



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA DE
FUNGICIDAS EM POPULAÇÕES DE *Corynespora cassiicola*
PROVENIENTES DE SOJA**

JÉSSICA MARIA ISRAEL DE JESUS

Orientador:
Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE
TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor

Jéssica Maria Israel de Jesus

3. Título do trabalho

Variabilidade genética e resistência de fungicidas em populações de *Corynespora cassiicola* provenientes de soja

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo. Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Gomes Da Cunha, Professora do Magistério Superior**, em 26/07/2021, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº](#)

[8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JÉSSICA MARIA ISRAEL DE JESUS, Discente**, em 15/10/2021, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o códigoverificador **2234704** e o código CRC **E44B3028**.

JÉSSICA MARIA ISRAEL DE JESUS

**VARIABILIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA DE
FUNGICIDAS EM POPULAÇÕES DE *Corynespora cassiicola*
PROVENIENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestra em Agronomia.

Área de concentração: Fitossanidade.

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha

Goiânia, GO – Brasil

2018

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

Jesus, Jessica Maria Israel de

Variabilidade genética e resistência de fungicidas em populações
de *Corynespora cassiicola* provenientes de soja [manuscrito] /
Jessica Maria Israel de Jesus. - 2018.

CLXXIX, 179 f.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Goiânia,
2018.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui mapas, fotografias, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Mancha-alvo. 2. Podridão radicular de *Corynespora*. 3.
Concentração efetiva (EC50 e EC98). 4. Variabilidade genética. 5.
Soja. I. Cunha, Marcos Gomes da, orient. II. Título.

CDU 632

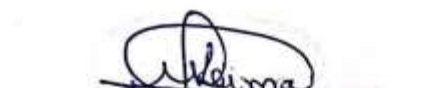


ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos onze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dezoito (11.12.2018), às 08h30min no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos membros: Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha - Orientador Presidente da Banca, Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho e Prof. Dr. Milton Luiz da Paz Lima, para a realização da sessão pública da defesa de Dissertação intitulada: "**Variabilidade genética e resistência de fungicidas em populações de *Corynespora cassiicola* provenientes de soja**", de autoria de **Jéssica Maria Israel de Jesus**, discente do curso de **Mestrado**, na área de concentração em **Fitossanidade**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFG. A sessão foi aberta pelo presidente que fez a apresentação formal dos membros da Banca e deu início as atividades relativas à defesa da Dissertação. Passou a palavra a mestrande que em quarenta minutos apresentou o seu trabalho. Após a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da banca. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. De acordo com Resolução CEPEC 1403/2016, de 10 de junho de 2016 que regulamenta os Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* na UFG, a Banca Examinadora considerou a Dissertação "**APROVADA**", com as correções recomendadas, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRA** em Agronomia, na área de concentração em **FITOSSANIDADE**, pela Universidade Federal de Goiás. A mestrande poderá efetuar as modificações sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar nova versão eletrônica da Dissertação à Secretaria do PPGA, no prazo máximo de trinta dias após a data da Defesa. A Banca Examinadora recomendou a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) de Dissertação, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de acatadas modificações sugeridas. Para finalizar, o Presidente agradeceu os membros examinadores, congratulou-se com a mestrande e encerrou a sessão às 11h50min, para constar, eu Welinton Barbosa Mota, secretário do PPGA, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora, em quatro vias de igual teor.


Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha
Presidente da Banca - EA/UFG


Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho
Membro - EA/UFG


Prof. Dr. Milton Luiz da Paz Lima
Membro - IFGoiano/Urutai

Aos meus pais, Idelma Maria de Jesus Israel e
Antônio Israel Neto pelo amor, dedicação,
companheirismo, motivação e apoio
incondicional em todas as etapas da minha
vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo dom da vida, pelas inúmeras bênçãos derramadas e por me conceder fé, esperança e confiança de que tudo daria certo.

Aos meus pais Idelma Maria de Jesus Israel e Antônio Israel Neto, por estarem ao meu lado em todos os momentos, pelo incrível exemplo que me dão diariamente de integridade, amor, honestidade, companheirismo, fé e lealdade e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando nem mesmo eu acreditava.

