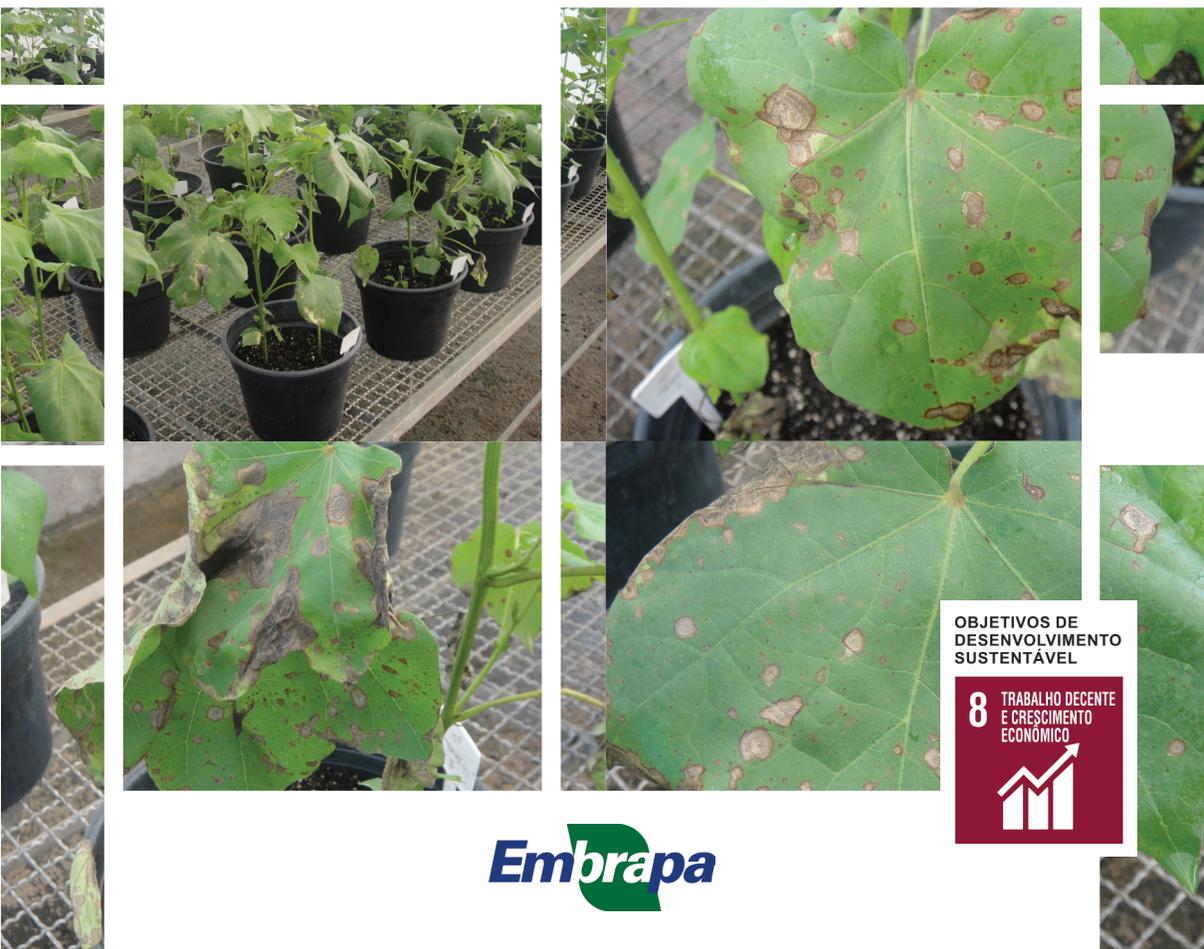


## Metodologia para inoculação de *Corynespora cassicola* em algodoeiro



OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

8 TRABALHO DECENTE  
E CRESCIMENTO  
ECONÔMICO





**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Algodão  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
104**

Metodologia para inoculação de  
*Corynespora cassiicola* em algodoeiro

Wilton Macedo Coutinho  
Alderí Emídio de Araújo

**Embrapa Algodão**  
Campina Grande, PB  
2020

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Algodão**  
Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário  
CEP 58428-095, Campina Grande, PB  
Fone: (83) 3182 4300  
Fax: (83) 3182 4367  
www.embrapa.br/algodao  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Algodão

Presidente  
*João Henrique Zonta*

Secretário-Executivo  
*Valdinei Sofiatti*

Membros  
*Alderí Emídio de Araújo, Ana Luíza Dias  
Coelho Borin, José da Cunha Medeiros,  
Marcia Barreto de Medeiros Nóbrega, João  
Luís da Silva Filho, Liziane Maria de Lima,  
Sidnei Douglas Cavalieri*

Supervisão editorial  
*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

Revisão de texto  
*Ivanilda Cardoso da Silva*

Normalização bibliográfica  
*Rejane Maria de Oliveira*

Tratamento das ilustrações  
*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

Fotos da capa  
*Wirton Macedo Coutinho*

**1ª edição**  
Formato PDF digitalizado: 2020

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Algodão

---

Metodologia para inoculação de *Corynespora cassiicola* em algodoeiro/ Wirton  
Macedo Coutinho, Alderí Emídio de Araújo. – Campina Grande : Embrapa  
Algodão, 2020.

