suco V8 Ágar, e posteriormente realizado cultivo monospórico em meio Ágar-água (Fernandez, 1993). Cada isolado foi armazenado a  $\pm 4$  °C pelo método Castellani (1939, citado por FIGUEIREDO, 1967).

Foram obtidos oito isolados da espécie *C. cassiicola*, provenientes de plantas de soja (ISO-S) e plantas de algodão (ISO-A), dos Estados do Paraná, Mato Grosso e Goiás (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1** – Código, ano e local de coleta e espécie hospedeira dos isolados de *Corynespora cassiicola* utilizados em análises culturais e morfológicas.

Código	Ano	Local	Espécie Hospedeira
ISO-1 S	2018	Goiânia - GO	
ISO-2 S	2018	Arapongas - PR	
ISO-3 S	2018	Sorriso - MT	<i>Glycine max L.</i>
ISO-4 S	2019	Londrina - PR	
ISO-11 S	2018	Diamantino - MT	
ISO-1 A	2018	Sertanópolis - PR	
ISO-2 A	2019	Jataizinho - PR	<i>Gossypium hirsutum L.</i>
ISO-3 A	2019	Porecatu - PR	

**Fonte:** A própria autora

Discos miceliais de 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias com cinco dias de crescimento e transferidos para o centro de placas de Petri ( $\varnothing = 9$  cm) contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA: 200 g L<sup>-1</sup> extrato de batata, 20 g L<sup>-1</sup> dextrose, 17 g L<sup>-1</sup> ágar) e Suco V8 Ágar (V8: 5 g L<sup>-1</sup> Carbonato de cálcio, 340 mL suco V8, 34 g L<sup>-1</sup> de ágar). As placas foram vedadas, mantidas a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12/12 h de luz-escuro por 72 horas, para dar início às avaliações.

#### 4.4.4 Avaliações

As variáveis avaliadas foram: coloração, aspecto e taxa do crescimento micelial, bem como a produção, comprimento, largura e número de septos dos conídios. As avaliações necessárias para a o cálculo da taxa do crescimento micelial iniciaram aos três dias após a incubação com término aos onze dias após a incubação. As outras avaliações foram realizadas 12 dias após a incubação.

A avaliação da caracterização da cor de colônia foi analisada conforme descrito pelo sistema de anotação de cores de Munsell Color Company (1975). As placas foram analisadas pela tonalidade de pigmentação da colônia na parte superior (frente) e inferior (verso) contendo os meios de cultura BDA e Suco V8 Ágar. Os isolados também foram avaliados quanto ao aspecto do micélio pela atribuição de tipo de micélio, podendo ser: plano, aéreo e aéreo cotonoso (BERGGREN JÚNIOR, 1989).

A taxa diária do crescimento micelial dos isolados foi constituída da medição da colônia em duas direções ortogonais, aos 3, 5, 7, 9 e 11 dias após a incubação.

As medições foram concluídas quando o crescimento da colônia completou a placa de Petri em um dos tratamentos (11 DAI). No entanto, a penúltima data de avaliação (9 DAI) foi utilizada para realizar os cálculos da taxa diária do crescimento, visto que ao atingir a borda da placa, aos 11 DAI, o crescimento micelial pode ter sido limitado interferindo nos resultados. A taxa diária ( $\text{mm d}^{-1}$ ) foi calculada pelo diâmetro médio das duas medidas diametralmente opostas subtraído de  $\varnothing 0,5 \text{ mm}$  (disco inicial), divido por 9 (dias de avaliação).

Para a produção de conídios, em cada placa foram adicionados 10 mL de água destilada e as colônias fúngicas foram raspadas com o auxílio de pincel de cerdas macias. A concentração da suspensão de conídios (conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) foi determinada pela contagem em Câmara de Neubauer sob microscópio com aumento de 100 x. A leitura em Câmara de Neubauer foi realizada cinco vezes para cada repetição, com a quantidade final de conídios definida pela média das contagens em cada repetição.

A largura ( $\mu\text{m}$ ) e o comprimento ( $\mu\text{m}$ ) dos conídios e o número de septos foram determinados pela avaliação de 50 conídios da suspensão fúngica descrita anteriormente. Os conídios foram observados sob microscopia óptica (100 X), fotografados e submetidos ao software de processamento e análise de imagens digitais ImageJ versão 1.32j (Wayne Rasband National Institute of Health, USA) (RASBAND, 2012).

#### 4.4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 8 (dois meios de cultura x os isolados de *C. cassiicola*) com cinco fator. A unidade experimental foi composta por uma placa.

Para as variáveis taxa de crescimento micelial, produção de conídios e quantidade média de septos por conídio, a comparação entre meios de cultura dentro de cada isolado de *C. cassiicola* foi realizada pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney. A comparação dos isolados dentro de cada meio de cultura foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, com significância de 5% utilizando o software BioEstat 5.0.

As variáveis comprimento e largura de conídios foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de significância, com comparação entre meios de cultura e isolados de *C. cassiicola* em esquema fatorial. O software utilizado foi o SISVAR.

## 4.5 RESULTADOS

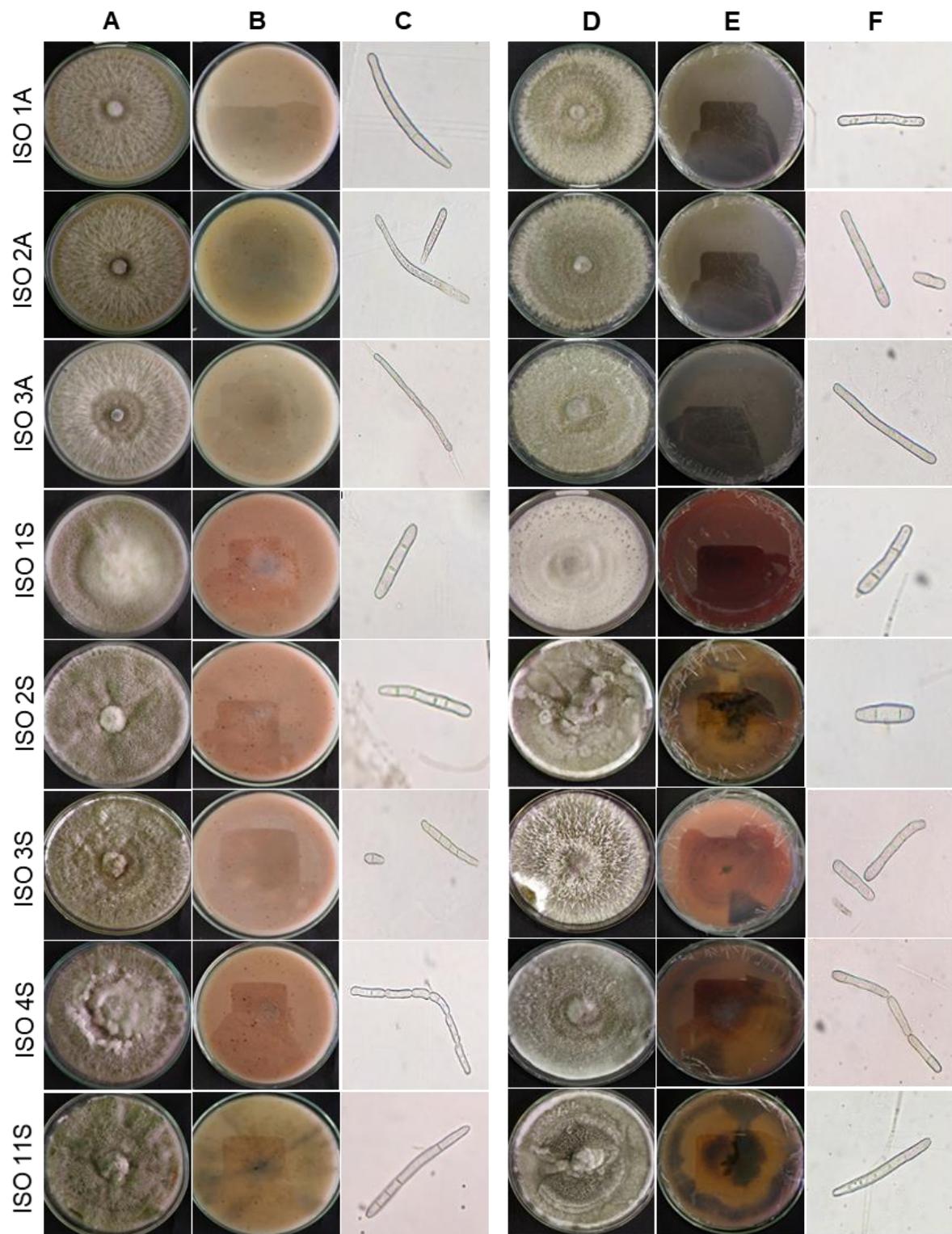
### 4.5.1 Pigmentação e aspecto da colônia

Grande variação foram verificadas quanto à pigmentação dos oito isolados de *C. cassiicola* nos meios de cultura BDA e Suco V8 Ágar (Tabela 1.2 e Figura 1.2). Na parte superior (frente) das placas contendo meio Suco V8 Ágar, a pigmentação micelial dos isolados variou de cinza a oliváceo, enquanto na parte inferior (verso) das placas, houve predominância da tonalidade marrom claro para todos os isolados (Figura 1.2). No meio BDA, a pigmentação micelial variou de cinza a branco na parte superior das placas e de marrom a preto na parte inferior das placas (Figura 1.2).

De modo geral, a coloração micelial dos isolados de *C. cassiicola* foi predominantemente cinza escuro e marrom claro, na parte superior e inferior das placas, respectivamente.

Independente do meio de cultura, o aspecto micelial dos isolados oriundos de algodão foi plano, enquanto que, para isolados provenientes de soja o aspecto micelial foi aéreo cotonoso. A única exceção foi o isolado ISO 1S, que se mostrou plano para ambos os meios em que foi cultivado (Tabela 1.2).

**Figura 1.2** - Características morfológicas de isolados *Corynespora cassiicola* aos 12 dias de incubação em meio de cultura Suco V8 Ágar e BDA,  $T^o = 25 \pm 1^oC$  e fotoperíodo de 12 horas, Londrina - PR, 2020. (A) Vista superior da placa em meio Suco V8 Ágar; (B) Vista inferior da placa em meio Suco V8 Ágar; (C) Imagens de microscópio de conídios de *C. cassiicola*; (D) Vista superior da placa em meio BDA; (E) Vista inferior da placa em meio BDA; (F) Imagens de microscópio de conídios de *C. cassiicola*.



#### 4.5.2 Taxa de crescimento micelial

A taxa de crescimento micelial ( $\text{mm d}^{-1}$ ) variou de 5,40 a 8,82  $\text{mm d}^{-1}$  entre os oito isolados de *C. cassiicola* (Tabela 1.2). A maior taxa de crescimento micelial de

isolados de *C. cassiicola* ocorreu no meio Suco V8 Ágar (8,40 a 8,82 mm d<sup>-1</sup>) quando comparada ao meio BDA (5,40 a 7,30 mm d<sup>-1</sup>).

A taxa de crescimento micelial variou entre isolados de *C. cassiicola* quando cultivados em meio BDA, sendo as maiores taxas de crescimento observadas para os isolados ISO 3A e ISO 1A, 7,30 e 7,14 mm d<sup>-1</sup>, respectivamente. As menores taxas de crescimento ocorreram para os isolados ISO 4S, ISO 11S e ISO 3S, 6,35, 6,00 e 5,40 mm d<sup>-1</sup>, respectivamente. Não houve diferenças significativas em relação a taxa de crescimento micelial para os isolados de *C. cassiicola* cultivados em meio de cultura Suco V8 Ágar (Tabela 1.2).

#### 4.5.3 Produção de conídios

O desempenho na produção de conídios nos diferentes meios de cultura variou de acordo com a origem dos isolados em relação a planta hospedeira (Tabela 1.2). Não houve diferenças na produção de conídios entre os meios de cultura quando os isolados foram provenientes de plantas de algodão (ISO 1A, ISO 2A e ISO 3A). Entretanto, quando os isolados de *C. cassiicola* foram oriundos de plantas de soja, houve maior produção de conídios dos isolados ISO 2S, ISO 4S e ISO 11S no meio Suco V8 Ágar, 64,00; 99,13 e 107,38; respectivamente, em relação ao meio BDA, 23,88; 36,00 e 38,00; respectivamente (Tabela 1.2).

De modo geral, a produção de conídios em meio BDA foi maior em isolados oriundos de algodão, 88,50 a 90,63 conídios mL<sup>-1</sup>, em relação aos isolados de soja, 19,13 a 43,13 conídios mL<sup>-1</sup>. Quando o cultivo dos isolados foi realizado em meio Suco V8 Ágar, a maior produção de conídios foi dos isolados ISO 11S, ISO 4S, ISO 2A e ISO 1A, 107,38 a 85,00 conídios mL<sup>-1</sup>, em relação aos ISO 3S e ISO 1S, 49,38 e 22,88; respectivamente (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2** - Aspectos culturais e morfológicos da colônia, taxa de crescimento, produção de esporos, comprimento, largura e número de septos dos conídios de oito isolados de *Corynespora cassiicola* obtidos de algodão e de soja em meios de cultura BDA e Suco V8 Ágar (V8) após 12 dias de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12/12 h, Londrina - PR, 2020.

Meios de cultura	Hospedeiro	Isolado	Cor da colônia		Aspecto do micélio	Taxa de crescimento (mm/dia)	Produção de conídios $\text{mL}^{-1}$	Conídio		Número de septos		
			Frente	Verso				Comprimento	Largura	Mínimo	Máximo	Média
BDA	<i>Gossypium hirsutum</i>	ISO 1A	Cinza Escuro	Preto	Plano	7,14 B <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	88,50 A ab	52,36 A a	6,88 A b	0	7	2,62 A ab
		ISO 2A	Cinza Escuro	Preto	Plano	7,04 B ab	89,00 A ab	53,43 A a	7,04 A b	0	11	2,52 A ab
		ISO 3A	Cinza Escuro	Preto	Plano	7,30 B a	90,63 A a	47,70 A ab	6,65 A b	0	10	2,14 A ab
	<i>Glycine max</i>	ISO 1S	Branco	Marrom	Plano	6,95 B abc	19,13 A d	49,78 A a	7,32 A ab	0	9	2,60 A a
		ISO 2S	Cinza Escuro	Preto	Aéreo cotonoso	7,01 B abc	24,88 B cd	30,78 A c	8,06 A ab	0	5	1,12 A c
	<i>Glycine max</i>	ISO 3S	Cinza Claro	Marrom Claro	Aéreo cotonoso	5,40 B d	43,13 A bc	31,42 B c	7,05 A ab	0	6	1,26 A c
		ISO 4S	Cinza/Marrom	Marrom Claro	Aéreo cotonoso	6,35 B bcd	36,00 B cd	33,65 A c	6,32 B b	0	3	1,22 B c
		ISO 11S	Cinza Escuro	Marrom Claro	Aéreo cotonoso	6,00 B cd	38,00 B cd	35,19 A bc	6,69 B b	0	7	1,78 A bc
	<i>Gossypium hirsutum</i>	ISO 1A	Cinza Claro	Marrom Claro	Plano	8,40 A <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	85,00 A ab	41,31 B a	6,86 A b	0	8	2,10 A bc
		ISO 2A	Cinza Claro	Marrom Claro	Plano	8,48 A a	89,88 A ab	49,88 A a	7,55 A ab	0	8	3,04 A a
		ISO 3A	Cinza Claro	Marrom Claro	Plano	8,73 A a	75,00 A bc	44,71 A a	6,82 A b	0	7	2,16 A ab
V8	<i>Glycine max</i>	ISO 1S	Cinza	Marrom Claro	Aéreo cotonoso	8,82 A a	22,88 A d	40,05 B a	7,24 A ab	0	4	1,24 B cd
		ISO 2S	Cinza Escuro	Marrom Claro	Aéreo cotonoso	8,67 A a	64,00 A bcd	26,35 A b	6,75 B b	0	4	0,92 A d
	<i>Glycine max</i>	ISO 3S	Oliváceo	Marrom Claro	Aéreo cotonoso	8,40 A a	49,38 A cd	43,92 A a	7,28 A ab	0	10	2,06 A ab
		ISO 4S	Cinza Escuro	Marrom Claro	Aéreo cotonoso	8,47 A a	99,13 A ab	37,89 A ab	7,99 A a	0	9	2,14 A ab
		ISO 11S	Cinza Escuro	Marrom Claro	Aéreo cotonoso	8,52 A a	107,38 A a	38,98 A ab	7,65 A ab	0	7	2,14 A ab

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas letras maiúsculas na coluna comparam meios de cultura dentro de cada isolados de *C. cassiicola*, letras diferentes indicam diferença significativa ( $\alpha=5\%$ ) pelo teste Mann-Whitney.

<sup>2</sup>Médias seguidas de letras minúsculas na coluna comparam isolados de *C. cassiicola* dentro de cada meios de cultura, indicam diferença significativa ( $\alpha=5\%$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis.

#### 4.5.4 Dimensões dos conídios

Nos dois meios de cultura testados, todos os isolados produziram conídios para a determinação do comprimento e largura. Entretanto, houve interação entre meio de cultura e isolado de *C. cassiicola* (Tabela 1.2).

Os isolados ISO 1A com 52,36 µm e ISO 1S com 49,78 µm apresentaram maiores comprimentos de conídios produzidos no meio BDA, do que os produzidos no meio Suco V8 Ágar. O isolado ISO 3S obteve maior comprimento de conídio, 43,92 µm, em meio de cultura Suco V8 Ágar em relação ao meio BDA. Os demais isolados não diferiram entre si (Tabela 1.2).

O maior comprimento de conídios produzidos no meio BDA foi observado para os isolados ISO 3A, ISO 1S, ISO 1A e ISO 2A, variando de 47,70 a 53,43 µm. O menor comprimento foi observado para os isolados ISO 2S, ISO 3S e ISO 4S, com 30,78 a 33,65 µm. O maior comprimento de conídios obtidos de culturas em meio Suco V8 Ágar foi observado para os isolados ISO 1S, ISO 1A, ISO 3S, ISO 3A e ISO 2A, de 40,05 a 49,88 µm, diferindo do isolado ISO 2S, com conídios de 26,35 µm.