A Universidade Federal de Goiás e a todos os professores e funcionários, que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Marcos Gomes da Cunha por compartilhar de sua sabedoria, pelos ensinamentos, confiança, dedicação, amizade e constante prestatividade durante o mestrado.

Aos professores Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, Dr. Milton Luiz da Paz Lima e Dr. Érico de Campos Dianese pela paciência, ensinamentos e por todas as contribuições para a execução e análises dos experimentos.

Aos funcionários do NPF, Cezar Lemes e Paula pela amizade e o auxílio durante execução dos meus projetos.

As minhas grandes companheiras de jornada (em ordem alfabética para não ter discussão kkkk) Ana Beatriz Lemes, Daniela Vieira, Jéssica Alessandra, Juliana Pires, Kássia Lorrany e Sarah Oliveira. Obrigada por estarem ao meu lado e compartilharem sorrisos e lágrimas. Todas as conversas, cafezinhos e principalmente a amizade e companheirismo de vocês foram imprescindíveis para a conclusão de mais uma etapa da minha vida. Que nossa amizade perdure e que nossos caminhos possam sempre se encontrar pela vida a fora.

A minha família e amigos pelo apoio e compreensão.

E a todos que torceram, apoiaram e fizeram parte dessa jornada.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMO GERAL	17
GENERAL ABSTRACT	19
1- INTRODUÇÃO GERAL	21
2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Corynespora cassiicola</i> ...	23
2.1 RESUMO	23
2.2 INTRODUÇÃO	24
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.3.1 Área de estudo e amostragem.....	28
2.3.2 Isolamento direto do patógeno.....	29
2.3.3 Obtenção de culturas monoconidiais.....	30
2.3.4 Identificação molecular dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	30
2.3.4.1 Extração de DNA.....	30
2.3.4.2 PCR <i>multiplex</i> para a identificação molecular de <i>Corynespora cassiicola</i>	31
2.3.4.3 Eletroforese.....	31
2.3.5 Análise da diversidade e estrutura genética por meio de marcadores ISSR	32
2.3.5.1 Eletroforese ISSR.....	32
2.3.5.2 Análise dos dados gerados pelos marcadores ISSR.....	33
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.4.1 Identificação molecular dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	34
2.4.2. Análise da diversidade e estrutura genética por meio de marcadores ISSR.....	35
2.5 CONCLUSÕES	47
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
2.7 APÊNDICES	55

3	SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE <i>Corynespora cassiicola</i> A FUNGICIDAS UTILIZADOS NO MANEJO DA FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA.....	60
3.1	RESUMO	60
3.2	INTRODUÇÃO	61
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	65
3.3.1	Estimativa da EC ₅₀ e EC ₉₈	65
3.3.2	Avaliação da sensibilidade aos fungicidas em populações de <i>C. cassiicola</i> usando as EC ₅₀ e EC ₉₈	67
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.4.1	Estimativa da EC ₅₀ e EC ₉₈ em isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i>	68
3.4.2	Avaliação da sensibilidade aos fungicidas em populações de <i>C. cassiicola</i> usando as EC ₅₀ e EC ₉₈	78
3.5	CONCLUSÕES	89
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
3.7	APÊNDICES	95
4	<i>Corynespora cassiicola</i> UMA ESPÉCIE OU UM COMPLEXO?	115
4.1	RESUMO.....	115
4.2	INTRODUÇÃO	116
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	118
4.3.1	Local de execução dos experimentos.....	118
4.3.2	Obtenção dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	119
4.3.3.	Caracterização morfológica dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	119
4.3.4.	Caracterização molecular dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	121
4.3.4.1.	Extração de DNA.....	121
4.3.4.2.	PCR.....	121
4.3.4.3.	Eletroforese.....	122
4.3.4.4.	Sequenciamento.....	123
4.3.4.5.	Análise das sequências.....	123
4.3.5.	Diversidade e estrutura genética de isolados de <i>C. cassiicola</i> por meio de marcadores ISSR.....	124