PDF (21 p.) – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Algodão,  
ISSN 0103-0841, 104)

1. Algodão. 2. Mancha alvo. 3. Caracterização da resistência. 4. Doença de  
planta. I. Título. II. Série.

CDD (21. ed.) 632

---

*Rejane Maria de Oliveira* (CRB-1/2913)

© Embrapa, 2020

## Sumário

---

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos .....	8
Resultados e Discussão .....	13
Conclusões.....	18
Agradecimentos.....	19
Referências .....	19



# Metodologia para inoculação de *Corynespora cassiicola* em algodoeiro

Wirton Macedo Coutinho<sup>1</sup>

Alderí Emídio de Araujo<sup>2</sup>

**Resumo** – Neste trabalho é descrito um método para inocular *Corynespora cassiicola* em plantas de algodoeiro. Testes foram realizados para avaliar os efeitos da temperatura na germinação dos conídios e no crescimento micelial do patógeno *in vitro*, além de testes *in vivo* em que foram avaliados temperatura, tempo de molhamento foliar e concentração de inóculo eficazes à infecção. O estágio de crescimento da planta de algodoeiro e a sua influência no sucesso da inoculação também foram avaliados neste estudo. O método proposto fornece resultados precisos e reprodutíveis para identificar a resistência/suscetibilidade de algodoeiros inoculados artificialmente com *C. cassiicola* em ambiente controlado.

**Termos para indexação:** mancha alvo, algodoeiro, caracterização da resistência.

---

<sup>1</sup> M.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.

<sup>2</sup> D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.

# A method to inoculate *Corynespora cassiicola* on cotton plants

**Abstract** – This work describes a method for inoculating *Corynespora cassiicola* in cotton plants. Tests *in vitro* and *in vivo* were carried out to evaluate the effects of temperature on the germination of the conidia and on the mycelial growth of the pathogen, as well as temperature, leaf wetness and inoculum concentration effective to disease infection. The growth stage of the cotton plant and its influence on the success of the inoculation were also evaluated in this study. The proposed method provides accurate and reproducible results to identify resistance/susceptibility of cotton plants artificially inoculated with *C. cassiicola* in a controlled environment.

**Index terms:** cotton, target spot.

## Introdução

---

*Corynespora cassiicola* (Berk. & Curtis) Wei, agente etiológico da mancha alvo do algodoeiro, é um fungo polífago que ataca cerca de 530 espécies vegetais de 380 gênero de plantas (Smith, 2008; Dixon et al., 2009). Esse fungo infecta folhas, flores, caule e raízes de várias espécies de plantas em regiões tropicais e subtropicais (Farr et al., 2009).

Esse patógeno foi primeiro identificado em algodoeiro nos Estados Unidos, em 1959, no estado do Mississippi (Jones, 1961), causando lesões nas folhas, frutos e caule. Em anos recentes, o patógeno tem se disseminado em diferentes áreas de produção nos Estados Unidos, sendo reportado como um problema potencial à produção de algodão naquele país (Fulmer et al., 2012; Butler et al., 2016).

No Brasil, a mancha alvo do algodoeiro, causada por *C. cassiicola*, foi primeiro relatada, em 1995, no estado de Mato Grosso, sendo que os primeiros relatos de danos significativos à produção ocorreram no ano agrícola de 2004-2005 em campos cultivados com a cultivar CNPA ITA 90 (Mehta, 2005). Atualmente, esse fungo é encontrado em praticamente todas as regiões de cultivo de algodão no Brasil, infectando um grande número de plantas, inclusive a planta de soja, que é utilizada comumente em rotação com o cultivo do algodoeiro nessas áreas de produção.

O agente causal da mancha alvo do algodoeiro pode sobreviver em restos de cultura e sementes infectadas, sendo essa, provavelmente, uma forma de disseminação do mesmo. Nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil as condições de temperatura e umidade são favoráveis ao desenvolvimento de *C. cassiicola*.

*Corynespora cassiicola* pode infectar toda a parte aérea da planta de algodoeiro. Nos cotilédones os sintomas são pequenas lesões circulares, enquanto no hipocótilo as lesões podem causar morte da plântula. Nas folhas a doença é caracterizada por lesões foliares irregulares concêntricas, na forma de anel, contidas dentro de outras lesões que variam em coloração de marrom claro a marrom escuro. Embora o tamanho e o número de lesões variem substancialmente, as lesões são comumente maiores que 0,5 cm em diâmetro. Em casos severos, as lesões coalescem, causando necroses severas, seguidas por uma senescência prematura e morte da folha. Durante a frutificação, as maçãs do terço inferior da planta podem ser mais facilmente

infectadas do que aquelas formadas no terço superior da planta, provavelmente devido à maior umidade e a presença de inóculo do patógeno no solo. Maças severamente infectadas podem produzir sementes contaminadas com o patógeno (Galbieri et al., 2014).

Várias estratégias são recomendadas para o controle da doença, como o tratamento de sementes com fungicidas, rotação/sucessão com culturas não hospedeiras do patógeno, e pulverizações com fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Apesar destas recomendações de controle e da importância cada vez maior dessa doença, existem poucas informações disponíveis a respeito da eficácia de fungicidas no controle efetivo da doença, assim como não existem informações a respeito de cultivares de algodoeiro resistentes ao agente causal da mancha alva do algodoeiro. Neste contexto, a importância de testar rotineiramente materiais genéticos quanto à resistência à *C. cassiicola*, vem acompanhada da necessidade de ferramentas adequadas para seleção de materiais genéticos resistentes a esse fungo.