Não houve diferenças na largura dos conídios obtidos de culturas em meio BDA ou Suco V8 Ágar, quando os isolados foram oriundos de algodão (Tabela 1.2). Entretanto, para os isolados provenientes de plantas de soja, o isolado ISO 2S apresentou maior largura de conídios no meio BDA, 8,06 µm, em relação aos produzidos em meio de cultura Suco V8 Ágar, 6,75 µm. O contrário ocorreu quando os isolados ISO 4S e ISO 11S foram cultivados em meio Suco V8 Ágar, 7,99 e 7,65 µm, comparativamente ao meio BDA, 6,32 e 6,69 µm. Os demais isolados não diferiram entre si (Tabela 1.2).

Quando cultivado em meio BDA, a maior largura de conídios foi observada para o isolado ISO 2S com 8,06 µm, diferindo dos isolados ISO 4S, ISO 11S, ISO 3A, ISO 1A e ISO 2A, cujas dimensões variam de 6,32 e 7,04 µm. Em relação ao meio de cultura Suco V8 Ágar, a maior largura de conídio foi observada para o isolado ISO 4S, 7,99 µm, enquanto os isolados ISO 2S, ISO 3A e ISO 1A apresentam as menores larguras variando de 6,75 a 6,86 µm (Tabela 1.2).

#### 4.5.5 Número de septos

De modo geral, para a maioria dos isolados de *C. cassiicola* existe grande variação no número de septos por conídio, independente do meio de cultura em que são

cultivados (Tabela 1.2). Em todos os isolados foram observados a presença de conídios sem septos, enquanto o número máximo de septos variou de 3 para o isolado ISO 4S a 11 no ISO 2A.

Não houve diferenças entre os meios de cultura testados quanto ao número médio de septos por conídio de *C. cassiicola*, quando os isolados foram oriundos de plantas de algodão (Tabela 1.2). Entretanto, diferenças foram observadas para isolados oriundos de plantas de soja. O isolado ISO 1S apresentou maior número médio de septos por conídio quando cultivado em meio BDA, 2,60 septos por conídio, em relação ao meio Suco V8 Ágar, 1,24 septos por conídio. O contrário ocorreu para o isolado ISO 4S, com maior número médio de septos por conídio de culturas em meio Suco V8 Ágar, 2,14 septos por conídio, comparativamente aos produzidos em meio BDA, que foi de 1,22 septos por conídio. Os demais isolados não diferiram entre si quanto ao meio de cultivo e número médio de septos por conídio.

Quando cultivados em meio BDA, o números médio de septos por conídio foi maior nos isolados ISO 3A, ISO 2A, ISO 1S e ISO 1A, variando de 2,14 a 2,62 septos por conídios, diferindo dos isolados ISO 2S, ISO 4S e ISO 3S, com 1,12 a 1,26 septos por conídio. Quando o cultivo foi realizado em meio Suco V8 Ágar, o maior número médio de septos por conídio foi observado para para os isolados ISO 4S, ISO 11S, ISO 3A e ISO 2A, 2,14 a 3,04 septos por conídio, diferindo dos isolados ISO 1S e ISO 2S, 1,24 e 0,92 septos por conídio, respectivamente, que apresentaram os menores números médios de septos por conídio (Tabela 1.2).

## 6.5.6 DISCUSSÃO

Semelhanças foram observadas nas características dos oito isolados de *C. cassiicola* com a descrição de Ellis (1971), indicando que os isolados pertencem à espécie *C. cassiicola*. O estudo das características e variações morfológicas dos fungos desempenha um papel importante na taxonomia, podendo auxiliar na identificação de muitas espécies patogênicas (MUSHRIF et al., 2006).

No presente estudo não houve variação das características de desenvolvimento entre isolados oriundos de algodão, contudo houve grande variação para os isolados provenientes de soja. Isso indica que a extensão da cultura hospedeira de origem do patógeno tem influência sobre suas características de desenvolvimento. Estes

resultados corroboram estudos anteriores, que descreveram variações na coloração, textura e dimensões de conídios entre isolados de *C. cassiicola* oriundos do mesmo ou diferentes hospedeiros e regiões (DARMONO, et al., 1996; SPENCER, et al., 1969).

Assim como no presente estudo, Qi et al. (2011) e Sousa et al. (2014), estudando isolados de *C. cassiicola* oriundos de soja cultivados em meio BDA, também verificaram variações na textura, fina a espessa, e cor da colônia, branco a marrom claro, marrom vermelho, marrom escuro, cinza escuro ou preto.

Provavelmente, a variabilidade entre isolados provenientes de soja seja devida a interação de *C. cassiicola* e soja ser mais antiga do que a interação com plantas de algodão (ALMEIDA et al., 1976a; FULMER et al., 2012). Esse maior tempo de interação, juntamente com a presença de diferentes cultivares de soja nas diversas regiões do Brasil, pode ter resultado em uma maior pressão de seleção para patótipos de *C. cassiicola*.

Entretanto, mais estudos devem ser realizados, utilizando um maior número de isolados oriundos de plantas de algodão e soja, para elucidar esta hipótese. Vale ressaltar, que a variabilidade dos fitopatógenos relacionada com a ocorrência de alguns mecanismos de recombinação genética (Kaufmann; Weidemann *appud* Peres, 2003).

A taxa de crescimento micelial de *C. cassiicola* em outros meios de cultura foi registrada entre 5,7 a 10,0 mm d<sup>-1</sup> para diferentes isolados (OLIVEIRA, 2007; NGHIA et al., 2008). Neste estudo verificou-se menor taxa de crescimento micelial para todos os isolados cultivados em meio BDA, de 5,40 a 7,30 mm d<sup>-1</sup>, quando comparados ao meio Suco V8 Ágar, 8,40 a 8,82 mm d<sup>-1</sup>.

Almeida et al. (1994) e Mulinerno de Melo (2009) também constataram que diferentes isolados de *C. cassiicola* se desenvolvem vagarosamente em meio de cultura BDA, formando micélio de tonalidade escura e de coloração do cinza ao preto oliváceo. Os autores relacionam que o crescimento micelial mais lento está relacionado à fonte de nutrientes ao qual o isolado tem acesso e ao aproveitamento dos nutrientes em cada meio de cultura.

Apesar do meio BDA ser frequentemente utilizado para estudos com diferentes fungos, Diener (1952) alerta que o desenvolvimento de alguns fungos pode ser prejudicado, propondo o uso de um meio de cultura utilizando suco industrializado (Suco V8) composto por oito vegetais, rico em vitaminas A, C e E, fibras e minerais. Este meio de cultura proporcionou maiores taxas de crescimento micelial no presente estudo.

Para o cultivo de fungos *in vitro*, a escolha do meio deve ser baseada em

nutrientes e condições físico-químicas que são indispensáveis para o desenvolvimento do patógeno. Além de temperatura e luminosidade, a composição do meio de cultura determina a qualidade e a quantidade do crescimento micelial (CARNAÚBA, 2007).

Griffin (1993), relatou que cada isolado metaboliza os nutrientes em velocidades diferentes dependendo do meio de cultura, ocasionando a síntese de outras moléculas ou produtos que influenciam o crescimento do fungo no meio. Não existe um meio de cultura ideal que sirva para todos os patógenos, sendo necessária a comparação de meios para o crescimento e formação de esporos para cada patógeno estudado (GAVA, 2002).

Não houve diferenças na produção de conídios entre os meios de cultura, quando os isolados foram provenientes de plantas de algodão. Contudo, quando oriundos de plantas de soja, os isolados com maiores produções de conídios foram obtidos em cultivos com meio Suco V8 Ágar, corroborando os resultados de Almeida et al. (1976b).

A maior produção de esporos em fitopatógenos pode estar relacionada ao meio em que foi cultivado (CARNAÚBA, 2007). Para alguns fungos fitopatogênicos, Diener (1952) recomenda o uso de meio contendo Suco V8 visando maior produção de conídios. O meio é rico em vitaminas e minerais, o que em parte pode justificar os resultados encontrados neste estudo, visto que o meio BDA contém menor concentração de vitaminas e minerais.

O comprimento e largura dos conídios nos diferentes isolados obtidos neste estudo variaram de 26,35 a 53,36  $\mu\text{m}$  e de 6,65 a 8,06  $\mu\text{m}$ , respectivamente. O número de septos variou de 0 a 11 septos por conídio. Estas dimensões e número de septos estão de acordo com os limites inferiores e superiores propostos por Ellis (1971a) para a descrição da espécie.

Qi et al. (2011) também observaram diferença nas dimensões dos conídios de *C. cassiicola*, com comprimento entre 10 e 277  $\mu\text{m}$ , largura entre 1,3 e 17,1  $\mu\text{m}$  e número de septos de 0 a 18 por conídio. Para o mesmo patógeno, Teramoto (2008) obteve dimensões de 46,1 a 110,9  $\mu\text{m}$  para comprimento, de 5,3 a 8,2  $\mu\text{m}$  para largura e o número de septos variou de 1 a 15. Ferreira Filho (2012) em estudos com isolados de soja, observou comprimentos de 20 a 300  $\mu\text{m}$ , com largura em torno de 7 a 15  $\mu\text{m}$  e quantidade de septos variando de 1 a 22. Mulinerno de Melo (2009), verificou que o tamanho dos conídios variou de 8 a 280  $\mu\text{m}$ , com média de 10 a 150  $\mu\text{m}$ .

As dimensões de comprimento e largura, bem como o número de septos dos conídios obtidos neste estudo mostraram, menor variação em relação aos citados na

literatura. Pode-se verificar que há variabilidade quanto aos valores descritos por cada autor, essas diferenças podem estar relacionadas à origem dos isolados, como hospedeiro e localização geográfica, técnica de acondicionamento, umidade do ambiente em que são produzidos e ao meio de cultura (GASPAROTTO; PEREIRA, 2012; SOUSA; BENTES, 2014; DARMONO, et al., 1996; SPENCER, et al., 1969). Souza e Bentes (2014) relatam ainda que em condições naturais com umidade elevada, os conidióforos e conídios são geralmente longos e afiados.

O conhecimento de como a composição química dos meios de cultura influenciam fisiologicamente o patógeno *C. cassiicola*, afetando as características morfológicas, de crescimento e produção de conídios é imprescindível para determinar qual meio de cultura será mais eficiente na multiplicação do patógeno em condições *in vitro* (BOGO et al. 2008).

#### 4.6 CONCLUSÕES

A cor da colônia de *C. cassiicola* é influenciada pelo meio de cultura em que o fungo é cultivado. Para isolados oriundos de plantas de algodão, tonalidades mais claras ocorrem quando cultivados em meio Suco V8 Ágar.

Para os meios de cultura avaliados, o aspecto do micélio é plano em isolados oriundos de plantas de algodão, e tende a ser aéreo cotonoso em isolados provenientes de plantas de soja.

O meio Suco V8 Ágar proporciona maior taxa de crescimento para todos os isolados de *C. cassiicola* avaliados.

Não há diferenças na produção de conídios de *C. cassiicola* em relação ao meio de cultura quando os isolados foram provenientes de plantas de algodão. Por outro lado, a produção de conídios de *C. cassiicola* em isolados oriundos de plantas de soja é equivalente ou maior quando cultivados em meio Suco V8 Ágar.

Os conídios de *C. cassiicola* apresentam grande variabilidade nas características morfológicas em relação aos diferentes isolados e ao meio de cultivo.

## 5 ARTIGO B: INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE LESÕES QUANTO À POSIÇÃO DE TRIFÓLIOS NA INFECÇÃO DE *C. CASSIICOLA* EM GENÓTIPOS DE SOJA

### 7.1 RESUMO

A crescente epidemia de mancha alvo pode limitar a produção de soja. Portanto, o conhecimento de aspectos epidemiológicos é indispensável no manejo da doença. O estudo objetivou determinar a severidade e o período de incubação de isolados de *C. cassiicola* em cultivares de soja, além de verificar a influência da posição dos trifólios quanto a suscetibilidade à mancha alvo. O ensaio foi conduzido no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR - EMATER, Londrina-PR, em condições controladas. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados em arranjo fatorial 8 x 8, com cinco repetições. O primeiro fator refere-se aos seguintes isolados: ISO 1A, ISO 2A, ISO 3A, ISO 1S, ISO 2S, ISO 3S, ISO 4S e ISO 11S. O segundo fator refere-se aos cultivares: BMX Elite IPRO, BMX Força RR, BMX Garra IPRO, BMX Ponta IPRO, BMX Potência RR, BRS 284, NA 5909 RG e SYN 1562 IPRO. Quando as plantas estavam no estádio fenológico V4, foi aplicada a suspensão fúngica de cada isolado (concentração de  $2 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>). Para cada combinação de isolado e cultivar de soja, após 12 dias da inoculação, foram quantificados o número de lesões (severidade da doença) em 4 cm<sup>2</sup> por folíolo nos três trifólios de cada planta. O período de incubação (PI) foi determinado pela seguinte fórmula: PI = (nº de dias para estabilização/ 2) + 1, sendo a estabilização determinada pelo tempo decorrido da inoculação até o momento em que não surgiram nova lesões. Os dados obtidos foram analisados por meio da transformação de classificação alinhada (ART), com médias comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) quando constatadas diferenças significativas. Não foi constatada interação significativa entre isolados *C. cassiicola* e cultivares de soja, para número de lesões por folíolo e período de incubação. O isolado ISO 4S proporcionou o maior número de lesões nos folíolos, resultando em maior severidade da doença nas plantas. As menores quantidades de lesões foram ocasionadas pelos isolados ISO 2A, ISO 2S e ISO 11S. A menor ocorrência de lesões foi verificada nos cultivares BMX Potência RR, BMX Força RR e NA 5909 RG, por outro lado, o maior número de lesões foi observado no cultivar BMX Elite IPRO, indicando maior suscetibilidade deste cultivar à mancha alvo. A quantidade de lesões ocasionadas pelos diferentes isolados de *C. cassiicola* variou conforme a posição nas plantas, sendo maior no trifólio inferior e menor no trifólio superior das plantas. Diferenças do PI entre isolados de *C. cassiicola* foram constatadas nos trifólios inferiores e medianos das plantas, com maior PI verificado para ISO 4S em ambos os trifólios, enquanto o menor PI ocorreu para ISO 1A, ISO 3A, ISO 2A no trifólio inferior e ISO 11S e ISO 1S no trifólio mediano. Para cultivares a diferença no PI ocorreu apenas no trifólio inferior, sendo o maior e menor PI contatados para BMX Elite IPRO e BRS 248, respectivamente. De modo geral, o trifólio superior das plantas proporcionou o menor PI enquanto o trifólio inferior o maior PI. Este estudo demonstrou que a severidade e PI de mancha alvo são influenciados pelos isolados de *C. cassiicola*, cultivares e a posição do trifólio nas plantas de soja.

**Palavras-chave:** *Glycine max*; mancha alvo; posição de trifólio; período de incubação.

## 7.2 ABSTRACT

The growing epidemics of target spot may limit the production of soybean. Epidemiological aspects are of utmost importance for the management of the disease. The study aimed at determine the severity and incubation period of *C. cassiicola* isolates in soybean cultivars, in addition to determine the influence of the position of the trifoli on susceptibility to the target spot. The study was conducted at the Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR-EMATER, Londrina-PR, under controlled conditions. The experimental design used was of randomized blocks with 8 x 8 factor arrangement, and five replications. The first factor refers to the following isolates: ISO 1A, ISO 2A, ISO 3A, ISO 1S, ISO 2S, ISO 3S, ISO 4S and ISO 11S. The second factor refers to cultivars BMX Elite IPRO, BMX Força RR, BMX Garra IPRO, BMX Ponta IPRO, BMX Potência RR, BRS 284, NA 5909 RG and SYN 1562 IPRO. When the plants were in phenological stage V4, the fungal suspension of each isolate was applied (concentration of  $2 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup> coniders). For each combination of isolate and soybean cultivar, after 12 days of inoculation, the number of lesions (severity of the disease) was quantified in 4 cm<sup>2</sup> per folio in the three trifoli of each plant. The incubation period (IP) was determined by the following formula: PI = (number of days for stabilization/ 2) + 1, the stabilization being determined by the time elapsed from inoculation until the moment when no new lesions appeared. The data obtained were analyzed by means of the aligned classification transformation (ART), with means compared by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) when significant differences were found. No significant interaction between *C. cassiicola* isolates and soybean cultivars was found for number of lesions per folio and incubation period. The ISO 4S isolate provided the highest number of foliar lesions, resulting in greater severity of the disease in plants. The smaller amounts of lesions were caused by ISO 2A, ISO 2S and ISO 11S isolates. The lowest occurrence of lesions was verified in the cultivars BMX Potência RR, BMX Força RR and NA 5909 RG, on the other hand, the highest number of lesions was observed in the cultivar BMX Elite IPRO, indicating greater susceptibility of this cultivar to the target spot. The amount of lesions caused by different isolates of *C. cassiicola* varied according to the position in the plants, being higher in the lower trifolium and lower in the upper trifolii of the plants. Differences in PI between isolates of *C. cassiicola* were found in the lower and median plant trifolii, with a higher PI found for ISO 4S in both trifolii, while the lowest PI occurred for ISO 1A, ISO 3A, ISO 2A in the lower trifolii and ISO 11S and ISO 1S in the median trifolii. For cultivars the difference in PI occurred only in the lower trifolii, being the highest and lowest PI contacted for BMX Elite IPRO and BRS 248, respectively. In general, the upper trifolium of plants provided the lowest IP while the lower trifolium provided the highest IP. This study demonstrated that the severity and target spot PI are influenced by *C. cassiicola* isolates, cultivars and the position of the trifolium in soybean plants.

**Keywords:** *Glycine max*; target spot; position of trifolii; incubation period.

### 7.3 INTRODUÇÃO

A mancha alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, foi relatada na cultura da soja (*Glycine max* [L.] Merril) em território brasileiro pela primeira vez no estado do Paraná, e posteriormente no estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 1976a).

Considerada uma doença com menor importância na cultura da soja, a mancha alvo nas últimas décadas ressurgiu como uma doença endêmica devido ao aumento da monocultura, utilização de cultivares suscetíveis e diminuição da sensibilidade do patógeno aos fungicidas (XAVIER et al., 2013; GODOY et al., 2020).

Godoy et al. (2016b) relataram na cultura da soja uma redução na produtividade de até 35% em cultivares suscetíveis a mancha alvo, enquanto Molina et al., (2019b) mencionam perdas de até 40% em produtividade.