4.3.5.1. Reações de PCR.....	124
4.3.5.2. Eletroforese ISSR.....	125
4.3.5.3. Análise dos dados genéticos obtidos por meio dos marcadores ISSR.....	125
4.3.6. Teste de Patogenicidade Cruzada.....	126
4.3.6.1. Inoculação de folha destacada.....	126
4.3.6.2. Inoculação na raiz.....	127
4.3.7. Sensibilidade dos isolados de <i>C. cassicola</i> a fungicidas.....	128
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	130
4.4.1. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i>.....	130
4.4.2. Caracterização molecular dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i>.....	138
4.4.3. Diversidade e estrutura genética de isolados de <i>C. cassicola</i> por meio de marcadores ISSR.....	149
4.4.4. Teste de patogenicidade Cruzada.....	156
4.4.4.1 Inoculação folha destacada.....	156
4.4.4.2. Inoculação na raiz.....	158
4.4.5. Sensibilidade dos isolados de <i>C. cassicola</i> a fungicidas.....	164
4.5. CONCLUSÕES	168
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169
4.7. APÊNDICES	177
5- CONCLUSÕES GERAIS.....	179

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Origem dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	53
Tabela 2.2. <i>Primers</i> de marcadores ISSR e temperatura de anelamento (T°) utilizados....	32
Tabela 2.3. <i>Primers</i> de marcadores ISSR utilizados, temperatura de anelamento (T°), Fragmentos amplificados, fragmentos polimórficos e % de polimorfismo de cada marcador utilizado na análise da diversidade genética de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	36
Tabela 2.4. Análise de variância molecular (AMOVA) entre estados de origem dos isolados de <i>C. cassiicola</i>	41
Tabela 2.5. Análise de variância molecular (AMOVA) entre os municípios de origem dos isolados de <i>C. cassiicola</i>	42
Tabela 2.6. Análise de variância molecular (AMOVA) avaliando o efeito do município e do estado de origem na variação global, e o efeito do “componente” município dentro da variação do estado de origem dos isolados de <i>C. cassiicola</i>	42
Tabela 3.1. Isolados de <i>C. cassiicola</i> utilizados na determinação da EC ₅₀ e EC ₉₈	65
Tabela 3.2. Fungicidas empregados nos testes de sensibilidade	66
Tabela 3.3. Origem dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	95
Tabela 3.4. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> a doses crescentes de cyproconazol..	97
Tabela 3.5. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> a doses crescentes de difeconazol.	97
Tabela 3.6. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> a doses crescentes de tebuconazol.....	98
Tabela 3.7. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> a doses crescentes de trifloxistrobina + tebuconazol.	98
Tabela 3.8. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> a doses crescentes de trifloxistrobina + protioconazol.	99
Tabela 3.9. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> a doses crescentes de epoxiconazol + piraclostrobina	99
Tabela 3.10. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> a doses crescentes de epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina.....	100
Tabela 3.11. Quantidade de ingrediente ativo em cada fungicida em função da Concentração Efetiva Efetiva 50 (EC ₅₀) e 98 (EC ₉₈) em µg.mL ⁻¹ , Equação da regressão e R ² para cada fungicida.	72
Tabela 3.12. Escalas de avaliação de sensibilidade de fungos a vários fungicidas propostas por vários autores.	74
Tabela 3.13. Classificação de sensibilidade de isolados de <i>C. cassiicola</i> a diferentes fungicidas em função da EC ₅₀	75
Tabela 3.14. Classificação de sensibilidade de isolados de <i>C. cassiicola</i> a diferentes fungicidas em função da EC ₉₈	77