Sabendo-se da dificuldade de simular as condições adequadas para se testar rotineiramente materiais genéticos quanto à resistência à *C. cassiicola* em condições de campo, propõe-se neste trabalho uma metodologia eficaz para inoculação desse fungo que possibilite a caracterização de genótipos de algodoeiro quanto à resistência a esse fungo em ambiente controlado, proporcionando resultados acurados, precisos e reproduzíveis.

Para obtenção desta metodologia foram realizados ensaios de modo a testar temperaturas, tempos de molhamento foliar e concentrações de inóculo eficazes à infecção. O estágio de crescimento da planta de algodoeiro e a sua influência no sucesso da inoculação também foi avaliado neste estudo.

## Material e Métodos

---

### **Germinação conidial e crescimento micelial *in vitro* de *C. cassiicola* em função de diferentes temperaturas**

Foram utilizados três isolados de *C. cassiicola* (CNPA-0742, CNPA-0745, CNPA-0748), pertencentes à Coleção de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão. Os isolados fúngicos (Tabela 1) foram cultivados em pla-

cas de Petri contendo meio de BDA (Batata - Dextrose - Ágar) e incubados em câmara BOD, durante 10 dias.

Para avaliação da germinação conidial de *C. cassiicola* nas diferentes temperaturas testadas, preparou-se, inicialmente, a suspensão de conídios de cada isolado do patógeno. Foram utilizados 10 mL de água destilada esterilizada e duas gotas de tween 80 por placa de Petri contendo BDA com as colônias dos isolados fúngicos crescidos. Utilizando-se uma alça de Drigalsky, os conídios foram liberados das colônias. As suspensões resultantes foram filtradas em gaze esterilizada.

Para o teste da germinação conidial, alíquotas de 100 µL das suspensões resultantes de cada isolado, na concentração de  $1 \times 10^4$  esporos/mL, foram distribuídas em lâminas de microscopia escavadas, e incubadas em câmaras do tipo BOD, ajustadas às temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, durante 10 horas em escuro contínuo. A avaliação da germinação dos conídios foi realizada após 10 horas de incubação. As lâminas foram fotografadas, utilizando-se microscópio óptico, e a germinação conidial foi avaliada com o auxílio do software ImageJ. Foram considerados como germinados, conídios com tubo germinativo de tamanho igual ou maior que a sua dimensão.

Na avaliação de crescimento micelial, foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio de BDA. No centro de cada placa, foi colocado um disco de 0,5 cm com micélio dos diferentes isolados de *C. cassiicola*. As placas com o inóculo dos isolados fúngicos foram incubadas em câmaras do tipo BOD ajustadas às diferentes temperaturas - 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C - e fotoperíodo de 12 horas, por um período de oito dias. Após oito dias de incubação, foi mensurado o diâmetro médio das colônias fúngicas.

**Tabela 1.** Isolados de *C. cassiicola* utilizados no estudo.

Identificador	Espécie	Hospedeiro/ substrato	Origem
CNPA-0742	<i>Corynespora cassiicola</i>	Algodoeiro	Luziânia – GO
CNPA-0745	<i>Corynespora cassiicola</i>	Algodoeiro	Primavera do Leste – MT
CNPA-0748	<i>Corynespora cassiicola</i>	Algodoeiro	Campo Verde – MT
CNPA-0769	<i>Corynespora cassiicola</i>	Algodoeiro	Campo Novo do Parecis – MT
CNPA-0792	<i>Corynespora cassiicola</i>	Algodoeiro	Sorriso – MT

O delineamento experimental utilizado, tanto para a germinação conidial quanto para o crescimento micelial, foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (isolados) x 5 (temperaturas). Foram utilizadas três repetições para cada tratamento. Na avaliação da germinação conidial, em razão de não haver homocedasticidade de variâncias e distribuição dos erros experimentais, as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se modelos generalizados no sistema estatístico R (R Core Team, 2017). A variável resposta refere-se à proporção de germinação de conídios. Em razão dos resíduos terem distribuição binomial, foi ajustado um modelo linear generalizado com a função ligadora canônica *logit*. A análise de *deviance* (testes de razão de verossimilhanças para as fontes de variação controladas no modelo) foi realizada de forma sequencial. A proporção foi estimada utilizando a fórmula:  $p = [\exp(n_{jj}) / 1 + \exp(n_{jj})]$ .

### **Concentração de inóculo de *C. cassiicola* e tempo de molhamento foliar para detecção dos sintomas da mancha alvo em plantas de algodoeiro**

Neste ensaio, uma mistura de cinco isolados de *C. cassiicola* (CNPA-0742, CNPA-0745, CNPA-0748, CNPA-0762 e CNPA-0769), pertencentes à Coleção de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão foi utilizada como inóculo (Tabela 1). Os isolados fúngicos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de BDA (Batata - Dextrose - Ágar) e incubados em câmara BOD, durante 10 dias. A suspensão de esporos foi obtida adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada em cada uma das placas de Petri com os cinco isolados crescidos. Os conídios foram liberados das colônias com o auxílio de uma alça de Drigalsky, e a suspensão resultante filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada. A suspensão de esporos foi inicialmente ajustada para  $1 \times 10^5$  esporos/mL, com o auxílio de hemacitômetro, e, por meio de diluições em série, essa suspensão foi utilizada para ajustar as suspensões nas concentrações de  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  esporos/mL utilizadas neste ensaio.