Os sintomas foliares da mancha alvo têm início como pequenas pontuações pardas com halo amarelo, evoluindo para grandes manchas circulares, de coloração castanho-claro a escuro, com anéis concêntricos de até 2 cm de diâmetro (SNOW; BERGGREN, 1989; ALMEIDA et al. 2005). Podem se apresentar manchas em maior número, mas pequenas com 1 a 3 mm de diâmetro (GODOY et al., 2020).

De acordo com Almeida et al. (2005), cultivares de soja suscetíveis podem sofrer severa desfolha, com manchas na haste e nas vagens. A infecção ocorre em temperaturas de 20 a 30 °C com umidade relativa de 80% (SINCLAIR, 1989). Em condições de campo, os sintomas da doença são observados no início dos estágios reprodutivos, com o fechamento das entrelinhas (ALMEIDA et al., 2005; TERAMOTO et al., 2013a).

Segundo Mesquini (2012), a severidade de mancha alvo pode afetar até 37% do estrato inferior da planta sem reduzir a produção de uma cultivar suscetível, devido à baixa contribuição deste estrato da planta na formação e enchimento da semente. No entanto, a doença causa redução na produção quando ocorre no estrato médio da planta, devido a esta região ter grande interceptação de luz e maior contribuição na formação e enchimento da semente (SAKAMOTO; SHAW, 1967).

O uso de produtos químicos é a principal forma de controle de doenças foliares (BOLLER; FORCELINI; HOFFMANN, 2007). Em muitos casos é a única medida eficiente e economicamente viável para garantir uma alta produção. Porém, o uso excessivo

ou em doses inadequadas de defensivos pode acarretar, a longo prazo, no surgimento de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas (NEGRI et al., 2012).

Além disso, a aplicação excessiva de produtos químicos nas lavouras pode causar impactos negativos ao ambiente, como poluição de cursos d'água e declínio de polinizadores (LUCHINI; ANDRÉA, 2000), bem como deixar resíduos indesejáveis nos alimentos, seja por deriva ou por não respeitar o período de carência (MOREIRA et al., 2002).

Desta maneira, a busca por formas alternativas de controle a serem integradas ao manejo da doença é desejável. A adoção de estratégias de manejo, como a utilização de cultivares de soja menos suscetíveis ao patógeno pode ser uma alternativa economicamente viável e de menor impacto ambiental (HENNING et al., 2005).

A avaliação do progresso da doença em plantas é fundamental para estimar a importância da doença em diferentes regiões geográficas (THEODORO; MARINGONI, 2006). Parâmetros relacionados à resposta de um hospedeiro à infecção pelo patógeno, severidade e período de incubação podem interferir na taxa de progresso da epidemia (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

O conhecimento dos parâmetros que influenciam no progresso da doença, resultantes da interação entre *C. cassiicola* e cultivares de soja, são fundamentais para identificar a posição do trifólio na planta que tem influência sobre a epidemia e recomendar medidas de manejo.

Existe escassez de estudos que abordam a evolução da doença com diferentes isolados de *C. cassiicola* e cultivares de soja, relacionando com os parâmetros epidemiológicos que determinam a progressão da doença nos campos de cultivo. Assim, este estudo objetivou determinar a severidade de mancha alvo e o período de incubação de isolados de *C. cassiicola* em cultivares de soja, além de verificar a influência da posição dos trifólios quanto à suscetibilidade à mancha alvo.

## 7.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1 Local de execução

O experimento foi realizado sob condições de casa de vegetação e câmara climatizada, no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR-EMATER (IDR-Paraná), Londrina - PR.

#### 7.4.2 Cultivares de soja utilizados

Os cultivares comerciais de soja utilizados neste estudo foram: Brasmax Elite IPRO, Brasmax Força RR, Brasmax Garra IPRO, Brasmax Ponta IPRO, Brasmax Potência RR, BRS 284, Nidera 5909 RG e SYN 1562 IPRO. Estas cultivares foram selecionadas por apresentarem algum nível de suscetibilidade à mancha alvo.

Sementes das cultivares de soja foram distribuídas em vasos de plástico de 1 litro contendo solo peneirado (Latossolo Vermelho distroférrico). Foram adicionados 5 g do adubo químico granulado, formulação 4-30-10 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) em cada vaso. Após a semeadura os vasos foram mantidos em casa de vegetação até o momento da inoculação com os isolados de *Corynespora cassiicola*.

#### 7.4.3 Isolados de *Corynespora cassiicola*

Foram utilizados oito isolados de *C. cassiicola* depositados na coleção do laboratório de Patologia de Sementes do IDR-Paraná. Os isolados foram obtidos de lesões de plantas de algodão (ISO 1 A; ISO 2 A e ISO 3 A) e soja (ISO 1 S; ISO 2 S; ISO 3 S; ISO 4 S; ISO 11 S), coletadas a campo na safra 2018/19. Procedeu-se à purificação dos isolados por cultivo monospórico. Os isolados foram armazenados a 4 °C pelo método de Castellani.

Para a multiplicação de *C. cassiicola*, foi realizado o repique de cada isolado para 50 placas de Petri ( $\varnothing = 9$  cm) contendo meio de cultura Suco V8 Ágar (V8: 5 g L<sup>-1</sup> Carbonato de cálcio, 340 mL suco V8, 34 g L<sup>-1</sup> de ágar) com estreptomicina (0,1%). As placas foram mantidas a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12/12 horas por 10 dias. Após esse período, as colônias de *C. cassiicola* apresentaram abundante esporulação e foram utilizadas como inóculo.

#### 7.4.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados em arranjo fatorial 8 x 8 (isolados de *C. cassiicola* x cultivares de soja), com cinco repetições. Os blocos foram montados ao longo do tempo. A unidade experimental foi constituída de dois vasos contendo uma planta cada.

#### 7.4.5 Condições de inoculação

A inoculação com *C. cassiicola* ocorreu quando os cultivares de soja apresentavam estádio fenológico V4, caracterizado pela terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida (NEUMAIER et al., 2000). Para estimular a abertura dos estômatos das plantas, cada vaso recebeu 1 g (grama) de ureia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), 24 horas antes da inoculação.

Para cada isolado de *C. cassiicola* foi preparada suspensão de conídios na concentração de  $2 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , na qual foi adicionado uma gota por litro de espalhante adesivo Tween 20 e 0,4 gramas de gelatina sem sabor. O objetivo da adição desses adjuvantes foi para melhorar a distribuição da suspensão e adesão do inóculo nos folíolos de soja durante a inoculação. A inoculação ocorreu no período mais fresco do dia, com auxílio de borrifador manual, a aspersão da suspensão de conídios foi realizada sobre as folhas de soja até o ponto de escorrimento.

Para favorecer a infecção do patógeno, após a inoculação, os vasos foram transferidos para câmara climatizada com temperatura de  $26 \pm 1$  °C, umidade relativa de 85 a 90 % e fotoperíodo de 12/12 (claro/escuro), permanecendo nestas condições por um período de 48 horas. Decorrido este período, as plantas foram distribuídas aleatoriamente dentro da câmara climatizada e mantidas nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo, contudo a umidade relativa foi ajustada para  $80 \pm 10\%$  até o término das avaliações aos 20 dias após a inoculação (DAI).

#### 7.4.6 Avaliações

As avaliações foram realizadas nos três folíolos do 1º, 2º e 3º trifólios, totalizando nove folíolos por planta. Todos os folíolos avaliados estavam totalmente expandidos no momento da inoculação. Os 1º, 2º e 3º trifólios referem-se respectivamente ao trifólio localizado na posição inferior, média e superior das plantas de soja no estágio V4.

Para cada combinação isolado x cultivar foram avaliados a severidade (pelo número de lesões presentes em 4 cm<sup>2</sup> nos folíolos) e o período de incubação (dias).

A quantificação do número de lesões no tecido foliar foi determinada pela contagem de lesões presentes dentro de uma área de 4 cm<sup>2</sup>, delimitada por um molde (2 x 2 cm<sup>2</sup>) com auxílio de uma caneta de tinta hidrográfica permanente (0,4 mm) em todos os folíolos. A quantificação das lesões foi realizada a partir do terceiro DAI, durante um período de 12 dias.

Para a determinação do período de incubação foi registrado o tempo decorrido desde a inoculação até o momento que cessou o aparecimento das lesões nos folíolos (estabilização do número de lesões). A partir desta informação foi estimado o período de incubação (PI) pela seguinte equação:

$$PI = (nº \text{ de dias para estabilização} / 2) + 1;$$

Onde,

PI é o período de incubação expresso em dias.

O número de lesões presentes em 4 cm<sup>2</sup> e o período de incubação foram registrados para cada trifólio separadamente. Também foi considerada a planta como um todo, por meio dos valores médios do 1º, 2º e 3º trifólios.

#### 7.4.7 Análises estatísticas

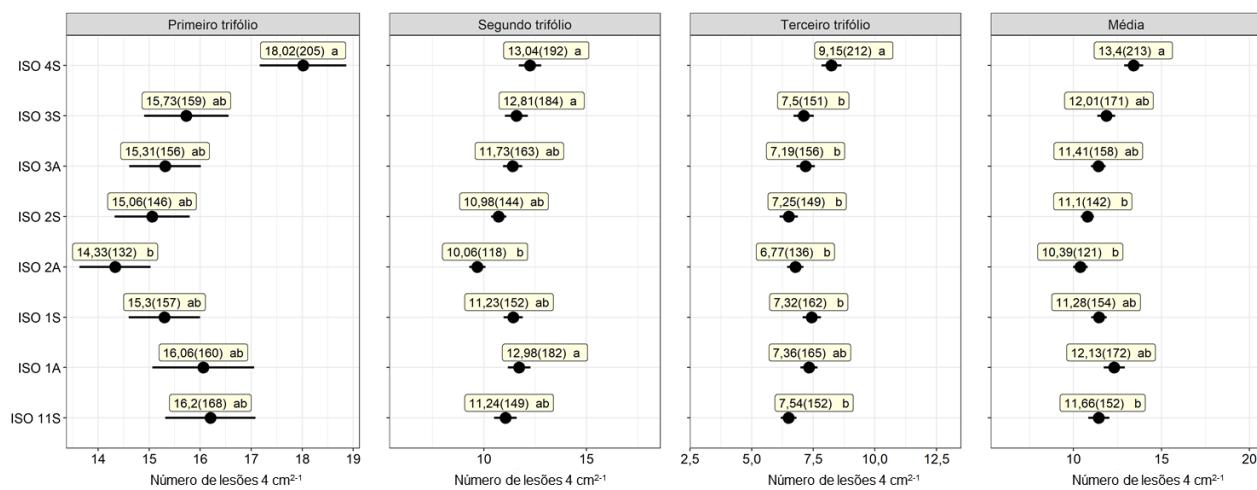
Os dados de número de lesões cm<sup>-2</sup> por trifólio e período de incubação foram analisados utilizando a transformação de classificação alinhada (ART), utilizada para análises fatoriais não paramétricas usando procedimentos ANOVA. Quando constatadas diferenças significativas as médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $p<0,05$ ). Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett ( $p>0,05$ ), respectivamente. Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software R 4.0.2 (R CORE TEAM, 2020).

## 5.5 RESULTADOS

### 5.5.1 Lesões em diferentes trifólios de soja

Quanto ao número de lesões, não foi constatada interação significativa entre isolado e cultivar, para o 1º, 2º e 3º trifólios e média da planta ( $p= 0,70; 0,92; 0,86; 0,80$ , respectivamente). Por outro lado, houve diferença significativa ( $p< 0,01$ ) para o número de lesões ocasionadas pelos diferentes isolados dentro de cada trifólio e nos valores médios da planta como um todo (Figura 2.1).

**Figura 2.1** - Número de lesões  $4 \text{ cm}^{-2}$  (média (soma dos postos)) nos 1º, 2º e 3º trifólios de soja após 12 dias da inoculação com diferentes isolados de *Corynespora cassiicola*, Londrina - PR, 2020.



O maior número de lesões, no 1º trifólio foi ocasionado pelo isolado ISO 4S, com 18,02 lesões por  $4 \text{ cm}^{-2}$ , diferindo do isolado ISO 2A que resultou em menor número de lesões, 14,33 lesões por  $4 \text{ cm}^{-2}$ . Os demais isolados proporcionaram níveis intermediários de lesões, variando de 15,06 a 16,20 lesões por  $4 \text{ cm}^{-2}$ .

No 2º trifólio, os isolados ISO 4S, ISO 1A e ISO 3S produziram os maiores números de lesões, 13,04; 12,98 e 12,81 lesões por  $4 \text{ cm}^{-2}$ , respectivamente, diferindo do ISO 2A que ocasionou a menor quantidade de lesões, 10,06 lesões por  $4 \text{ cm}^{-2}$ .

Para o 3º trifólio, o isolado que proporcionou o maior número de lesões foi o ISO 4S, com 9,15 lesões por  $4 \text{ cm}^{-2}$ , diferindo dos isolados ISO 2A, ISO 3A, ISO 2S, ISO 1S, ISO 3S e ISO 11S que resultaram em menores quantidades de lesões, apenas 6,77 a 7,54 lesões por  $4 \text{ cm}^{-2}$ .

Ao analisar o número médio de lesões na planta como um todo, verificou-se que o isolado ISO 4S proporcionou o maior número de lesões, 13,4 lesões por  $4 \text{ cm}^{-2}$ , resultando em maior severidade da doença nas plantas. Por outro lado, as menores

quantidades de lesões foram ocasionadas pelos isolados ISO 2A, ISO 2S e ISO 11S, variando de 10,39 a 11,66 lesões por  $4\text{ cm}^{-2}$ . Os demais isolados ocasionaram severidade de mancha alvo intermediárias (Figura 2.1).

De maneira geral, a maior quantidade de lesões ocasionadas pelos diferentes isolados de *C. cassiicola* foram na posição inferior das plantas, 1º trifólio, sendo o número de lesões variou de 14,33 a 18,02 por  $4\text{ cm}^{-2}$  de trifólio. Para a posição média das plantas, 2º trifólio, a quantidade de lesões situou-se entre 10,06 e 13,04. O menor número de lesões, 6,77 a 9,15 lesões por  $4\text{ cm}^{-2}$ , foi observado na posição superior das plantas, 3º trifólio. Nos três trifólios avaliados, os isolados ISO 4S e ISO 2A ocasionaram, respectivamente, a maior e menor quantidade de lesões em  $4\text{ cm}^{-2}$ .

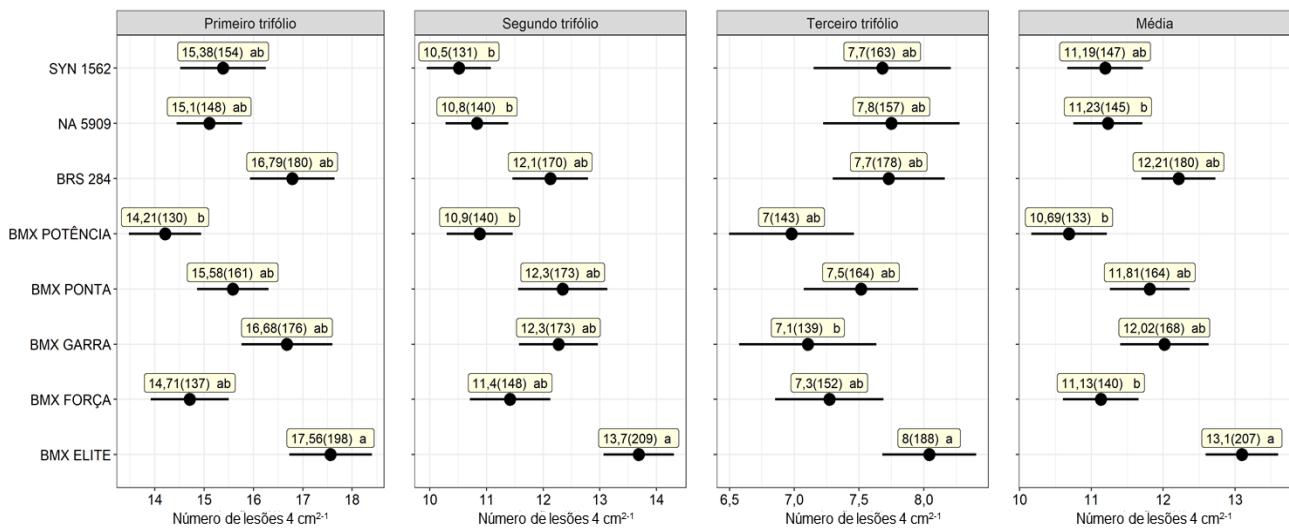
Foram observadas diferenças significativas no número de lesões ocasionadas por *C. cassiicola* nos diferentes cultivares de soja, considerando o 1º trifólio ( $p= 0,02$ ), 2º trifólio ( $p< 0,01$ ) e 3º trifólio ( $p= 0,03$ ) (Figura 2.2).

Para o 1º trifólio, o menor número de lesões (14,21 lesões  $4\text{ cm}^{-2}$ ) foi observado no cultivar BMX Potência RR, enquanto a maior quantidade de lesões (17,56 lesões  $4\text{ cm}^{-2}$ ) foi observado no cultivar BMX Elite IPRO. Números intermediários de lesões ocorreram nos demais cultivares de soja.

A quantidade de lesões no 2º trifólio foi menor para os cultivares SYN 1562 IPRO, NA 5909 RG e BMX Potência RR, com 10,50; 10,80 e 10,90 lesões  $4\text{ cm}^{-2}$ , respectivamente, diferindo do cultivar BMX Elite IPRO, no qual o maior número de lesões (13,70 lesões  $4\text{ cm}^{-2}$ ) foi observado.

Para o 3º trifólio, o menor número de lesões (7,10 lesões  $4\text{ cm}^{-2}$ ) ocorreu no cultivar BMX Garra IPRO, diferindo do cultivar com maior número de lesões (8,00 lesões  $4\text{ cm}^{-2}$ ) BMX Elite IPRO.

**Figura 2.2** - Número de lesões  $4\text{ cm}^{-2}$  (média (soma dos postos)) nos 1º, 2º e 3º trifólios de soja após 12 dias da inoculação com diferentes cultivares de soja inoculadas com isolados de *Corynespora cassiicola*, Londrina - PR, 2020.