Tabela 3.15. Avaliação de sensibilidade a fungicidas em populações de <i>C. cassiicola</i> usando as EC ₅₀ para cyproconazol, difeconazol e tebuconazol.....	100
Tabela 3.16. Avaliação de sensibilidade á fungicidas em populações de <i>C. cassiicola</i> usando as EC ₅₀ para as misturas entre trifloxistrobina + tebuconazol e trifloxistrobina + protioconazol	102
Tabela 3.17. Avaliação de sensibilidade a fungicidas em populações de <i>C. cassiicola</i> usando as EC ₅₀ para as misturas entre epoxiconazol + piraclostrobina e para epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina.	105
Tabela 3.18. Avaliação de sensibilidade á fungicidas em populações de <i>C. cassiicola</i> usando as EC ₉₈ para cyproconazol, difeconazol e tebuconazol	107
Tabela 3.19. Avaliação de sensibilidade á fungicidas em populações de <i>C. cassiicola</i> usando as EC ₉₈ para as misturas entre trifloxistrobina + tebuconazol e trifloxistrobina + protioconazol.	110
Tabela 3.20. Avaliação de sensibilidade á fungicidas em populações de <i>C. cassiicola</i> usando as EC ₉₈ para as misturas entre epoxiconazol + piraclostrobina e epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina.....	112
Tabela 4.1. Isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> provenientes de folhas de soja.	119
Tabela 4.2. Isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> provenientes de raiz de soja.	119
Tabela 4.3. Primers e temperaturas de anelamento	122
Tabela 4.4. Sequências comparativas obtidas no GenBank com respectivos táxon e códigos de acesso para o gene ribossomal ITS e β -tubulina.	123
Tabela 4.5. Primers de marcadores ISSR e temperatura de anelamento (T°).	124
Tabela 4.6. Fungicidas empregados/utilizados no teste de sensibilidade	128
Tabela 4.7. Cor (Frente e Verso), textura, forma e diâmetro médio das colônias dos isolados de <i>C. cassiicola</i> provenientes de folhas e raízes aos sete dias de crescimento em meio BDA.....	131
Tabela 4.8. Dimensões (largura e comprimento), número de pseudosseptos (mínimo e máximo) e cor dos conídios de <i>Corynespora cassiicola</i> isolados de folhas e raízes de soja.	135
Tabela 4.9. Caracterização molecular dos isolados de <i>C. cassiicola</i> , espécie “relacionada”, taxa de similaridade e número de acesso no GenBank.	141
Tabela 4.10. Primers ISSR utilizados, temperatura de anelamento (T°), Fragmentos amplificados, Fragmentos polimórficos e Porcentagem (%) de Polimorfismo, utilizados na análise da diversidade e estrutura genética de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	150
Tabela 4.11. Análise de variância molecular (AMOVA) entre os isolados de <i>C. cassiicola</i> provenientes de diferentes órgãos da planta hospedeira (folhas e raízes)	155
Tabela 4.12. Ingrediente Ativo (i.a.), Concentração Efetiva 50% (EC ₅₀) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), Concentração Efetiva 98% (EC ₉₈) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), Equação da regressão e R ² para cada fungicida para os isolados provenientes de folhas de soja (macha-alvo).....	166
Tabela 4.13. Ingrediente Ativo (i.a.), Concentração Efetiva 50% (EC ₅₀) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), Concentração Efetiva 98% (EC ₉₈) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), Equação da regressão e R ² para cada fungicida para os isolados provenientes de raízes de soja (podridão radicular de <i>Corynespora</i>)	166