Plantas de algodoeiro da cultivar FM944 GL, suscetível à *C. cassiicola*, foram cultivadas em vasos plásticos (duas plantas por vaso) com capacidade para 3 litros, contendo uma mistura de turfa e vermiculita na proporção de 3:1 (v/v). Quando as plantas atingiram o estágio V5 - cinco folhas verdadeiras

(Elsner et al., 1979) foram inoculadas por atomização com as suspensões de esporos de *C. cassiicola* ajustadas para  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  esporos/mL até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram envolvidas em sacos de polietileno e levadas para câmara de incubação ajustada à temperatura de 25°C em escuro contínuo. Transcorridos os tempos de 0, 12, 24, 48 e 72 horas de molhamento foliar, os sacos de polietileno foram removidos, e as respectivas plantas receberam um jato de ar, por meio de um ventilador, para interromper o molhamento foliar. Todas as plantas foram mantidas na câmara de incubação até a retirada do conjunto de plantas submetidas ao tempo de 72 horas. Logo após, as plantas foram levadas para casa-de-vegetação com controle de umidade (aproximadamente 80%), para evitar o ressecamento das lesões, onde permaneceram por oito dias. Após esse período, foi realizada a avaliação da doença, utilizando-se a escala desenvolvida por Fantin et al. (2018).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 5 (tempos de molhamento foliar) x 4 (concentrações de inóculo). Foram utilizadas três repetições para cada tratamento. Em razão de não haver homocestacidade de variâncias, as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se modelos generalizados no sistema estatístico R (R Core Team, 2017). A variável resposta refere-se à proporção de área foliar lesionada com a doença. Em razão dos resíduos terem distribuição binomial, foi ajustado um modelo linear generalizado com a função ligadora canônica *logit*. A análise de *deviance* (testes de razão de verossimilhanças para as fontes de variação controladas no modelo) foi realizada de forma sequencial. A proporção foi estimada utilizando a fórmula:  $p = [\exp(n_{jj}) / 1 + \exp(n_{jj})]$ .

## **Temperatura e tempo de molhamento foliar para detecção dos sintomas da mancha alvo em plantas de algodoeiro**

Neste ensaio, uma mistura de cinco isolados de *C. cassiicola* (CNPA-0742, CNPA-0745, CNPA-0748, CNPA-0762 e CNPA-0769), pertencentes à Coleção de Microrganismos Fitopatogênicos da Embrapa Algodão, foi utilizada como inóculo (Tabela 1). Os isolados fúngicos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de BDA (Batata - Dextrose - Ágar) e incubados em câmara BOD, durante 10 dias. A suspensão de esporos foi preparada adicionando 20 mL de água destilada esterilizada em cada uma das placas de Petri

com os cinco isolados crescidos. Os esporos foram liberados das colônias com o auxílio de uma alça de Drigalsky, e a suspensão resultante filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada. A suspensão de esporos foi ajustada para  $1 \times 10^5$  esporos/mL, com o auxílio de hemacitômetro.

Plantas de algodoeiro da cultivar FM944 GL, suscetível à *C. cassiicola*, foram cultivadas em vasos plásticos (uma planta por vaso) com capacidade para 1 litro, contendo uma mistura de turfa e vermiculita na proporção de 3:1 (v/v). Quando as plantas atingiram o estágio V2 - duas folhas verdadeiras (Elsner et al., 1979) foram inoculadas por atomização com as suspensões de esporos de *C. cassiicola* ajustadas para  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup> até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram envoltas em sacos de polietileno e levadas para câmaras de incubação ajustada às temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C em escuro contínuo. Transcorridos os tempos de 0, 12, 24, 48 e 72 horas de molhamento foliar, os sacos de polietileno foram removidos, e as respectivas plantas receberam um jato de ar, por meio de um ventilador, para interromper o molhamento foliar. Todas as plantas foram mantidas na câmara de incubação até a retirada do conjunto de plantas submetidas ao tempo de 72 horas. Logo após, as plantas foram levadas para casa-de-vegetação com controle de umidade (aproximadamente 80%), para evitar o ressecamento das lesões, onde permaneceram por oito dias. Após esse período, todas as folhas das plantas foram digitalizadas, e o cálculo da área total e área foliar lesionada realizado por meio de macros desenvolvidos especialmente para este estudo, utilizando-se o software ImageJ.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 (temperaturas) x 5 (tempos de molhamento foliar). Foram utilizadas três repetições de cada tratamento. Em razão de não haver homocedasticidade de variâncias, as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se modelos generalizados no sistema estatístico R (R Core Team, 2017). A variável resposta refere-se à proporção de área lesionada com a doença. Em razão dos resíduos terem distribuição binomial, foi ajustado um modelo linear generalizado com a função ligadora canônica *logit*. A análise de *deviance* (testes de razão de verossimilhanças para as fontes de variação controladas no modelo) foi realizada de forma sequencial. A proporção foi estimada utilizando a fórmula:  $p = [\exp(n_{jj}) / (1 + \exp(n_{jj}))]$ .