Ao considerar o número médio de lesões na planta como um todo, foi possível verificar uma menor ocorrência de lesões, entre 10,69 e 11,23 lesões por  $4\text{ cm}^{-2}$ , nos cultivares de soja BMX Potência RR, BMX Força RR e NA 5909 RG, indicando menor severidade da doença nesses cultivares. Por outro lado, o maior número de lesões, 13,10 lesões por  $4\text{ cm}^{-2}$ , foi observado no cultivar BMX Elite IPRO, indicando maior suscetibilidade deste cultivar à mancha alvo. Níveis intermediários de severidade ocorreram nos demais cultivares (Figura 2.2).

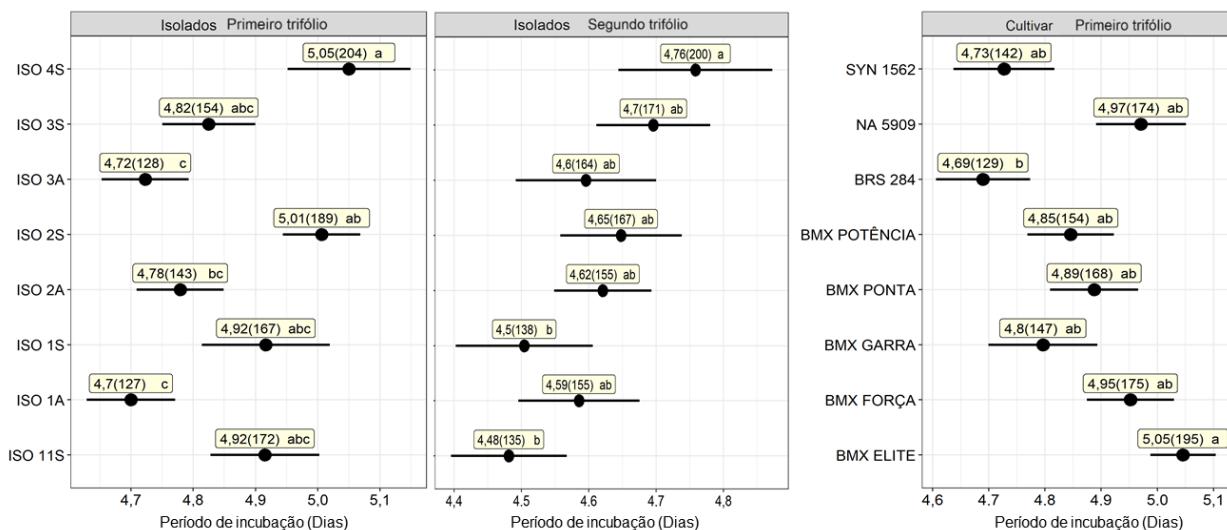
Em todos os cultivares, a maior quantidade de lesões ocasionadas por *C. cassiicola* ocorreu na posição inferior das plantas, 1º trifólio, entre 14,21 a 17,56 lesões por  $4\text{ cm}^{-2}$ . O número de lesões na posição média das plantas, 2º trifólio, situou-se entre 10,50 e 13,70 lesões por  $4\text{ cm}^{-2}$ . A menor ocorrência de lesões, 7,10 a 8,00 lesões por  $4\text{ cm}^{-2}$ , foi observada na posição superior das plantas. Para os três trifólios avaliados, a maior ocorrência de lesões sempre foi verificada para o cultivar BMX Elite IPRO, enquanto no 1º e 2º trifólios o cultivar BMX Potência RR apresentou a menor quantidade de lesões.

### 7.5.2 Período de Incubação (PI)

Não houve interação no período de inubação (PI) entre isolado de *C. cassiicola* e cultivar de soja, para o 1º, 2º e 3º trifólios ( $p= 0,59$ ;  $0,51$  e  $0,85$ , respectivamente). Diferenças significativas no PI foram verificadas para isolados de *C. cassiicola* inoculados no 1º e 2º trifólios ( $p< 0,01$ ), não sendo possível constatar diferenças para o 3º trifólio ( $p= 0,12$ ). Entretanto, diferenças significativas no PI dos isolados de *C. cassiicola* entre diferentes cultivares de soja foram verificadas apenas para o 1º trifólio ( $p=$

0,03) (Figura 2.3).

**Figura 2.3** - Períodos de incubação nos 1º, 2º trifólios de soja após 12 dias da inoculação com diferentes isolados de *Corynespora cassiicola*, sob condições de câmara climatizada (temperatura de  $26 \pm 1$  °C, umidade relativa de  $80 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 horas, claro/escuro).



No 1º trifoliol, o maior PI, 5,05 dias, foi observado para o isolado ISO 4S, diferindo dos isolados ISO 1A, ISO 3A e ISO 2A, que apresentaram os menores PI, 4,70 a 4,78 dias. De modo semelhante ocorreu para o 2º trifoliol, novamente verificou-se maior PI, 4,76 dias, para o isolado ISO 4S. Entretanto, os menores PI foram observados para os isolados ISO 11S e ISO 1S, com 4,48 e 4,51 dias, respectivamente. O PI dos diferentes isolados de *C. cassiicola* variou entre 4,20 e 4,45 dias, 4,48 e 4,76 dias e 4,70 e 5,05 dias, para o 3º, 2º e 1º trifólios, respectivamente.

No 1º trifoliol, o maior PI de *C. cassiicola* ocorreu no cultivar BMX Elite IPRO, 5,05 dias, e o menor PI foi constatado no cultivar BRS 248, 4,69 dias. Nos demais cultivares verificou-se PI intermediários, 4,73 a 4,97 dias. O PI de *C. cassiicola* nos diferentes cultivares variou de 4,23 a 4,46 dias, 4,51 a 4,80 dias e 4,69 a 5,05 dias, para o 3º, 2º e 1º trifólios, respectivamente.

### 7.5.3 DISCUSSÃO

Neste estudo não foi observada interação entre cultivar de soja e isolado

de *C. cassiicola*, o que difere de resultados apresentados por Teramoto et al. (2013a). Os autores verificaram interações significativas entre isolados brasileiros de *C. cassiicola* e doze cultivares de soja, porém foram utilizadas no estudo outras cultivares de soja e isolados do patógeno Teramoto et al. (2013a). A não similaridade entre este estudo e o conduzido por Teramoto et al. (2013a) provavelmente seja devido à variabilidade que o patógeno apresenta (DIXON et al., 2009).

Isolados de *C. cassiicola* proporcionaram severidade e período de incubação (PI) diferenciada da doença sobre os cultivares de soja, corroborando o descrito por Dixon et al. (2009). Isolados resultaram em diferentes níveis de patogenicidade em plantas de soja Dixon et al. (2009). Além disso, nesse trabalho, foi constado que os isolados possuíam variabilidade genética.

O plantio contínuo de cultivares suscetíveis permite grande multiplicação de *C. cassiicola*. Sob pressão de seleção exercida por diferentes ambientes de produção de soja, e aliado ao uso de fungicidas de baixa eficiência, contribuem para a seleção de isolados mais agressivos (XAVIER et al., 2013). Esse processo de seleção contribui para a variabilidade genética que consequentemente podem resultar em diferenças na patogenicidade observada em diferentes cultivares de soja.

A quantificação da doença é considerada uma das fases mais importantes em um programa de manejo de doenças de plantas (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). Cultivares de soja menos suscetíveis à mancha alvo podem ser selecionados para estudos futuros ou até mesmo utilizados em programas de manejo integrado para doenças em diversas regiões agrícolas, conforme proposto por Snow; Berggren (1989); Sinclair (1989) e Almeida et al., (2005).

Os cultivares que apresentaram menor número de lesões de mancha alvo, NA 5909 RG, BMX Potência RR e BMX Força RR, ou maior período de incubação, BMX Elite IPRO, podem ser utilizadas pelos agricultores em algumas regiões, juntamente com a adoção de outras táticas de manejo, para diminuir a severidade da doença.

Muliterno de Melo (2009), em suas avaliações da reação de cultivares à mancha alvo, determinou o número e diâmetro de lesões apenas para o folíolo central. Neste estudo as avaliações foram realizadas nos três folíolos 1º, 2º e 3º trifólios, com finalidade de obter dados mais precisos quanto à reação de cultivares à mancha alvo.

Além da temperatura, a posição das folhas pode influenciar a incidência e expansão das lesões de mancha alvo, em diferentes patossistemas (ECKHARDT; STEUBING; KRANZ, 1984). Foi verificado para os diferentes isolados de *C. cassiicola*,

maior ocorrência das lesões na posição inferior da planta, 1º trifólio, em todos os cultivares de soja testados. Esses resultados corroboram com outros estudos que verificaram a ocorrência da mancha alvo nos estratos inferiores da planta (KUROZAWA et al., 2005; EMBRAPA, 2000). Corner et al. (2013) também relatam que, em condições de campo, a mancha alvo surge inicialmente no estrato inferior da planta, sendo a parte mais afetada.

Provavelmente, a maior ocorrência dos sintomas da doença nos trifólios inferiores das plantas de soja seja devido ao microclima ideal formado neste estrato da planta. Diversos autores relatam que o fungo pode incidir em qualquer estádio da cultura. Entretanto a sua incidência é mais comum após o fechamento do dossel, levando à menor incidência de radiação solar e maior umidade relativa (KUROZAWA; PAVAN, 2005; AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

O período de incubação é uma variável epidemiológica importante, pois influencia a velocidade com que ocorrem os ciclos da doença (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2003; BERGAMIN FILHO; KRANZ, 1996).

O PI dos isolados de *C. cassiicola* nos diferentes cultivares de soja variou de 4 a 5 dias, sob condições controladas, temperatura de  $26 \pm 1$  °C; umidade relativa de  $80 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 horas. Para o mesmo patógeno e espécie vegetal, Seaman et al. (1965) relataram que os sintomas de mancha alvo, em condições de estufa, apareceram entre 7 a 10 dias em plantas de soja inoculadas e com umidade livre na folhagem, em condições de casa de vegetação. Essa diferença no PI pode ser decorrente das diferentes condições em que as plantas inoculadas foram submetidas, sobretudo em relação à temperatura e ao fotoperíodo.

Neste estudo foi possível verificar que o PI é menor no trifólio superior e maior no trifólio inferior das plantas de soja. O mesmo foi constatado para o *Pseudocercospora fuligena* em plantas de tomate na qual folhas de 7 semanas tinham um maior PI de patógeno em relação às folhas de 1 a 5 semanas (MERSHA; ZHANG; HAU, 2014).

Diversas espécies de plantas aumentam sua resistência ou tolerância aos patógenos conforme envelhecem. Esse fenômeno é conhecido como resistência relacionada à idade (DEVELEY-RIVIÈRE; GALIANA, 2007). Mersha e Hau (2011) demonstraram que tecidos foliares de feijão mais jovens são mais suscetíveis à ocorrência de *Uromyces appendiculatus*.

O menor PI ou maior suscetibilidade pode estar relacionado com a capacidade do tecido foliar em sintetizar compostos de defesa. Durante o envelhecimento

do tecido foliar ocorre o acúmulo de fenóis e proteínas, constituindo em uma barreira química que torna os tecidos mais velhos menos propensos ao desenvolvimento dos patógenos (HUGOT et al., 2004). Na cultura da videira, as folhas mais jovens apresentaram suscetibilidade ligeiramente maior do que as folhas mais velhas à infecção por oídio (STEIMETZ et al., 2012). As folhas jovens suscetíveis eram aquelas que ainda agiam como órgãos drenos (STEIMETZ et al., 2012).

## 5.6 CONCLUSÕES

A severidade e o período de incubação (PI) para a mancha alvo são influenciados pelo isolado de *C. cassiicola*, cultivar de soja e posição do trifólio na planta.

Isolados de *C. cassiicola* podem ocasionar maior (ISO 4S) ou menor (ISO 2A, ISO 2S e ISO 11S) severidade de mancha alvo.

Não existem cultivares resistentes, porém, menor severidade da doença ocorre nos cultivares BMX Potência RR, BMX Força RR e NA 5909 RG, enquanto maior suscetibilidade é verificada para o cultivar BMX Elite IPRO.

O maior período de incubação (PI) para os isolados de *C. cassiicola* avaliados ocorre no cultivar BMX Elite IPRO e o menor no cultivar BRS 248. Independente do cultivar avaliado o período de incubação (PI) tende a ser maior para o isolado ISO 4S.

A quantidade de lesões ocasionadas pelos diferentes isolados de *C. cassiicola* é maior no trifólio inferior e menor no trifólio superior das plantas. De modo semelhante ocorre para o período de incubação (PI), sendo este período maior no trifólio inferior e menor no trifólio superior das plantas de soja.

## 6 ARTIGO C: INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES DE MANCHA ALVO EM FOLHAS UNIFOLIOLADAS, PECÍOLOS E HASTE DE PLANTAS DE SOJA

### 8.1 RESUMO

O objetivo do estudo foi classificar os diferentes tipos de lesões foliares de mancha alvo, e quantificar sua incidência em tecidos vegetais de cultivares comerciais de soja, infectados por diferentes isolados de *C. cassiicola*. O experimento foi conduzido no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR-EMATER, Londrina-PR, sob condições controladas. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados em arranjo fatorial 8 x 8, sendo oito isolados de *C. cassiicola* e oito cultivares de soja, e com quatro repetições. As plantas de soja foram inoculadas no estádio fenológico V4, por aspersão sobre os folíolos de suspensão fúngica de cada isolado na concentração de  $2 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>, e transferidas para câmara climatizada. Para cada combinação de isolado e cultivar de soja, foi feita a classificação de lesões de mancha alvo, atribuindo notas para cada tipo de sintoma observado. A incidência de lesões nos tecidos vegetais foi realizada 10 dias após a inoculação, registrando a presença de lesões nas folhas unifolioladas, pecíolos e haste. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, com médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Cinco padrões de lesões foram observados, variando de pequenas manchas necróticas com halos pouco evidentes à grandes manchas necróticas com grandes halos cloróticos. Sintomas mais severos e capazes de ocasionar desfolha ocorreram para as plantas inoculadas com os isolados ISO 1S, ISO 4S e ISO 11S nos cultivares BMX Elite IPRO, BRS 284, BMX Garra IPRO e Nidera 5909 RG. As plantas dos demais cultivares inoculados com os outros isolados de *C. cassiicola* apresentaram em notas abaixo de três. A maior frequência de trifólios lesionados foi verificada para a posição superior e inferior (3º e 1º trifólio) das plantas de soja. Lesões em cotilédones, folhas unifolioladas, pecíolos e haste das plantas ocorreram em todos os cultivares avaliados neste estudo. Não houve interação entre isolado de *C. cassiicola* e cultivar de soja em relação à presença de lesões nas folhas unifolioladas, pecíolos e haste. Houve diferenças significativas para frequência de lesões nos pecíolos entre os isolados; e frequência de lesões nas hastes para os cultivares de soja. O isolado ISO 4S ocasionou maior incidência de lesões nos pecíolos em relação aos isolados ISO 2A e ISO 2S. Maior incidência de lesões em haste foi observada nos cultivares BMX Potência RR e BMX Força RR em relação ao cultivar BMX Elite IPRO. As inoculações dos demais isolados de *C. cassiicola* e nos outros cultivares de soja, resultaram em incidências intermediárias. A incidência de lesões nos pecíolos, ocasionadas por *C. cassiicola*, aumentou conforme diminuiu a altura em que o pecíolo era inserido na haste principal.

**Palavras-chave:** *Corynespora cassiicola*, *Glycine max*, incidência, tecidos vegetais, posição de trifólio.

## 8.2 ABSTRACT

The objective of the study was to classify the different types of leaf lesions of target spot, and quantify their incidence in plant tissues of commercial soybean cultivars, infected by different isolates of *C. cassiicola*. The experiment was conducted at the Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR-EMATER, Londrina-PR, under controlled conditions. The experimental design used was a randomized block design with an 8 x 8 factorial arrangement, with eight *C. cassiicola* isolates and eight soybean cultivars, and four repetitions. Soy plants were inoculated at the V4 phenological stage by sprinkling fungal suspension of each isolate on the leaflets at a concentration of  $2 \times 10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and transferred to an air-conditioned chamber. For each combination of isolate and soybean cultivar, the classification of target spot lesions was made, assigning grades for each type of symptom observed. The incidence of lesions on plant tissues was performed 10 days after inoculation, recording the presence of lesions on the unifoliate leaves, petioles and stem. The data obtained were submitted to variance analysis, with means compared by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). Five patterns of lesions were observed, ranging from small necrotic spots with inconspicuous halos to large necrotic spots with large chlorotic halos. The most severe symptoms capable of causing defoliation occurred for plants inoculated with isolates ISO 1S, ISO 4S, and ISO 11S on BMX Elite IPRO, BRS 284, BMX Garra IPRO, and Nidera 5909 RG. The plants of the other cultivars inoculated with the other isolates of *C. cassiicola* showed in scores below three. The highest frequency of lesioned trefoils was observed for the upper and lower position (3rd and 1st trefoil) of soybean plants. Lesions on cotyledons, unifoliolate leaves, petioles and stem of the plants occurred in all cultivars evaluated in this study. There was no interaction between *C. cassiicola* isolate and soybean cultivar regarding the presence of lesions on the unifoliolate leaves, petioles and stem. There were significant differences for frequency of lesions on petioles among isolates; and frequency of lesions on stems for soybean cultivars. The isolate ISO 4S caused higher incidence of stem lesions compared to isolates ISO 2A and ISO 2S. Higher incidence of stem lesions was observed in the cultivars BMX Potência RR and BMX Força RR compared to the cultivar BMX Elite IPRO. Inoculations of the other isolates of *C. cassiicola* and on the other soybean cultivars resulted in intermediate incidences. The incidence of petiole lesions caused by *C. cassiicola* increased as the height at which the petiole was inserted into the main stem decreased.

**Keywords:** *Corynespora cassiicola*, *Glycine max*, incidence, plant tissues, trifolii position.

### 8.3 INTRODUÇÃO

A mancha alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, tornou-se uma importante doença foliar que afeta a produção de soja no Brasil e no mundo (FARR; ROSSMAN, 2019).

O fungo sobrevive em sementes infectadas e restos culturais, principalmente em pousio durante pelo menos dois anos (ALMEIDA et al., 2001), atuando como fonte primária de inóculo para novas epidemias. O patógeno também pode sobreviver em caule e raízes sob a forma de clamidósporos (OLIVEIRA et al., 2012).

O tratamento de sementes, pulverização foliar com fungicidas e rotação de culturas são as estratégias de controle mais utilizadas para o manejo da doença (ALMEIDA et al., 2005). Porém, epidemias de mancha alvo têm sido frequentes em muitas regiões de cultivo de soja no Brasil devido à ausência de cultivares resistentes e isolados resistentes a fungicidas (GODOY et al., 2012; TERAMOTO et al., 2013a).