## Resultados e Discussão

---

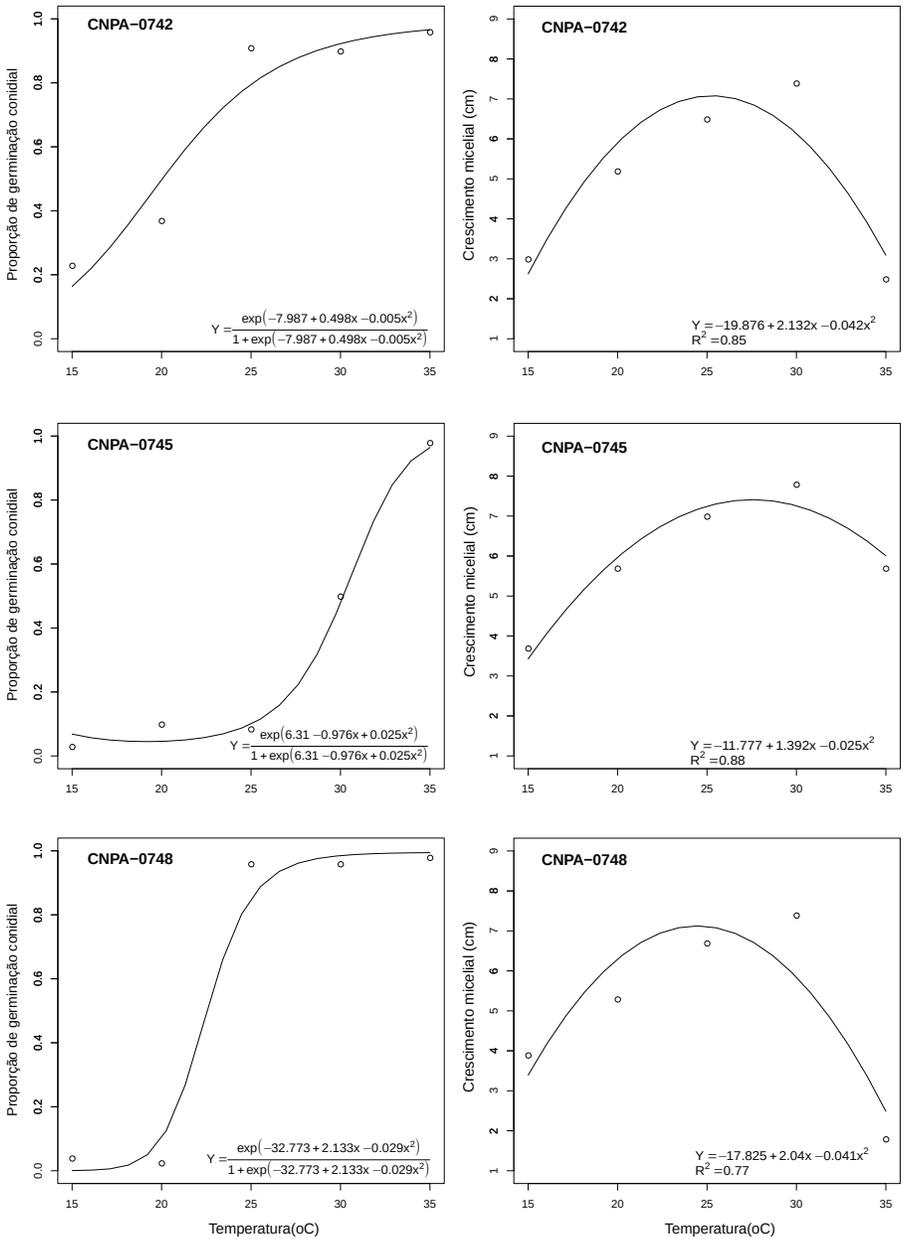
### **Germinação conidial e crescimento micelial *in vitro* de *C. cassiicola* em função de diferentes temperaturas**

Houve efeitos significativos da interação entre isolados e temperaturas ( $p < 0,05$ ), tanto para germinação conidial quanto para o crescimento micelial. Os três isolados de *C. cassiicola* testados tiveram comportamentos distintos de germinação conidial em relação às diferentes temperaturas testadas (Figura 1). Os maiores valores de germinação conidial dos isolados CNPA-0742 e CNPA-0748 foram observados nas temperaturas acima de 25°C, enquanto no isolado CNPA-0745 só foram observados valores altos de germinação conidial em temperaturas superiores a 30°C.

Em relação ao crescimento micelial *in vitro*, embora verificadas diferenças significativas entre os isolados testados, o comportamento dos mesmos foi semelhante. Todos os isolados tiveram um crescimento micelial maior em temperaturas que variaram entre 25°C e 30°C, com declínio a partir de 35°C, o que difere do que ocorreu na germinação conidial onde houve uma maior germinação conidial em temperaturas próximas a 35°C, o que pode estar relacionado ao fato dos conídios terem germinados mais nesta temperatura, mas terem um menor alongamento do seu tubo germinativo, quando comparados com aqueles germinados nas temperaturas compreendidas entre 25°C e 30°C.

Em campo (condições naturais) a variação de temperatura, que ocorre normalmente durante o ciclo de infecção e colonização do patógeno, pode favorecer ainda mais a doença. Temperaturas próximas de 35°C favoreceriam a germinação do patógeno, enquanto temperaturas mais amenas (entre 25°C e 30°C) favoreceriam à sua colonização no algodoeiro. Nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil, esse espectro de temperatura (temperaturas entre de 25°C e 35°C) é muito comum, principalmente durante os dias.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o fato que, mesmo nas temperaturas de 15°C e 35°C, as quais poderiam ser consideradas como limitrófes, ainda houve crescimento do fungo, assim como esporulação do patógeno (dados não mostrados). Em muitos casos, temperaturas extremas



**Figura 1.** Estimativa para probabilidade de germinação conidial e crescimento micelial de três isolados de *Corynespora cassicola* submetidos a diferentes temperaturas.

ou limítrofes são responsáveis por aumentar o tempo para iniciar uma epidemia ou ainda atuar de maneira direta nos seus componentes, como por exemplo, aumentando o período latente e de incubação (Rotem, 1978).

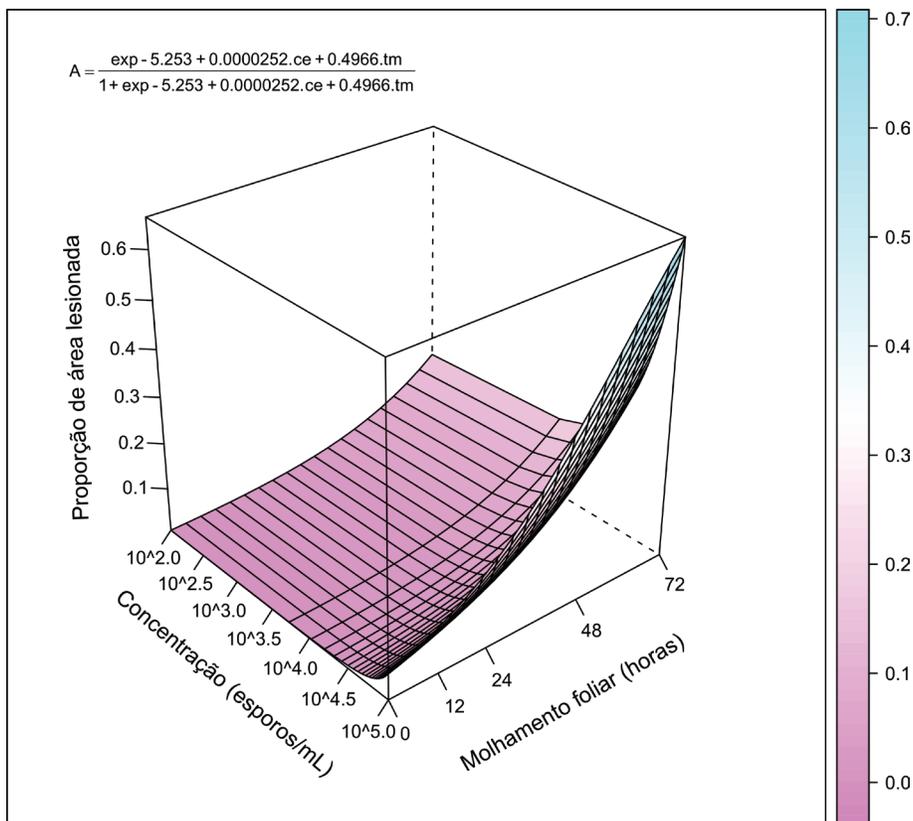
Neste ensaio os isolados não se comportaram da mesma maneira em relação às duas variáveis estudadas, com temperaturas diferentes observadas principalmente em relação à germinação dos isolados testados. No entanto, isso pode ser explicado pelas próprias características intrínsecas desses isolados. Sendo a temperatura uma das principais variáveis climáticas responsáveis pela infecção e posterior colonização do patógeno (Rotem, 1978; Campbell; Madden, 1990), essa variabilidade pode estar relacionada com a alta capacidade de adaptação climática desses isolados.

### **Concentração de inóculo de *C. cassiicola* e tempo de molhamento foliar para detecção dos sintomas da mancha alvo em plantas de algodoeiro**

Neste ensaio avaliaram-se os efeitos da concentração de esporos de *C. cassiicola* e de tempos de molhamento foliar na infecção da cultivar FM 944 GL. Houve efeitos significativos tanto de concentração de esporos quanto do tempo de molhamento foliar na infecção causada pelo fungo na forma de proporção da área foliar com sintomas da mancha alvo. Tempos de molhamento foliar inferiores a 24 horas foram pouco eficazes na infecção da cultivar por *C. cassiicola*, mesmo quando se utilizaram suspensões de esporos ajustadas com concentrações entre  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  esporos/mL (Figura 2). Suspensões de esporos inferiores a  $1 \times 10^3$  esporos/mL também foram pouco eficazes na infecção, mesmo com tempos de molhamento foliar elevados.

Os valores mais elevados de proporção de área foliar com sintomas da mancha alvo foram observados quando se empregaram tempos de molhamento foliar superiores a 48 horas associados com concentrações de esporos iguais ou superiores a  $1 \times 10^4$  esporos/mL. As maiores proporções de área lesionada pelo fungo foram observadas na concentração de  $1 \times 10^5$  esporos/mL, associada ao tempo de molhamento foliar de 72 horas.