As infecções foliares são favorecidas pela presença de água livre nas folhas e umidade relativa do ar acima de 80% (SNOW; BERGGREN, 1989). Sob este ambiente propício, forma-se um tubo germinativo, com posterior penetração no tecido hospedeiro (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

O patógeno libera na planta hospedeira uma toxina, denominada "cassiicolin", que mata tecidos adjacentes no local da infecção. Esta toxina é essencial para o estabelecimento inicial e patogenicidade do fungo (BRETON et al., 2000). Em ambiente com elevada umidade e temperaturas de 22 a 30°C, os sintomas aparecem 5-7 dias após a infecção (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Os sintomas típicos de mancha alvo nas folhas são pequenas lesões circulares de cor marrom com halo amarelo bem desenvolvido. A coalescência das lesões ocorre à medida que as manchas se expandem (ALMEIDA et al., 2005).

Além de sintomas nos tecidos foliares, o fungo pode causar apodrecimento nas raízes, vagens, lesões nos caules e infectar as sementes (RAFFEL et al., 1999). Entretanto, o patógeno é um representante típico do grupo que reduz a área fotossintética da folha devido aos sintomas que produz, acelerando o processo natural de senescência da folha (BOOTE et al., 1983; BEDENDO, 1995a).

Godoy et al. (2016b) relataram na cultura da soja uma redução na produtividade de até 35% em cultivares suscetíveis à mancha alvo, enquanto Molina et al., (2019b) mencionam perdas de até 40% na produtividade.

Segundo Mesquini (2012), a severidade de mancha alvo pode afetar até 37% do estrato inferior da planta sem reduzir a produção de uma cultivar suscetível, devido à baixa contribuição deste estrato da planta na formação e enchimento da semente. No entanto, a doença causa redução na produção quando ocorre no estrato médio da planta, devido esta área ter grande interceptação de luz e maior contribuição na formação e enchimento da semente (SAKAMOTO, SHAW, 1967).

Existe uma carência de estudos que classifiquem e descrevam como os sintomas progridem em plantas de soja. Acredita-se que os sintomas podem variar em função do isolado de *C. cassiicola* ou do hospedeiro em que se estabelece o processo da doença. Essa variação pode resultar em uma maior ou menor quantidade de área foliar afetada, que por sua vez pode influenciar na velocidade com que a folha senesce e consequentemente nos danos à produção. Além disso, lesões presentes em pecíolos também podem resultar em antecipação de senescência foliar, com consequente desfolha.

O presente estudo teve como objetivo classificar os diferentes tipos de lesões foliares da mancha alvo da soja, e quantificar sua incidência em cultivares comerciais de soja infectados por diferentes isolados de *C. cassiicola*.

## 8.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.4.1 Local de execução

O experimento foi conduzido sob condições de casa de vegetação e câmara climatizada, no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR-EMATER (IDR - Paraná), Londrina, PR.

### 8.4.2 Cultivares de soja e isolados de *Corynespora cassiicola* utilizados

Os cultivares comerciais de soja Brasmax Elite IPRO, Brasmax Força RR, Brasmax Garra IPRO, Brasmax Ponta IPRO, Brasmax Potência RR, BRS 284, Nidera 5909

RG e SYN 1562 IPRO. Estas cultivares foram selecionadas por apresentarem algum nível de suscetibilidade a mancha alvo.

Sementes das cultivares de soja foram distribuídas em vasos de 1 litro contendo solo peneirado (Latossolo Vermelho distroférrico). Foram adicionados 5 g do adubo químico granulado, formulação 4-30-10 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) em cada vaso. Após a semeadura os vasos foram mantidos em casa de vegetação até o momento da inoculação com os isolados de *Corynespora cassiicola*.

Foram utilizados oito isolados de *C. cassiicola* depositados na coleção do laboratório de Patologia de Sementes do IDR-Paraná. Os isolados foram obtidos de lesões de plantas de algodão (ISO 1 A; ISO 2 A e ISO 3 A) e soja (ISO 1 S; ISO 2 S; ISO 3 S; ISO 4 S; ISO 11 S), coletadas a campo na safra 2018/19. Procedeu-se à purificação dos isolados por cultivo monospórico. Os isolados foram armazenados a 4 °C pelo método de Castellani.

Para a multiplicação de *C. cassiicola*, foi realizado o repique de cada isolado para 50 placas de Petri ( $\varnothing = 9$  cm) contendo meio de cultura Suco V8 Ágar (5 g L<sup>-1</sup> Carbonato de cálcio, 340 mL suco V8, 34 g L<sup>-1</sup> de ágar) com estreptomicina (0,1%). As placas foram mantidas a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12/12 horas por 10 dias. Após esse período, as colônias de *C. cassiicola* apresentaram abundante esporulação e foram utilizadas como inóculo.

#### 8.4.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados em arranjo fatorial 8 x 8, (isolados de *C. cassiicola* x cultivares de soja), com quatro repetições. Os blocos foram montados ao longo do tempo. A unidade experimental foi constituída de dois vasos contendo uma planta cada.

#### 8.4.4 Condições de inoculação

A inoculação com *C. cassiicola* ocorreu quando os cultivares de soja apresentavam estádio fenológico V4, caracterizado pela terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida (NEUMAIER et al., 2000). Para estimular a abertura dos estômatos das plantas, 24 horas antes da inoculação, cada vaso recebeu 1 g (grama) de ureia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O).

Para cada isolado de *C. cassiicola* foi obtida uma suspensão de conídios na concentração de  $2 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>, na qual foi adicionado uma gota por litro de espalhante adesivo Tween 20 e 0,4 gramas de gelatina sem sabor, para melhorar a distribuição da suspensão e adesão do inóculo nos folíolos de soja durante a inoculação. A inoculação ocorreu no período mais fresco do dia, com auxílio de borrifador manual, a aspersão da suspensão de conídios foi realizada sobre as folhas de soja até o ponto de escorrimento.

Para favorecer a infecção do patógeno, após a inoculação, os vasos foram transferidos para câmara climatizada com temperatura de  $26 \pm 1$  °C, umidade relativa de 85 a 90 % e fotoperíodo de 12 horas, permanecendo nestas condições por um período de 48 horas. Decorrido este período, as plantas foram distribuídas aleatoriamente dentro da câmara climatizada e mantidas nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo, contudo a umidade relativa foi ajustada para  $80 \pm 10\%$  até o término das avaliações aos 20 dias após a inoculação (DAI).

#### 8.4.5 Avaliações

Para cada combinação isolado x cultivar foram avaliados a classificação de lesões nos folíolos de soja e incidência da doença nas folhas unifolioladas, pecíolos e haste dos cultivares.

A classificação das lesões de mancha alvo presentes nos cultivares de soja foi quantificada aos 12 dias após a inoculação, por meio de notas para cada tipo de sintoma observado.

A incidência nas folhas unifolioladas, pecíolos e haste dos cultivares, foi quantificada aos 10 dias após a inoculação.

#### 8.4.6 Análises estatísticas

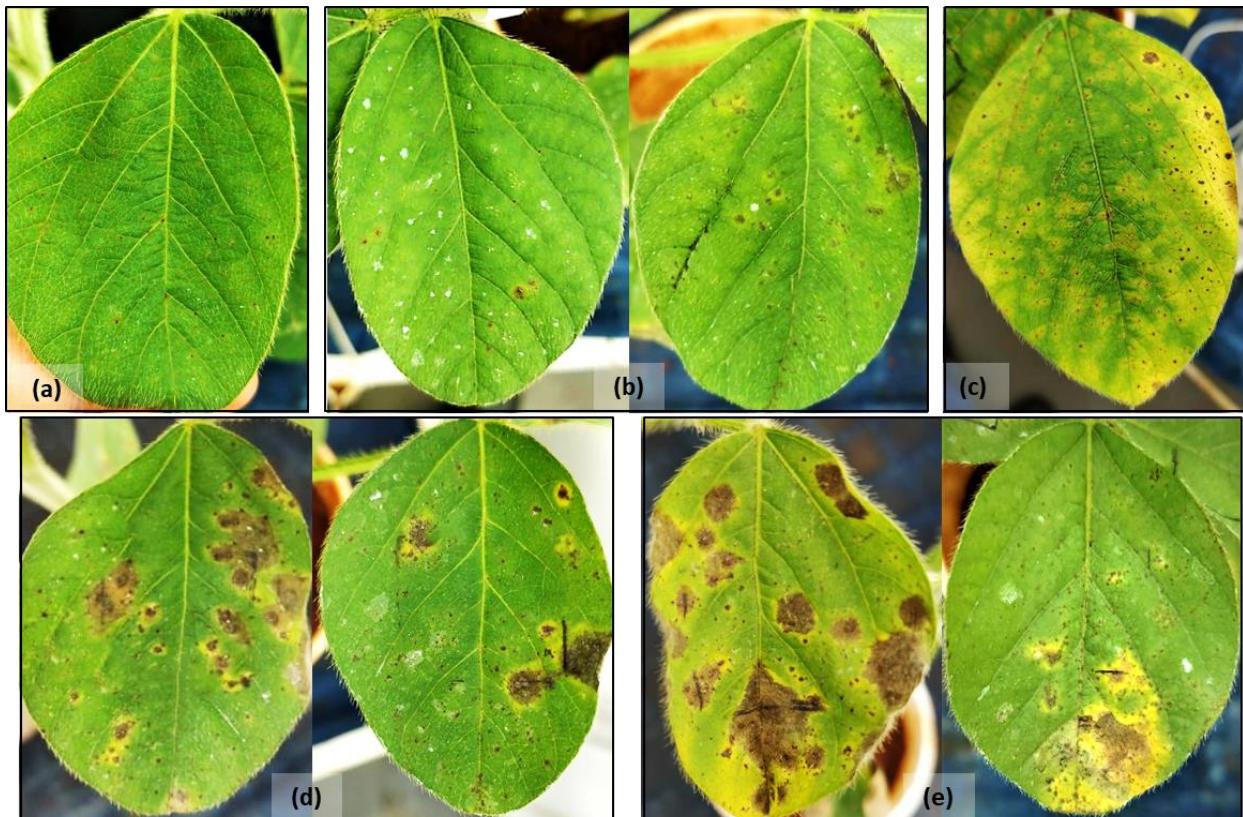
Para a classificação das lesões foi realizada análise descritiva da doença. Os dados de incidência foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de significância. O software utilizado foi o SISVAR.

## 8.5 RESULTADOS

### 8.5.1 Classificação das lesões

Nos diferentes cultivares de soja foram identificados cinco padrões de sintomas foliares ocasionados por *C. cassiicola*, sendo: (a) 1= pequenas manchas necróticas (0,74 mm) com halos cloróticos pouco evidentes; (b) 2= pequenas manchas necróticas (1,80 mm) com halos cloróticos evidentes; (c) 3= pequenas manchas necróticas (2,35 mm) com grandes halos cloróticos; (d) 4= grandes manchas necróticas (6,30 mm) com halos cloróticos evidentes; (e) 5= grandes manchas necróticas (9,30 mm) com grandes halos cloróticos (Figura 3.1). Experimento realizado sob condições controladas de câmara climatizada, ( $T= 25 \pm 2 ^\circ\text{C}$ ; U.R.%= 85 a 90; Fotoperíodo 12/12), Londrina - PR, 2020 (Figura 3.1).

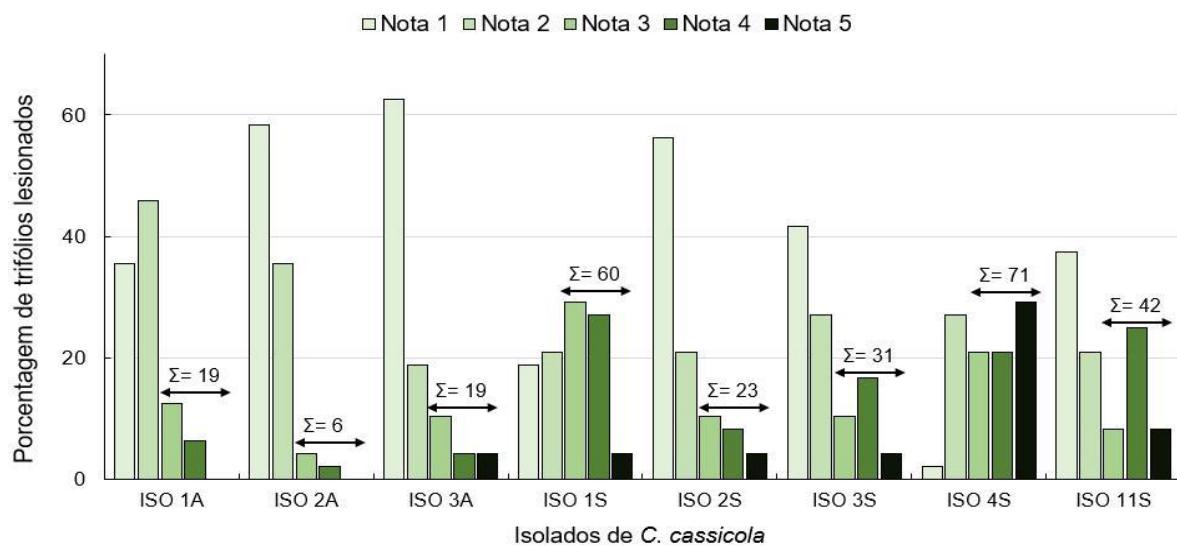
**Figura 3.1** - Classificações de sintomas presentes em folíolos de cultivares de soja inoculadas com *Corynespora cassiicola*; (a) 1= pequenas manchas necróticas (0,74 mm) com halos cloróticos pouco evidentes; (b) 2= pequenas manchas necróticas (1,80 mm) com halos cloróticos evidentes; (c) 3= pequenas manchas necróticas (2,35 mm) com grandes halos cloróticos; (d) 4= grandes manchas necróticas (6,30 mm) com halos cloróticos evidentes; (e) 5= grandes manchas necróticas (9,30 mm) com grandes halos cloróticos (Figura 3.1). Experimento realizado sob condições controladas de câmara climatizada, ( $T= 25 \pm 2 ^\circ\text{C}$ ; U.R.%= 85 a 90; Fotoperíodo 12/12), Londrina - PR, 2020.



**Fonte:** A própria autora

As maiores porcentagens de trifólios com lesões capazes de ocasionar desfolha foram proporcionadas pelos isolados ISO 4S, ISO 1S e ISO 11S, com somatórios, notas iguais ou acima de 3, de 71, 60 e 42%, respectivamente (Figura 3.2). As porcentagens de trifólios com notas de 1 e 2, foram observadas para os isolados ISO 3S, com 69%, ISO 2S, com 77%, ISO 3A e ISO 1A, com 81% e ISO 2A, com 94% (Figura 3.2).

**Figura 3.2 –** Frequência relativa de notas 1 a 5 correspondentes aos sintomas de mancha alvo em trifólios de soja, após 12 dias da inoculação com diferentes isolados de *Corynespora cassiicola*, Londrina - PR, 2020.  $\Sigma$ : somatório de trifólios com notas iguais ou acima de 3.

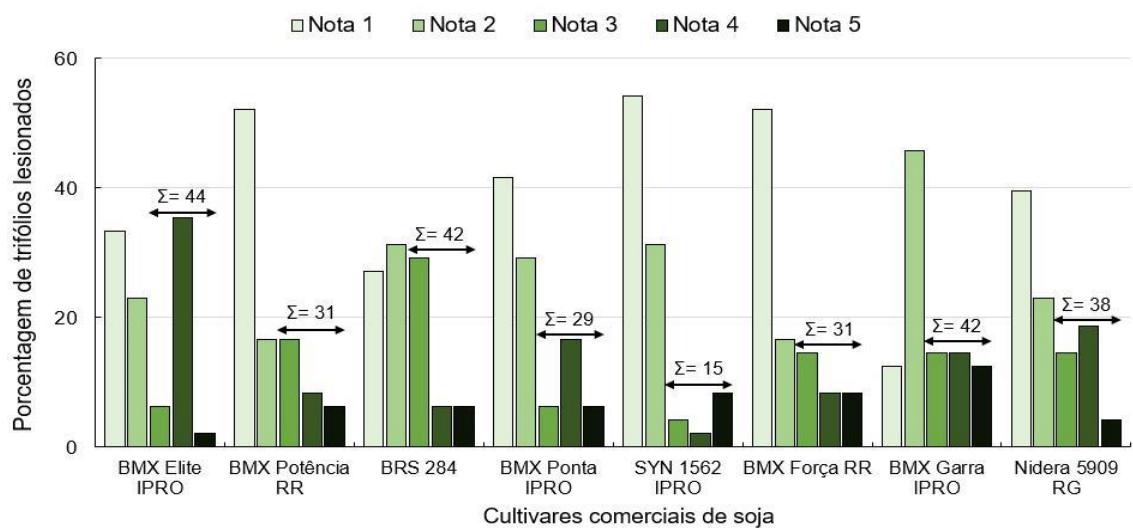


Fonte: A própria autora

Diferenças nas classes de lesões de mancha alvo foram observados entre os cultivares de soja. As maiores frequências de trifólios com lesões capazes de ocasionar desfolha, notas iguais ou acima de 3, foram observadas nos cultivares BMX Elite IPRO, BRS 284, BMX Garra IPRO e Nidera 5909 RG (44, 42, 42 e 38%, respectivamente) (Figura 3.3).

Para os cultivares de soja BMX Força RR, BMX Potência RR, BMX Ponta IPRO e SYN 1562 IPRO ocorreu a predominância de notas de 1 e 2, com frequências acumuladas destas notas entre 69 a 85%.

**Figura 3.3** – Frequência relativa de notas (1 a 5) correspondentes aos sintomas de mancha alvo em trifólios de soja, após 12 dias da inoculação com diferentes cultivares de soja, Londrina - PR, 2020. Σ: somatório de trifólios com notas iguais ou acima de 3.