Esse tipo de informação é relevante, pois além de determinar parâmetros eficazes na determinação de uma metodologia para caracterização da resis-



**Figura 2.** Estimativa de superfície de resposta para a probabilidade de área lesionada com sintomas da mancha alvo acumulada (A) da cultivar FM944 GL em função de diferentes tempo de molhamento foliar (tm) e concentrações de esporos (ce) de *Corynespora cassiicola*.

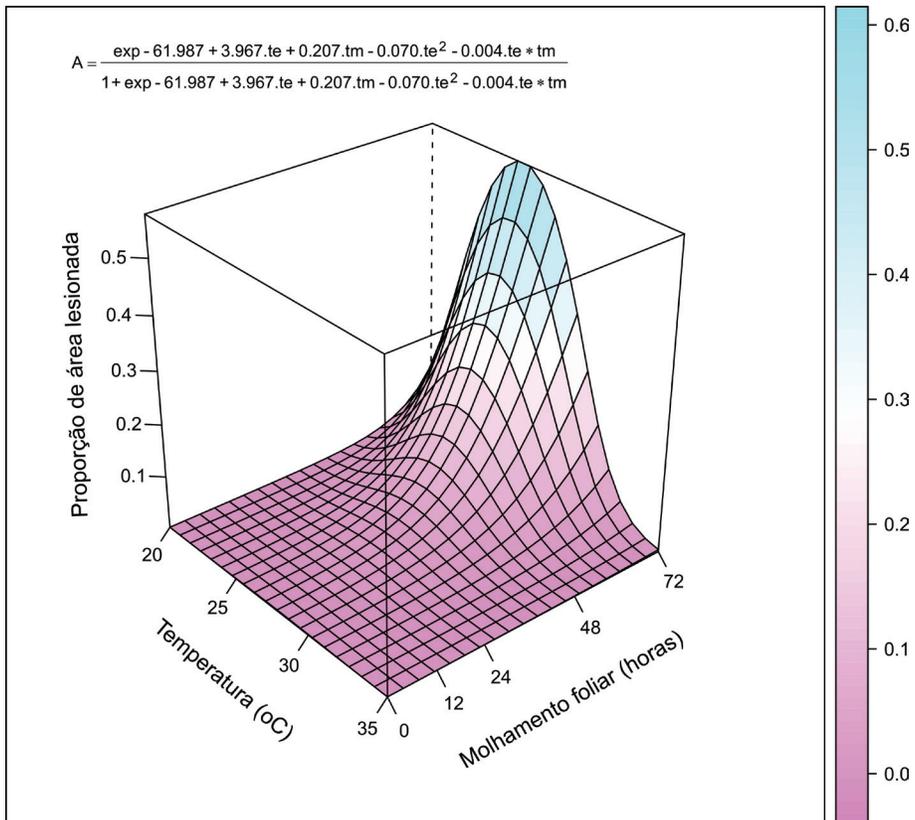
tência de genótipos de algodoeiro à *C. cassiicola* em ambientes controlados, fornece informações importantes que podem ser exploradas melhor em futuros trabalhos, principalmente no que se refere a quantidade de inóculo inicial deste fungo necessário para iniciar uma epidemia de mancha alvo no campo. Como observado neste estudo, são necessárias concentrações elevadas de esporos de *C. cassiicola* para provocar os sintomas da mancha alvo em plantas de algodoeiro. Da mesma forma, é provável que também ocorra no

campo, ou seja, seriam necessárias grandes quantidades de inóculo inicial do patógeno para provocar uma epidemia de mancha alvo. Sendo assim, podemos deduzir que medidas profiláticas que contribuam para a redução de inóculo inicial, como, por exemplo, a eliminação de soqueiras, assim como evitar o plantio do algodoeiro em sucessão a soja, principalmente, quando a soja apresenta sintomas da doença, poderiam contribuir significativamente no controle do agente causal da mancha alvo do algodoeiro em campos de produção.

### **Temperatura e tempo de molhamento foliar para detecção dos sintomas da mancha alvo em plantas de algodoeiro**

Houve efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) de temperaturas, tempos de molhamento foliar e da interação entre temperaturas e tempos de molhamento foliar. À medida que se aumentou o número de horas de molhamento foliar ocorreu acréscimo na proporção da área foliar com sintomas da mancha alvo em condições favoráveis de temperatura. A proporção de área foliar lesionada causada pelo patógeno foi maior na faixa de temperaturas compreendidas entre 25°C e 30°C, associados principalmente a tempos de molhamento foliar entre 48 e 72 horas (Figura 3). Nas temperaturas compreendidas entre 20°C e 25°C houve infecção significativa apenas quando se utilizaram tempos de molhamento foliar igual ou superior a 48 horas. Foi constatado um decréscimo significativo da proporção da área foliar lesionada das plantas incubadas nas temperaturas compreendidas entre 30°C e 35°C, mesmo quando foram empregados tempos de molhamento foliar elevados.