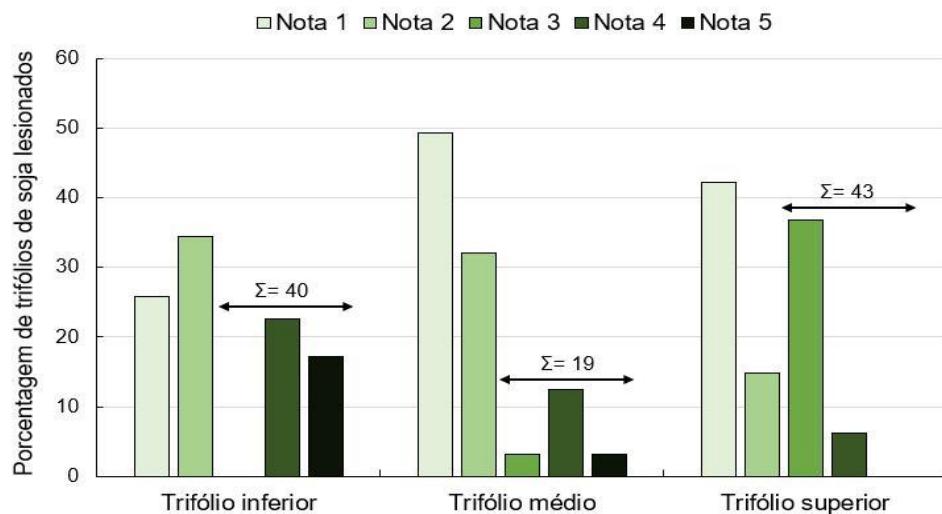
**Fonte:** A própria autora

### 8.5.2 Influência da posição do trifólio na classificação de lesões

Diferenças na frequência de trifólios com notas de lesões, ocasionadas por *C. cassiicola*, foram observadas entre as posições inferior, média e superior das plantas de soja (Figura 3.4).

A maior frequência de trifólios lesionados, com potencial de desfolha (notas iguais ou acima de 3), foi verificada para a posição superior (3º trifólio) e inferior (1º trifólio) das plantas, com 43 e 40%, respectivamente. A posição média da planta (2º trifólio), obteve predominância das notas 1 e 2, com uma frequência acumulada de 81%.

**Figura 3.4** - Frequência relativa de notas (1 a 5) correspondentes aos sintomas de mancha alvo em trifólios de soja, após 12 dias da inoculação com diferentes isolados de *Corynespora cassiicola*, Londrina - PR, 2020.  $\Sigma$ : somatório de trifólios com notas iguais ou acima de 3.



Fonte: A própria autora

### 8.5.3 Infecção de *C. cassiicola* em diferentes tecidos vegetais

Além da ocorrência sobre as folhas, verificou-se a presença de lesões de mancha alvo nas folhas unifolioladas, pecíolos, haste e cotilédones das plantas de soja.

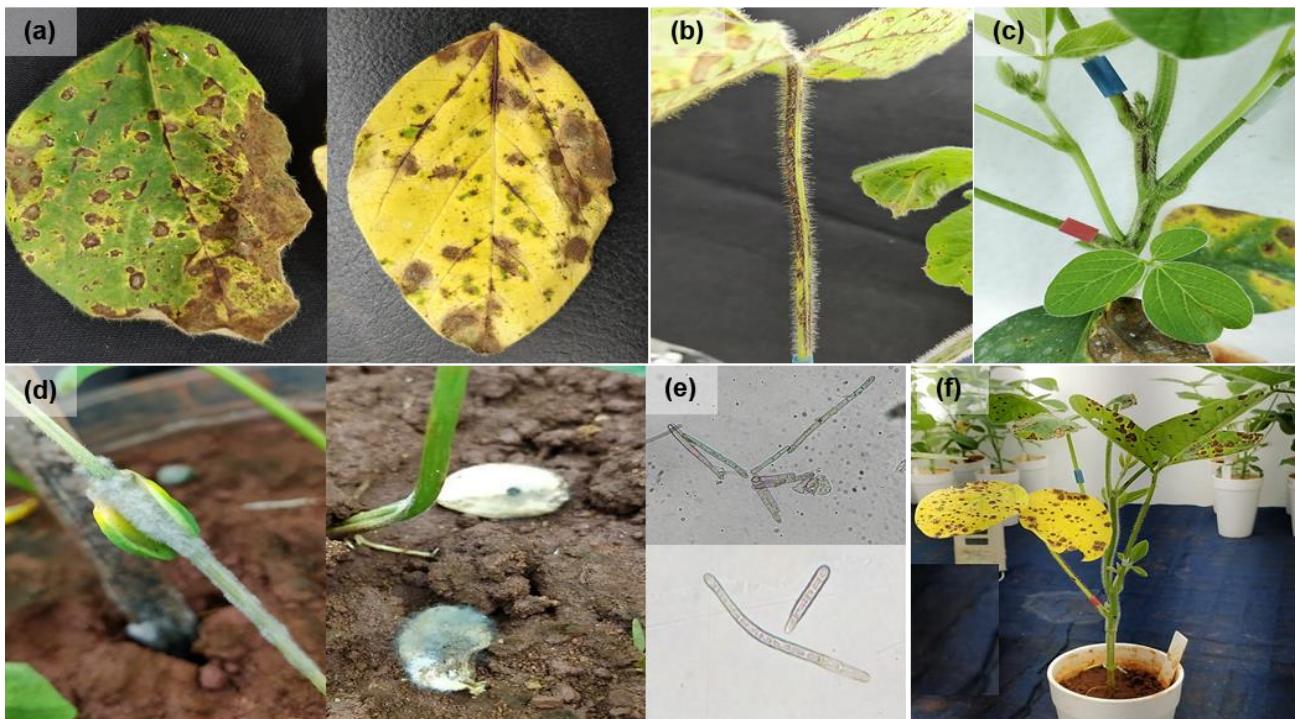
Nas folhas unifolioladas, os sintomas iniciaram com pequenas pontuações pardas com halo amarelado, e após quatro dias evoluíram para grandes manchas circulares de coloração castanho claro no centro (Figura 3.5 - a). Ao redor da área necrosada verificou-se a presença de halo amarelo bastante intenso, com posterior senescência e queda das folhas.

Nos pecíolos e hastes das plantas de soja, as lesões possuíam aspecto deprimido e alongado de coloração castanho-avermelhada. Essas lesões progrediam pela planta em sentido longitudinal, podendo ocorrer coalescência (Figura 3.5 - b,c).

Cinco dias após a inoculação, a presença de micélio do fungo *C. cassiicola* e abundante esporulação foram verificadas nos cotilédones das plantas de soja, independente do cultivar. Os cotilédones ficaram aderidos à planta ou se desprenderam e caíram sobre o solo. Os cotilédones foram coletados (Figura 3.5 - d, e).

De modo geral, as plantas de soja inoculadas com isolados de *C. cassiicola* apresentaram lesões, que variaram desde pequenas manchas necróticas sem halo amarelado a grandes pontos necróticos com halos cloróticos evidentes (Figura 3.5 - f). A presença das lesões foi verificada na parte adaxial e abaxial das folhas.

**Figura 3.5** - Sintomas de mancha alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* em plantas de soja, sob condições de câmara climatizada, Londrina, 2020. Folhas unifolioladas com lesões de mancha alvo (a), lesões escuras e deprimidas no pecíolo (b) e haste (c), cotilédones com presença de micélio fúngico (d), conídios obtidos de cotilédones com esporulação observados em lâminas sobre microscópio óptico (e) e planta com sintomas da doença (f).



**Fonte:** A própria autora

#### 8.5.4 Frequência de infecção por *C. cassiicola* em diferentes tecidos vegetais

Não houve interação entre isolado de *C. cassiicola* e cultivar de soja em relação à presença de lesões nas folhas unifolioladas, pecíolos e haste. Quanto à frequência de lesões nas folhas unifolioladas, não foi constatada diferença significativa entre os isolados de *C. cassiicola* ( $p= 0,06$ ) e entre os cultivares de soja ( $p= 0,54$ ). Foi verificada frequência de lesões nas folhas unifolioladas superior a 96% (Figura 3.6).

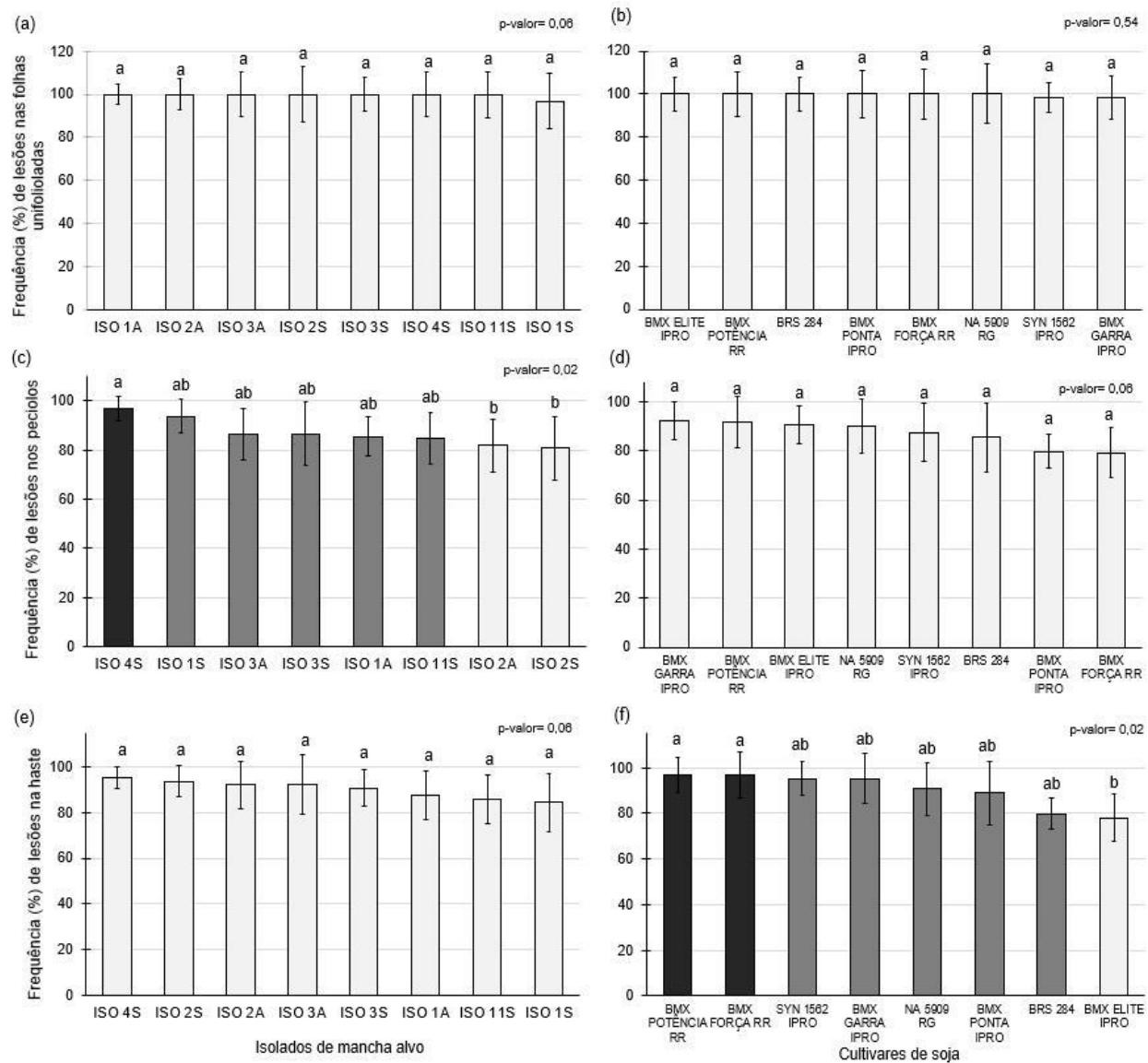
Houve diferença significativa entre os isolados de *C. cassiicola* quanto à frequência de lesões nos pecíolos ( $p= 0,02$ ); e para os cultivares de soja em relação à frequência de lesões nas hastes ( $p= 0,02$ ).

A frequência de pecíolos com lesões foi alta, variando de 80 a 96%. Entretanto, o isolado ISO 4S que ocasionou frequência de 96% de pecíolos com lesões,

diferiu dos isolados ISO 2A e ISO 2S que resultaram nas menores frequências de pecíolos com lesões, 81 e 80%, respectivamente. Os demais isolados proporcionaram frequências intermediárias, variando de 93 a 84% de pecíolos com lesões. Não foi possível verificar diferenças na frequência de pecíolos com lesões entre os cultivares de soja (Figura 3.6).

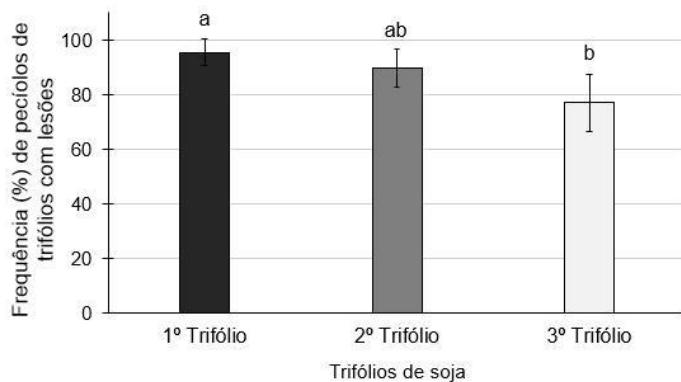
Diferenças foram constatadas entre cultivares de soja quanto à frequência de lesões na haste. Maiores frequências de hastes com lesões, 97%, foram observadas nos cultivares BMX Potência RR e BMX Força RR, diferindo do cultivar BMX Elite IPRO, com menor frequência de hastes com lesões (78%). Não foi verificada diferenças entre isolados de *C. cassiicola* quanto à capacidade de causar lesões em hastes de plantas de soja.

**Figura 3.6 – Frequência de tecidos vegetais de cultivares de soja com lesões ocasionados por diferentes isolados de *C. cassiicola*, após 12 dias de inoculação, Londrina, PR, 2020.**



Quanto à presença de lesões de mancha alvo em pecíolos, foi verificado que 96% dos pecíolos do 1º trifólio continham lesões, 96%, diferindo da ocorrência sobre o 3º trifólio, com lesões em 77% dos pecíolos. Para os pecíolos do 2º trifólio, foi observada frequência de lesões de 90% (Figura 3.7).

**Figura 3.7** - Frequência de pecíolos com lesões ocasionados por *C. cassiicola* em relação a posição do trifólios na planta de soja, após 12 dias de inoculação. Londrina - PR, 2020.



### 8.5.5 DISCUSSÃO

Neste estudo não foi observada interação entre cultivar de soja e isolado de *C. cassiicola*. Foram observadas diferenças na classificação das lesões produzidas pelos isolados nos diferentes cultivares de soja, variando em cinco classes, de pequenos pontos necróticos com halos cloróticos pouco evidente até grandes pontos necróticos com grandes halos cloróticos. Os padrões dos sintomas ocasionados por *C. cassiicola*, corroboram resultados de Henning et al. (2014) que descreveram que os sintomas nas folhas de soja variam de lesões necróticas, manchas marrons à manchas circulares grandes de cor marrom escura, de até 2 cm de diâmetro, com margem amarela e um ponto escuro no centro rodeado por anéis concêntricos mais escuros.

Os isolados de *C. cassiicola* apresentam variação de padrões de lesões. Almeida et al. (2005) também relata sobre os sintomas de mancha alvo, caracterizado por pequenas manchas de coloração castanho avemelhada a parda, evoluindo para manchas de formato arredondado ou irregular da mesma tonalidade. Os sintomas descritos pelos autores coincidem com as características encontradas em nosso estudo. Entretanto a variação de sintomas verificada em nosso estudo foi maior, devido provavelmente ao uso de diferentes isolados e cultivares de soja.

Os cultivares que apresentaram menores severidades de lesões de mancha alvo, BMX Força RR, BMX Potência RR, BMX Ponta IPRO e SYN 1562 IPRO, expressaram algum nível de resistência à doença, apresentando padrões de lesões pequenas. Segundo Lamari e Bernier (1989), o tipo de lesão expressa na planta pode estar

relacionada à resistência. Por exemplo, lesões pequenas que não aumentam de tamanho, ou sobre a suscetibilidade, que é expressa por manchas escuras cercadas por extensa necrose e clorose que podem envolver toda a folha.

Por outro lado, lesões grandes com extensa clorose, com algum nível de suscetibilidade a doença ocorreram para os cultivares BMX Elite IPRO, BRS 284, BMX Garra IPRO e Nidera 5909 RG. Sache et al. (1993) descreveram que as lesões pequenas são uma indicação de que o inóculo ou a eficiência da doença foi alta, enquanto algumas lesões grandes são, por sua vez, baixo inóculo e alta suscetibilidade da planta ou cultivar.

Outro fator importante na interação patógeno-hospedeiro, e classes de sintomas observados, é a produção de enzimas e toxinas. Muitos fungos fitopatogênicos secretam enzimas durante a fase de crescimento ou durante o processo de patogênese (THORMANN et al., 2000). Isto indica grande associação quanto ao padrão de sintoma e a toxina dos isolados de *C. cassiicola*.

Annakutty (1998) demonstrou que *C. cassiicola* produz uma toxina denominada de cassiicolin, responsável pelo processo de infecção e aparecimento de sintomas.

Uma vez no interior da planta hospedeira, o patógeno *C. cassiicola* libera a "cassiicolin", matando os tecidos adjacentes no local da infecção, colonizando e se reproduzindo nos tecidos necróticos. Barthe et al. (2007) demonstraram que a cassiicolin se comporta como uma toxina específica do hospedeiro, compartilhando a mesma gama de hospedeiros do patógeno de onde se originou.

Maiores frequências de lesões de mancha alvo ocorreram nos trifólios superior e inferior, 3º e 1º trifólio, com lesões capazes de causar desfolha. Segundo Upchurch; Ramirez (2010) as plantas respondem às infecções por patógenos por meio de mecanismos de defesa, que incluem a síntese de compostos antimicrobianos, como fenois e fitoalexinas, a produção de espécies reativas de oxigênio e lignificação de tecidos. Portanto, talvez este fator esteja relacionado com a capacidade do tecido foliar em expressar maior ou menor nível de reações de defesa.

As fitoalexinas podem estar envolvidas no progresso de desenvolvimento de manchas nos folíolos de soja. Braga (2008) relatou que as fitoalexinas são compostos de defesa antimicrobianos, sintetizadas e acumuladas nas plantas após o contato com os microorganismos.

A capacidade das plantas de soja em reduzir a colonização do fungo é dependente da combinação de diferentes mecanismos de defesa. Estes mecanismos de

defesa variam de acordo com a interação patógeno-hospedeiro (HAMMOND-KOSACK; PARKER, 2003).

Fortunato et al., (2015) descreveram nos estágios iniciais da infecção por *C. cassiicola* o aumento na atividade de polifenol oxidases, das concentrações de fenólicos solúveis totais e lignina e menor atividade de lipoxigenases associados à resistência da soja à mancha alvo.

A resistência das plantas à infecção por patógenos pode ser influenciada por vários fatores. Dentre eles, o estágio de desenvolvimento da planta, conhecido como resistência relacionada à idade, ou resistência ontogênica. É a capacidade de plantas inteiras ou partes de plantas de resistir ou tolerar doenças quando envelhecem e amadurecem. A resistência relacionada à idade ocorre em muitas espécies de plantas e geralmente é de amplo espectro (DEVELEY-RIVIÈRE et al., 2007). Na cultura da videira, as folhas mais velhas apresentam maior resistência ao oídio do que as mais novas (STEIMETZ et al., 2012).

Owen et al. (2013) descreveram que a maior perda de rendimento na cultura da soja, é observada com o desfolhamento do estrato superior da planta em comparação com os estágios R3 e R5 do estrato inferior da planta. Considerando a predominância de lesões nos folíolos do trifólio superior, tecidos foliares jovens, mais tenros, as medidas de manejo devem ser tomadas para que estas folhas mais jovens apresentem maior resistência ao patógeno.

Quanto à incidência de *C. cassiicola* nos tecidos vegetais dos cultivares de soja, pode-se observar lesões do fungo nos pecíolos, haste, folhas unifolioladas e cotilédones, além das folhas. Os sintomas coincidem com os descritos por Kurt (2004) em plantas de tomate infectadas por *C. cassiicola*, onde o autor identificou manchas amarronzadas e alongadas. As manchas visualizadas nos pecíolos e haste das plantas foram principalmente lesões marrons escuro, manchas alongadas e levemente deprimidas.

Além dos sintomas, foram observadas estruturas reprodutivas do fungo nas duas faces das folhas unifolioladas, coincidindo com o descrito por Mello (2009), onde a produção de esporos do fungo ocorre nas duas faces das folhas, mas menos abundantes na face abaxial. Outro órgão vegetativo que apresentou sintomas e sinais de estruturas reprodutivas do fungo, foi o cotilédone. Almeida et al. (2005) e Campos et al. (2008) descreveram que a disseminação do fungo *C. cassiicola* que pode contribuir para o

aumento de inóculo na área, é por meio da produção de conídios provenientes de lesões primárias em cotilédones e hipocótilo

A incidência de lesões nos pecíolos aumentou conforme diminuiu a altura em que o pecíolo estava na haste principal. Develey-Rivière et al. (2007) descreveram que a eficiência da infecção está relacionada com o estágio de desenvolvimento do tecido hospedeiro em muitas interações planta-patógeno, aumentando o desenvolvimento de patógenos e da suscetibilidade dos tecidos da planta.

Os mecanismos de resistência envolvidos na resistência relacionada à posição do dossel, ainda uma questão de especulação, diferem daqueles envolvidos na resposta à infecção em sistemas de defesa clássicos (GEE et al., 2008). Nosso estudo demonstrou maior sensibilidade à infecções por *C. cassiicola*, na posição superior e inferior das plantas de soja, podendo afetar significativamente a produção.

## 8.6 CONCLUSÕES

Cinco padrões de lesões ocasionados por *C. cassiicola* ocorrem nos tecidos foliares, com sintomas que variam de pequenos pontos necróticos com halos pouco evidentes à grandes pontos necróticos com grandes halos cloróticos.

Existem variações nos sintomas ocasionados por *C. cassiicola*, relacionados ao isolado e cultivar de soja. Sintomas mais severos e capazes de ocasionar desfolha são frequentes para os isolados ISO 1S, ISO 4S e ISO 11S. Os cultivares BMX Elite IPRO, BRS 284, BMX Garra IPRO e Nidera 5909 RG, apresentam as maiores porcentagens de folhas com lesões severas. Menor severidade ocorre nos trifólios na posição média das plantas de soja.

Lesões em cotilédones, folhas unifolioladas, pecíolos e hastes das plantas são verificadas em todos os cultivares.

A frequência com que ocorrem sintomas nos pecíolos das plantas varia conforme o isolado de *C. cassiicola*. O isolado ISO 4S ocasiona maior incidência de lesões nos pecíolos em relação aos isolados ISO 2A e ISO 2S.

A ocorrência de lesões em haste das plantas varia de acordo com cultivar de soja. Maior incidência de lesões em haste é observado nos cultivares BMX Potência RR e BMX Força RR em relação ao cultivar BMX Elite IPRO.

A incidência de lesões nos pecíolos, ocasionadas por *C. cassiicola*, aumenta conforme diminui a altura em que o pecíolo está inserido na haste principal.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio de cultura em que *C. cassiicola* é cultivado influencia a cor e taxa de crescimento, mas não influencia o aspecto de micélio da colônia. Os aspecto de micélio aparenta estar relacionado ao hospedeiro de origem, isolados oriundos de plantas de algodão tem micélio plano, enquanto isolados provenientes de plantas de soja tendem a apresentar micélio aéreo cotonoso. O meio Suco V8 Ágar proporciona maior taxa de crescimento para isolados de *C. cassiicola* em relação ao meio BDA. A produção de conídios por isolados oriundos de plantas de soja é equivalente ou maior quando cultivados em meio Suco V8 Ágar. As características morfológicas dos conídios de *C. cassiicola* apresentam grande variabilidade em relação aos diferentes isolados e ao meio de cultivo a que são submetidos.

A severidade e período de incubação para a mancha alvo são influenciados pelos isolados de *C. cassiicola*, cultivares de soja e posição do trifólio nas plantas. O isolado ISO 4S ocasiona maior severidade de mancha alvo, em relação aos isolados ISO 2A, ISO 2S e ISO 11S. Menor severidade da doença ocorre nos cultivares de soja BMX Potência RR, BMX Força RR e NA 5909 RG em relação ao cultivar BMX Elite IPRO. Independente do cultivar avaliado o período de incubação tende a ser maior para o isolado ISO 4S. A quantidade de lesões e o período de incubação dos diferentes isolados de *C. cassiicola* são maiores no trifólio inferior e menor no trifólio superior das plantas.

Existem variações de sintomas ocasionados por *C. cassiicola*. Neste estudo foram identificados cinco padrões de lesões. Os isolados ISO 1S, ISO 4S e ISO 11S ocasionam sintomas mais severos. Maior porcentagem de folhas com lesões ocorre para os cultivares BMX Elite IPRO, BRS 284, BMX Garra IPRO e Nidera 5909 RG. Lesões com menor severidade ocorre nos trifólios na posição média das plantas de soja. Sintomas nos cotilédones, folhas unifolioladas, pecíolos e haste das plantas foram verificados. O isolado de *C. cassiicola*, ISO 4S ocasionou a maior incidência de lesões em relação aos isolados ISO 2A e ISO 2S. Maior incidência de lesões ocorre nos cultivares BMX Potência RR e BMX Força RR em relação ao cultivar BMX Elite IPRO. A incidência de lesões nos pecíolos, aumenta conforme a posição em que o pecíolo é inserido na haste principal.

## 8 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. (2005). **Plant Pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 922p.
- AGRIOS, G. N. (1988). **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 803 p.
- AGUIAR, F. M. Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e avaliação da sensibilidade in vitro a fungicidas, **Universidade de Brasília**, 2015.
- ALMEIDA A. M. R.; FERREIRA L.; YORINORI J. et al., 2005. Doenças da soja. In: Kimati, H.; Amorim, L; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo LEA, ed. **Manual de Fitopatologia Vol II**. Piracicaba: Editora Ceres, 569–88.
- ALMEIDA, Á. M. R. et al. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1231-1238, 2001.
- ALMEIDA, A. M. R., et al. Diferenciação de isolados de *Corynespora cassiicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, vol. 29, p. 316, 1994. Suplementos.
- ALMEIDA, A. M. R.; MACHADO, C. C.; FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 111-112, 1976a.
- 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. 3, p. 203-206, 1976b.
- AMORIM, L. Avaliação de Doenças. In: BERGAMIN FILHO, A., Kimati, H. & Amorim, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda., 1995, v. 1, cap. 32, p. 645-671.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo das relações planta-patógeno. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. Cap. 4, p. 59-100.
- ANNAKUTTY, J. **Investigation on certain biochemical chances and phyllosphere microflora on *Hevea brasiliensis* as influenced by nitrogenous fertilizer application and *Corynespora cassiicola* inoculation**. Tese (Doutorado em micologia e patologia de plantas) Rubber research Institute of Índia, Índia, 1998.

- AVOZANI, A. et al. **Sensibilidade de *Corynespora cassiicola*, isolados da soja, a fungicidas in vitro.** 135f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.
- AVOZANI, A.; FERREIRA, A.S. Mancha-alvo da soja. In: REIS, E.M.; CASA, R.T. (Org.). **Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado.** Passo Fundo: Berthir, 2012. p.151-159.
- BARRETO, R. W.; EVANS, H. C.; ELLISON, C.A. The mycobiota of the weed Lantana camara in Brazil, with particular reference to biological control. **Mycological Research**, v. 99, n. 7, p. 769-782, 1995.
- BARTHE, P.; PUJADE-RENAUD, V.; BRETON, F.; GARGANI, D.; THAI, R.; ROUMESTAND, C.; DE LAMOTTE, F. Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. **Journal of Molecular Biology**, v. 367, p. 89-101, 2007.
- BEDENDO, I. P. Ambiente e doença. In: Bergamin FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia. 3 ed.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995b. Cap. 18, v. 1, p. 331-341.
- BEDENDO, I. P. Manchas Foliares. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995a. p. 848-855.
- BEDENDO, I. P.; AMORIM, L. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A (Ed.). **Manual de fitopatologia**, Piracicaba: Agronômica Ceres, v.1, p. 133-147, 2011.
- BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 561-565. 2003.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico.** Ed. Agronômica Ceres, 1996.
- BERGAMIN FILHO, A.; KRANZ, J. Epidemiologie der Pflanzenkrankheiten. Eine Einführung. Stuttgart. Ulmer. **Naturwissenschaften**, v. 72, n. 8, p. 419-426, 1996.
- BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. **Soja: tecnologia de produção II. ESALQ**, p. 1-18, 2000.
- BLAZQUEZ, C. H. Target spot. In: JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases.** St. Paul: APS Press, 1991. p. 23.
- BOGO, A.; MAFFIOLETTI, M.A.; SANHUEZA, R.M.V.; CASA, R.T. Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura. Brasília: **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 248-251, 2008.

- BOLLER, W.; FORCELINI, C.A.; HOFFMANN, L.L. Tecnologia de aplicação de fungicidas – parte 1. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 243-276, 2007.
- BOOTE, K. J. et al. Coupling pests to crop growth simulators to predict yield reductions [Mathematical models]. **Phytopathology (USA)**, 1983.
- BRAGA, M.R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008, p.305-346.
- BRETON, F.; SANIER, C.; D'AUZAC, J. Role if cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf of a fall Disease of *Hevea*. **J. Rubber Res.**, v. 3, n. 2, p. 115-128, 2000.
- CÂMARA, G. M. S. **Soja: Tecnologia da produção**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ/LVP, 2000. 450 p.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. 1. ed. New York: John Wiley, p. 532, 1990.
- CAMPOS, H. D.; SILVA, L. H. C. P.; SILVA, J. C. Fortalecida e agressiva. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, v. 114, p. 20-22, 2008.
- CAMPOS, H. D.; SILVA, L. H. C.; SILVA, J. R. C. **Guia de identificação de doenças da soja**. Rio Verde: Fesurv, 2005. 62p.
- CARNAÚBA, J.P. et al. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathol**, v. 33, p. 199-200, 2007.
- CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A. Q; SILVA, R.A. **Doenças da soja**. São Paulo: Cheminova Brasil. p. 57, 2010.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2021). **Acompanhamento da Safra Brasileira de grãos (Safra 2020-2021)**. Brasília: Conab, v. 8, n. 4. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 04 de janeiro de 2021.
- CONNER, K. N.; HAGAN, A. K.; ZHANG, L. First report of *Corynespora cassiicola*-incited target spot on cotton in Alabama. **Plant disease**, v. 97, n. 10, p. 1379-1379, 2013.
- CUTRIM, F. A., E SILVA, G. S. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* para diferentes espécies de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, 28, 193-194, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582003000200014>
- DARMONO, T. W., DARUSSAMIN, A., PAWIROSOEMARDJO, S. Variation among isolates of *Corynespora cassiicola* associated with *Hevea brasiliensis* in Indonesia. In: **Proceeding workshop on Corynespora leaf fall disease of Hevea rubber**, 16–17 December 1996, Medan, Indonesia. p. 79–91.

- DE AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas.** 1997.
- DEHNE, D. **Untersuchungen zur Resistenz von Sommerweizen gegeniiber Ge/brost (*Puccinia striiformis* West.) im Feld und unter kontrollierten Bedingungen während der Ontogenese der Wirtspjlanze.** PhD Diss. Georg-August-Univ. Gottingen, Germany. p. 200. 1977.
- DEVELEY-RIVIÈRE, Marie-Pierre; GALIANA, Eric. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. **New Phytologist**, v. 175, n. 3, p. 405-416, 2007.
- DIENER, U. L. A method for inducing abundant sporulation of *Stemphylium solani* in purê culture. **Phytopathology**, St. Paul, v. 42, p. 7 1952. Abstract.
- DIXON, L. J.; SCHLUB, R. L.; PERNEZNY, K.; DATNOFF, E. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 99, p. 1015-1027, 2009.
- ECKHARDT, H., STEUBING, L. & KRANZ, J. Das Koloniewachstum von *Erysiphe graminis* D. C. f.sp. hordei Marchal in Abhangigkeit von Temperatur and Insertionshole der Blatter. **Angewandte Botanik**, v. 58, p. 433-443, 1984.
- ELLIS, M. B. et al. *Corynespora cassiicola* [target spot]. **CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, 1971a.
- ELLIS, M. B. et al. Some species of *Corynespora*. **Mycological papers**, v. 65, 1957.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Surrey, Commonwealth Mycological Institute, p.608, 1971b.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MACCRAY, E.B. Fungal databases. **Systematic Botany & Mycology Laboratory**, USDAARS. 2009. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em 8 de junho, 2019.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungal databases**, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA, 2018. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 9 jun. 2020.
- FERNANDEZ, M. R. Manual para laboratório de fitopatologia. **Embrapa Trigo-Dокументos (INFOTECA-E)**, 1993.
- FERREIRA FILHO, A. S. **Caracterização morfológica e enzimática de isolados de *Corynespora cassiicola* e reação de cultivares de soja à mancha-alvo.** 84 p. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Agronomia) -Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 2012.

- FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, v. 33, n. 1, 1967.
- FLOR, H.H. Host parasite interactian in flax rost, its genetics and other implications. **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, p. 680-685, 1955.
- FORTUNATO, Alessandro A. et al. Enzimas relacionadas à defesa na resistência da soja à mancha-alvo. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 9, pág. 731-742, 2015.
- FREIRE, E. C. (Ed.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília, Brazil: Abrapa, 2017.
- FULMER, A.M.; WALLS, J.T.; DUTTA, B.; PARKUNAN, V.; BROCK, J.; KEMERAIT J, R, C. First report of target spot caused by *Corynespora cassiicola* on cotton in Georgia. **Plant disease**, v. 96, n. 7, p. 1066-1066, 2012.
- FUNDACRUZ. **Manual de difusión técnica de soya**. 5º edição, Bolivia: Santa Cruz, 2006, p. 84-102.
- GALBIERI, R.; Araújo, D. C.; Kobayasti, L.; Girotto, L.; Matos, J. N.; Marangoni, M. S.; ... & Mehta, Y. R. *Corynespora* leaf blight of cotton in Brazil and its management. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 26, p. 3805, 2014.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, v..2, 2012.
- GAVA, M. A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, p.2, 2002.
- GEE, C., GADOURY, D., CADLE-DAVIDSON, L. A resistência ontogênica a *Uncinula necator* varia por genótipo e tipo de tecido em uma coleção diversa de *Vitis* spp. **Plant Disease**, v. 92, n. 7, p. 1067–1073, 2008.
- GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M., MEYER, M. C., et al., Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2019/20: resultados summarizados dos ensaios cooperativos. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2020.
- GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. Efeito da severidade de oídio e crestamento foliar de cercospora na produtividade da cultura da soja. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, v. 29, n. 5, p. 526-531, 2004.
- GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C., et al. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2016/17: resultados summarizados dos ensaios cooperativos. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2017.

Godoy, C. V.; Utiamada, C. M.; Meyer, M. C.; Campos, H. D.; Pimenta, C. B.; Borges, E. P.; Siquer, F. V.; Nunes Junior, J.; Silva, L. H. C. P.; Sato, L. N.; Madalosso, M.; Volf, M. R.; Barros, R.; Balardin, R. S.; Montecelli, T. D. N.; Carlin, V. J. (2019) Eficiência de fungicidas para controle de manchas alvo, *Corynespora cassiicola*, safra 2018/19: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina PR. Embrapa Soja. (**Circular Técnica 149**).

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D. B.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; ARAUJO JR, I. P.; GRIGOLLI, J. F. F.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; MADALOSO, M.; VOLF, M. R.; BALARDIN, R. S.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2013/14: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2014.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; PIMENTA, C. B.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; MADALOSO, M.; VOLF, M. R.; BARROS, R.; BALARDIN, R. S.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2011/12: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: **Embrapa Soja, (Embrapa Soja. Circular Técnica 94)**, p. 6, 2012.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; PIMENTA, C. B.; BORGES, E. P.; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO. L. C.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; MADALOSO, M.; VOLF, M. R.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: **Embrapa Soja, (Embrapa Soja. Circular Técnica, 100)**, p. 6, 2013.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; et al. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2016b.