Em certa medida, os resultados obtidos neste ensaio corroboram os obtidos nos ensaios realizados anteriormente. Nos ensaios de crescimento micelial *in vitro* também se constatou que temperaturas compreendidas entre 25°C e 30°C foram ideais para o desenvolvimento do fungo (crescimento micelial *in vitro*), assim como se constatou a necessidade de tempos de molhamento foliar elevados no sucesso da infecção por parte do patógeno no ensaio em que se avaliou a concentração de esporos como parâmetro importante na definição de uma metodologia eficiente para caracterização da resistência de genótipos de algodoeiro à *C. cassiicola*.



**Figura 3.** Estimativa de superfície de resposta para probabilidade de área lesionada com sintomas da mancha alvo (A) na cultivar FM944 G, inoculada com *Corynespora cassiicola* e submetidas a diferentes temperaturas (te) e tempo de molhamento foliar (tm).

## Conclusões

Procedimento para inoculação de *Corynespora cassiicola* em plantas de algodoeiro em condições controladas:

- Estádio vegetativo da planta

Plantas de algodoeiro no estágio V2 ou V5 podem ser utilizadas. Em ambos estágios vegetativos obtivemos sucesso no processo de inoculação do patógeno e manifestação dos sintomas. Ressalta-se, entretanto, que, tendo

espaço suficiente no ambiente em que será avaliado os genótipos, é preferível que se utilize plantas no estágio V5. Nesse estágio, a planta está mais desenvolvida, sendo mais fácil a sua manipulação sem causar danos à mesma.

- Concentração de esporos

Recomenda-se utilizar suspensões de esporos de *C. cassiicola* ajustadas para  $1 \times 10^5$  esporos/mL.

- Temperatura de incubação

Câmaras de incubação com temperaturas ajustadas entre 25°C e 30°C são suficientes para favorecer a infecção do patógeno e, em consequência, a manifestação de sintomas.

- Tempo de molhamento foliar

É fundamental para o sucesso da inoculação tempos de molhamento foliares iguais ou superiores a 48 horas. Esse tempo de molhamento foliar pode ser assegurado com o envolvimento da planta com sacos de polietileno, mantendo-as envoltas pelo tempo necessário a formação do filme de água sobre a folha, e incubadas na câmara com as temperaturas compreendidas entre 25°C e 30°C, conforme descrito no item anterior. É importante ressaltar que, após assegurado o tempo de molhamento foliar de, pelo menos, 48 horas, é necessário manter as plantas em ambiente com umidade aproximada de 80% para evitar o ressecamento das lesões, após a retirada dos sacos pretos de polietileno. Após oito dias nesse tipo de ambiente, é possível fazer a avaliação da resistência de genótipos de algodoeiros à *C. cassiicola*.

## Agradecimentos

---

Os autores agradecem ao Dr. José Wellington dos Santos, o auxílio nas análises estatísticas.

## Referências

---

BUTLER, S.; YOUNG-KELLY, H.; RAPER, T.; COCHRAN, A.; JORDAN, J.; SHRESTHA, S.; LAMOUR, K.; MENGISTU, A.; CASTRO-ROCHA, A.; SHELBY, P. First report of target spot caused by *Corynespora cassiicola* on cotton in Tennessee. **Plant Disease**, v. 100, n. 2, p. 535, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0785-PDN>. Acesso em: 25/10/2019.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Academic, 1990. 532 p.

DIXON, L. J.; SCHLUB, R. L.; PERNEZNY, K.; DATNOFF, L. E. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1015-1027, 2009.

ELSNER, J. E.; SMITH, C. W.; OWEN, D. F. Uniform stage descriptions in upland cotton. **Crop Science**, v. 19, p. 361-363, 1979.

FANTIN, L. H.; BRAGA, K.; CANTERI, M. G.; DIAS, A. R.; BORGES, E. P. Development and validation of diagrammatic scale to assess target spot severity in cotton. **Australasian Plant Pathology**, v. 47, p. 491-497, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0576-6>. Acesso em: 14/10/2019.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. **Fungal data base**. [Washington, DC]: Systematic Botany & Micology Laboratory, 2009. Disponível em: <http://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: 12/10/2019.

FULMER, A. M.; WALLS, J. T.; PARKUNAN, V.; BROCKZ, J.; KEMERAIT JUNIOR, R. C. First report of target spot caused by *Corynespora cassiicola* on cotton in Georgia. **Plant Disease**, v. 96, n. 7, p. 1066, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0035-PDN>. Acesso em: 08/10/2019.

GALBIERI, R.; ARAÚJO, D. C. E. B.; KOBAYASTI, L.; GIROTTO, L.; MATOS, J. N.; MARANGONI, M. S.; ALMEIDA, W. P.; MEHTA, Y. R. *Corynespora* leaf blight of cotton in Brazil and its management. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 3805-3811, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.526398>. Acesso em 07/10/2019.

JONES, J. P. A leaf spot of cotton caused by *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 51, p. 305-308, 1961.

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

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2017. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 25/10/2019.

ROTEM, J. Climate and weather influence on epidemics. In: HORSFALL, J. G.; DIMOND, A. E. **Plant disease: how disease develops in populations**. New York: Academic, 1978. p. 317-436.

SMITH, L. J. **Host range, phylogenetic and pathogenic diversity of *Corynespora cassicola* (Berk. & Curtis) Wei.** 102 f. 2008. Dissertation (Doctor of Philosophy) -- University of Florida, Gainesville.

**Embrapa**

---

*Algodão*