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M.; DIAS, W. P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V.; **Doenças da soja**. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO,

- A.; CAMARGO, L. E. A. (Org.). Manual de Fitopatologia: v. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed. p. 657- 675. 2016a.
- GOND, S. K. et al. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1371-1375, 2007.
- GOULD, A. B. Fungos fitopatogênicos e oomicetos. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**.2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 102-120p.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. New York: John Wiley, p. 458, 1993.
- Hammond-Kosack, K. E., & Parker, J. E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current opinion in biotechnology**, v.14, n. 2, p. 177-193.
- HARTWIG, E. Effect of target spot on yield of soybeans. **Plant Dis. Rep**, v. 43, p. 504, 1959.
- HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 72p. (Embrapa Soja Documentos, 256).
- HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 76p. (Documentos, 256). Disponível em: Acesso em: 9 jan. 2020
- HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.
- HUGOT, K. et al. Coordinated regulation of genes for secretion in tobacco at late developmental stages: association with resistance against oomycetes. **Plant physiology**, v. 134, n. 2, p. 858-870, 2004.
- ISLAM, W., J. ZHANG, M. ADNAN, A. NOMAN, M. ZAYNAB E Z. WU. Ecologia de vírus de plantas: um vislumbre de realizações recentes. **Appl. Ecol. Env. Res.** n.15, v.1, p. 691-705, 2017a.
- JONES, J. P. A leaf spot of cotton caused by *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 51, n. 5, p. 305-&, 1961.
- KLOSOWSKI, A. C.; BRAHM, L.; STAMMLER, G.; DE MIO, L. L. M. Competitive fitness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates with mutations in the CYP51 and CYTB genes. **Phytopathology**, v. 106, n. 11, p. 1278-1284, 2016.

- KOENNING, S. R.; CRESWELL, T. C. Increased occurrence of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in the Southeastern United States. **Plant disease**, v. 90, n. 7, p. 974-974, 2006.
- KRANZ, J.; HAU, B. Systems analysis in epidemiology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, n. 1, p. 67-83, 1980.
- KREYCI, P. F.; MENTEM, J. O. M. Limitadoras de produtividade. *Revista Cultivar, Caderno Técnico Cultivar*, v. 167, p. 1-12, 2013.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, v. 2, p. 607-629.
- KURRE, A. K.; DEWANGAN, M.; NISHAD, D. Variability among *Corynespora cassiicola* isolates causing target leaf spot disease collected from soybean growing area of Chhattisgarh. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n. 6, p. 603-606, 2019.
- KURT, S. Host-specific toxin Production by the tomate targert leaf spot pathogen *Corynespora cassiisola*. **Turk J Agric and Fores**, v. 28, p. 389-395, 2004.
- LAMARI, L.; BERNIER, C.C. Evalution of wheat lines and cultivars to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) based on lesion type. Manitoba. **Canadian Journal Plant Pathology**. v. 11, p. 49-56, 1989.
- LAMOTTE, F.; DUVIAU, M.P.; SANIER, C.; THAI, R.; PONCET, J.; BIEYSSE, D.; BRETON, F.; PUJADE-RENAUD, V. Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. **Journal Chromatografy** Biological analyst technology biomedical life science, Amsterdam, v. 849, n.1-2, p. 357-362, 2007.
- LIU, S. T. **Seed-borne diseases of soybean**. Botanical bulletin of Academia Sinica, v. 2, p. 69–80, 1948.
- LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do Tomateiro**. Brasília: CNP Hortaliças, 2005, p.151.
- LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Comportamento ambiental de agroquímicos. **Hortic. Bras.**, v. 18, p. 33-35, 2000.
- LUO, Y.; ZENG, S. M. Simulation studies on epidemics of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis*) on slow-rusting cultivars and analysis of effects of resistance components. **Plant Pathology**, v. 44, n. 2, p. 340-349, 1995.

- MA, Y. H. Development of soybean genetic and breeding research in China, pp. 15-19. In: **Proceedings of the 2nd US-China soybean symposium**. 1984.
- MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. 2007.
- MAUDE, R. B. et al. **Seedborne diseases and their control: principles and practice**. CAB international, 1996.
- MAY DE MIO, L. L; AMORIM, L. Influência de temperatura e da duração do molhamento foliar nos componentes monocíclicos da ferrugem do álamo. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 33-39, 2002.
- MEHTA, Y. R., et al. *Corynespora* Leaf Spot of Cotton in Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 131, 2005.
- MELLO, F. E. **Variabilidade genética e sensibilidade de *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum truncatum* e *Corynespora cassiicola* a fungicidas**. 2019. 232 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- MELLO, M. M. **Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiisola* em soja**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo – RS, 2009.
- MELO, M. M.; REIS, E. M. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* em soja, limiares térmicos e temperatura ótima para a germinação de conídios em meio de cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 3, p. 254-256, 2010.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. Fungos em plantas no Brasil. **Brasília: EMBRAPA/CENARGEN**, p. 569, 1998.
- MERSHA, Z., HAU, B. Efeitos recíprocos da dinâmica do hospedeiro e da doença no patossistema da ferrugem do feijão. **J Plant Dis Prot**, v. 118, p. 54–62 (2011).
- MERSHA, Z., ZHANG, S., HAU, B. Efeitos da temperatura, duração do molhamento e idade da folha na incubação e períodos latentes do bolor negro (*Pseudocercospora fuligena*) em tomates frescos. **Eur J Plant Pathol**, v. 138, p. 39–49 (2014).
- MESQUINI, R. M. **Componentes monocíclicos e quantificação de danos no patossistema *Corynespora cassiicola*-soja**. 2012. Dissertação. Universidade de São Paulo.
- MEYER, M. C.; VOLF, M. R.; TERAMOTO, A.; NUNES JUNIOR, J.; PIMENTA, C. B.; GODOY, C. V. Efeito de fungicidas no controle de mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*) em soja. In: **Resumos da XXXIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil** - Londrina, PR, 2013.

- MOLINA, J. P. E.; PAUL, P. A.; AMORIM, L.; SILVA, L. H. C. P. da; SIQUERI, F. V.; BORGES, E. P.; CAMPOS, H. D.; NUNES JUNIOR, J.; MEYER, M. C.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; CARLIN, V. J.; GRIGOLLI, J. F. J.; BELUFI, L. M. de R.; GODOY, C. V. Meta-analysis of fungicide efficacy on soybean target spot and cost–benefit assessment. **Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 94-106, 2019b.
- MOLINA, J. P. E.; PAUL, P. A.; AMORIM, L.; SILVA, L. H. C. P. da; SIQUERI, F. V.; BORGES, E. P.; CAMPOS, H. D.; VENANCIO, W. S.; MEYER, M. C.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; CARLIN, V. J.; GRIGOLLI, J. F. J.; BELUFI, L. M. de R.; NUNES JUNIOR, J.; GODOY, C. V. Effect of target spot on soybean yield and factors affecting this relationship. **Plant Pathology**, v. 68, p. 107-115, 2019a.
- MOLINA, J. P. **Yield losses of soybean due to target spot (*Corynespora cassiicola*), its genetic and chemical management.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2018.
- MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S.; et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, n.2, p.299-311, 2002.
- MULITERNO de MELO, M. **Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja.** 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Passo Fundo) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.
- MUNSELL SOIL COLOR COMPANY. **Munsell soil color charts**, Baltimore, 1975.
- MUSHRIF, S. K. Morphology, physiology and survival of *Corynespora cassiicola* (Bert.&Curt.) Wei. In: K Jacob, editor. ***Corynespora* leaf disease of *Hevea brasiliensis*. Strategy for management.** Rubber Research Institute of India; 2006. p. 26–32.
- NEGRI, R. C.; MARCHESE, J. A.; SANTIM, T. B SEBIM, D. M. Cinéticas de enzimas antioxidante em plantas de soja tratadas com indutores de resistência. Anais. **XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR.** p.163-172. 2012.
- NEUMAIER, Norman et al. **Estadios de desenvolvimento da cultura de soja. Embrapa Soja**-Capítulo em livro científico (ALICE), 2000.
- NGHIA, N. A.; KADIR, J.; SUNDERASAN, E.; ABDULLAH, M. P.; MALIK, A.; NAPIS, S. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora Cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, v. 166, p. 189-201, 2008.

- NUTTER, F. F. W. The role of plant disease epidemiology in developing successful integrated disease management programs. In: **General concepts in integrated pest and disease management**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 45-79.
- OLIVE, L. S.; BAIN, D.C.; LEFEBVRE, C. L. A leaf spot of cowpea and soybean caused by an undescribed species of *Helminthosporium*. **Plant Phytopatology**, St. Paul, v. 35, p. 822 – 831, 1945.
- OLIVEIRA, R. R. et al. Chlamydospore formation by *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 6, p. 415-418, 2012.
- OLIVEIRA, R. R., VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J.; AGUIAR, B. de M. A.; CAIXETA, M. P.; BARBOZA, A. L. Patogenicidade de isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. **Summa phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 297-299, 2007.
- OWEN, L. N. et al. Impact of defoliation on yield of group IV soybeans in Mississippi. **Crop Protection**, v. 54, p. 206-212, 2013.
- PASSOS, J. L.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; BARRETO, R. W.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSSEN, B. Effects of *Corynespora cassiicola* on Lantana camara. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 2, p. 229-237, 2010.
- PEREIRA, J.M.; BARRETO, R.W.; ELLISON, C.A.; MAFFIA, L.A. *Corynespora cassiicola* f. sp. *Lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for Lantana camara. **Biological Control**, v. 26, p. 21-31, 2003.
- PERES, A.P.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1053-1062, 2003.
- PERNEZNY, K.; SIMONE, G.W. Target spot of several vegetable crops. **Plant Pathology**, London, UK, v. 39, n. 1, p. 39-43, 1993.
- PHILLIPS, V.D. Fungal Leaf Spots IN: COLYER, P.D. **Soybean disease atlas**. 2º edição. Louisiana: Louisiana State University, 1989.
- PLOPER, L. D., GONZALEZ, V., HECKER, L., DE LISI, V., DEVANI, M.R., Evolución, situación actual y manejo de la mancha anillada de la soja en el noroeste Argentino. In: **Libro de trabajos científicos—MERCOSOJA 2011—Quinto Congreso de la Soja del MECOSUR y Primer Foro de la Soja Asia—MERCOSUR**. 2011.
- PROMPUTTHA, I.; Lumyong S.; Dhanasekaran, V.; McKenzie, E. H. C.; Hyde, K. D.; Jeewon, R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial ecology**, v. 53, n. 4, p. 579-590, 2007.

QI, Y.X.; ZHANG, X.; PU, J.J.; LIU, X.M.; LU, Y.; ZHANG, H. Q. & XIE, Y. X. 2011. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, n. 1, p. 83-95, 2011.

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Austria: **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAFFEL, S. J., KAZMAR, E. R., WINBERG R., et al., First report of root rot of soybeans caused by *Corynespora cassiicola* in Wisconsin. **Plant Disease**, v. 83, p. 696. 1999.

RASBAND, W. S. ImageJ: Image processing and analysis in Java. **ascl**, p. ascl: 1206.013, 2012.

REIS, E. M., REIS, A. C; FORCELINI, C. A. **Manual de fungicidas: guia para o controle de doenças de plantas**. 5. Ed. p. 153. 2007.

RIBEIRO, F. C., et al. Chemical control of the soybean target spot (*Corynespora cassiicola*), in the cerrado of Tocantins, Brazil. **Journal of bioenergy and food science**, v. 4.1, p. 26-36, 2017.

RIBEIRO, M. C.; STELATO, M. M. **Microbiologia prática: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica: bactérias, fungos e vírus**. Atheneu, 2011.

SACHE, I.; DE VALLAVIEILLE-POPE, C. Comparison of the wheat brown and yellow rusts for monocyclic sporulation and infection processes, and their polycyclic consequences. **Journal of phytopathology**, v. 138, n. 1, p. 55-65, 1993.

SAKAMOTO, C. M., SHAW, R H. Distribuição de luz em dosséis de soja de campo 1. **Agronomy Journal**, v. 59, n. 1, pág. 7-9, 1967.

SANTOS, I.P.; CARDOSO, S.S.; POLTRONIERI, L.S.; VERZIGNASSI, J.R.; BENCHIMOL, R.L. Ocorrência de mancha alvo, causada por *Corynespora cassiicola*, em alface cultivado em hidroponia no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 420-420, 2007.

SCHAPER, P. Die Bedeutung der Inkubationszeit mr die Züchtung Krautfaule resistenter Kartoffelsorten. **Pflanzenzucht**. v. 30, p. 292-99, 1951.

SCHMITZ, H. K.; MEDEIROS, C. A.; CRAIG, I. R.; STAMMLER, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, v. 70, n. 3, p. 378-388, 2014.

- SEAMAN, W. L., SHOEMAKER, R.A., PETERSON, E.A. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* on soybean. **Canadian Journal Botany**, Guelph, vol. 43, p. 1461 – 1469, 1965.
- SHIMOMOTO, Y. et al. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. **Plant pathology**, v. 60, n. 2, p. 253-260, 2011.
- SHIMOMOTO, Y.; ADACHI R.; MORITA Y.; YANO K.; KIBA, A.; KIKICHI, Y.; TAKEUCHI, S. *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. **Journal of general plant pathology**, v. 74, n. 4, p. 335-337, 2008.
- SILVA, G. S.; RODRIGUES, A. A. C.; SOARES JÚNIOR, A. C. Mancha de *Corynespora* em acerola (*Malpighia glabra*). **Fitopatologia brasileira**, v. 22, n. 3, 1997.
- SILVA, J. F. V. et. al. Contribuição ao desenvolvimento de linhagens de soja com resistência a patógenos. **Embrapa Soja-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2002.
- SILVA, W. P. K.; MULTANI, D. S.; DEVERALL, B. J.; LYON, B. R. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 43, n. 6, p. 609-618, 1995.
- SILVA, W. P. K.; MULTANI, D. S.; DEVERALL, B. J.; LYON, B.R. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. **Australian Journal of Botany**, v. 34, p. 609 – 618, 2008.
- SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean diseases**. American Phytopathological Society, 1989.
- SMITH, Linley Joy. Host range, phylogenetic and pathogenic diversity of *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. **A Dissertation Presented to The Graduate School of The University of Florida in Partial Fullfillment of The Requirements for The Degree of Doctor of Philosophy University of Florida**, 2008.
- SNOW, J. P., BERGGREN JR, G. T. **Target spot: In: Compendium of soybean diseases**. 3. Ed. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 1989, p. 27-28.
- SOUSA, F.M.G.; BENTES, J.L.S. Variability of *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei isolates from Amazonas, in culture media. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 84-87, 2014.
- SPENCER, J. A.; WALTERS, H. J. Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 59, n. 1, p. 58, 1969.
- STEIMETZ, Emilie et al. Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 79, p. 89-96, 2012.

SUMABAT, L.G.; KEMERAIT JR, 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**, v. 108, n. 7, p. 892-901, 2018.

TAI, F. L. **Notes on Fungi. VII.** Bulletin of the Chinese Botanical Society v. 2, p. 45–66, 1936.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA – **Região Central do Brasil 2014**, Londrina: Embrapa Soja, p. 268. 2013.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA. **Sistemas de Produção 17 – Londrina: Embrapa Soja.** n. 17, p. 347, 2020.

TENG, S. C. et al. A Contribution to Our Knowledge of the Higher Fungi of China. **A Contribution to Our Knowledge of the Higher Fungi of China.**, 1939.

TERAMOTO, A. et al. Caracterização morfológica, fisiológica, isoenzimática e controle de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berky & Curt) Wei, agente causal da mancha alvo. 2008.

TERAMOTO, A.; et al. In vitro sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 4, p. 281-289, 2017.

TERAMOTO, A.; PARISI, M.; CUNHA, M. G. Caracterização fisiológica de isolados de *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 313-322, 2013b.

TERAMOTO, A. et al. Reação de cultivares de soja à *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 68-71, 2013a.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro no Estado de Santa Catarina e reação de genótipos à *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 34-41, 2006.

THORMANN, M. N.; CURRA, R. S.; BAYLEY, S. E. The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbono substrates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 204-211, 2000.

TIVOLI, B., CALONNEC, A., RICHARD, B., NEY, B. E ANDRIVON, D. Conhecimento atual sobre características arquitetônicas de plantas / dossel que reduzem a expressão e o desenvolvimento de epidemias. EUR. J. **Plant Pathology**. n. 135, p. 471-478. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0066-6>

- UPCHURCH, R. G., RAMIREZ, M. E. (2010). Defense-related gene expression in soybean leaves and seeds inoculated with *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 75, n. 1-2, p. 64-70.
- VAN DER PLANK, J. E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. New York & London. Academic. p.349, 1963.
- VAN DER PLANK, J. E. **Plant Diseases-Epidemics and Control Academic Press New York**. 1963.
- VAN DER ZAAG, D. D. Some observations on breeding for resistance to *Phytophthora infestans*. **European potato journal**, v. 2, p. 278-87, 1959.
- VEIGA, P. Mancha Alvo: uma nova doença da soja no Rio Grande do Sul. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 8, n. 1, 2008.
- VENTURINI, M. T.; SANTOS, L. C.; SANTOS, T. R.; LUZ, E. D. M. N. Infecção natural por *Corynespora cassiicola* em acessos de mamoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.3, p.284-287, 2014.
- WEI, C. T. et al. Notes on *Corynespora*. **Mycological papers**, v. 34, 1950.
- XAVIER, S. A.; CANTERI, M. G.; BARROS, D. C. M.; GODOY, C. V. Sensitivity of *Corynespora cassiicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole. **Tropical plant pathology**, v. 38, n. 5, p. 431-435, 2013.
- YAN-XIANG, Q.; XIN, Z.; JIN-JI, P.; XIAO-MEI, L.; YING, L.; HE, Z.; HUI-QIANG, Z.; YAN-CHAO, L.; YI-XIAN, X. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, n.1, p. 83-95, 2011.
- YORINORI, J. T. Epidemia de mancha alvo (*Corynespora cassiicola*) na cultivar FT-Estrela na safra 1996/97. In: **XVIII Reunião de Pesquisa Soja da Região Central do Brasil**, Uberlândia, p. 319, 1996.
- YORINORI, J. T. Levantamento e avaliação da situação de doenças na safra 1986/87. In: **Resultados de Pesquisa de soja 1986/87**. Londrina, Embrapa – CNPSO, 1988, p.158.
- YORINORI, J.T. Levantamento e avaliação da situação de doenças da soja na safra 1987/88. In: **Resultados de Pesquisa de soja, 1987/88**. Londrina: Embrapa Soja, p.158, 1989.
- ZADOKS, J. C. Systems analysis and the dynamics of epidemics. **Phytopathology**, v. 61, n. 6, p. 600-610, 1971.
- ZADOKS, J. C.; SCHEIN, R. D. Epidemiology and plant disease management. **Epidemiology and plant disease management**., 1979.