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Folhas de soja com sintomas de Mancha-Alvo.	28
Figura 2.2. Locais de coleta dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>	29
Figura 2.3. 166-175: Fragmentos amplificados de DNA de <i>C. cassiicola</i> isolados de folhas de soja. Regiões amplificadas pelos <i>primers</i> ITS1 / ITS4 (550 pb) e GA4-F/GA4-R (415 pb). C-A: Controle negativo de ambiente. C-F: Controle negativo da reação. C+G: Controle positivo para reação com o par de <i>primers</i> GA4. C+I: Controle positivo para reação com o par de <i>primers</i> ITS. M- Marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder, Invitrogen).	34
Figura 2.4. Fragmentos de DNA de <i>Corynespora cassiicola</i> amplificados por PCR utilizando marcadores ISSR. M: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). C-: Controle negativo. C+: Controle positivo.	36
Figura 2.5. Dendrograma dos 203 isolados de <i>C. cassiicola</i> coletados em diferentes regiões e safras de soja no Brasil, baseado na similaridade de Dice e agrupados pelo método UPGMA com 10.000 randomizações.....	39
Figura 2.6. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) em populações de <i>Corynespora cassiicola</i> provenientes de plantas de soja do Brasil.....	43
Figura 2.7. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro de <i>Corynespora cassiicola</i> em soja..	46
Figura 3.1. Variação no crescimento dos isolados 313, 317 e 323 submetidos a diferentes doses do fungicida a base da mistura Epoxiconazol + Piraclostrobina.	68
Figura 3.2. Variação no crescimento dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> submetidos a diferentes doses do fungicida Cyproconazol	69
Figura 3.3. Variação no crescimento dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> submetidos a diferentes doses do fungicida Epoxiconazol + Piraclostrobina	69
Figura 3.4. Variação no crescimento dos isolados “selvagens” de <i>C. cassiicola</i> submetidos a diferentes doses do fungicida Epoxiconazol + Fluxapiroxade + Piraclostrobina.....	70
Figura 3.5. Sensibilidade dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em função da concentração de diferentes princípios ativos de fungicidas.....	71
Figura 3.6. Variação de Crescimento entre os isolados <i>Corynespora cassiicola</i> submetidos a EC98 de Cyproconazol	81
Figura 3.7. Variação de Crescimento entre os isolados <i>Corynespora cassiicola</i> submetidos a EC98 de Difeconazol	83
Figura 4.1. Variabilidade morfológica de colônias de isolados <i>Corynespora cassiicola</i> aos sete dias de incubação em meio de cultura BDA, temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. (*F) Frente da placa e (*V) Verso da placa. 312-323 – Isolados de folha. 306-321 – Isolados de raiz.	132
Figura 4.2. Estruturas de <i>Corynespora cassiicola</i> isolados de folhas de soja: A-C: Conídios. D- E- Conidióforo com conídio em formação. F-G- Clamidósporos. Observação em microscopia aumento 20x (Microscópio Olympus Cover – Bx41).	136
Figura 4.3. Estruturas de <i>Corynespora cassiicola</i> isolados de raízes de soja: A-E: Conídios. F- Conídio em formato de Y. G- Conidióforo com conídio em formação. H- Vários conidióforos e conídios. Observação em microscopia aumento 10x (Microscópio Olympus Cover – Bx41).....	137

Figura 4.4. Fragmentos de DNA de <i>C. cassiicola</i> isolados de folhas (312, 313, 316, 317, 318, 322 e 323) ou raízes (305, 306, 308, 314, 315, 319, 320 e 321) de soja, amplificados pelo primer CCF/CCR-1 (272 pb). C-: Controle negativo. M - Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen)	138
Figura 4.5. Fragmentos de DNA ribossomal e da região ga4 do genoma de <i>C. cassiicola</i> isolados de folhas (312, 313, 316, 317, 318, 322 e 323) ou raízes (305, 306, 308, 314, 315, 319, 320 e 321) de soja, amplificados usando os <i>primers</i> ITS1 / ITS4 (550 pb) e GA4-F/GA4-R (415 pb). C-: Controle negativo. M - Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen)	139
Figura 4.6. Fragmentos de DNA de <i>C. cassiicola</i> isolado de folha (318) ou de raiz (315) de soja. Amplificados em PCR com gradiente de temperatura de anelamento dos <i>primers</i> Bt2a/Bt2b, referentes ao gene β -tubulina. C-: Controle negativo. C+: Controle positivo. M - Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). T° - temperatura de anelamento utilizada	140
Figura 4.7. Dendrograma gerado com as sequências do gene ribossomal ITS por meio da análise pelo método de máxima verossimilhança, reconstruída com robustez de 10.000 randomizações não paramétricas <i>bootstrap</i>	143
Figura 4.8. Dendrograma gerado com as sequências do gene β -tubulina por meio da análise pelo método de máxima verossimilhança, reconstruída por <i>bootstrap</i> com robustez de 10.000 randomizações não paramétricas	144
Figura 4.9. Dendrograma gerado a partir das sequências concatenadas para o gene ribossomal ITS e o gene β -tubulina por meio da análise pelo método de máxima verossimilhança, reconstruída com robustez de 10.000 randomizações não paramétricas de <i>bootstrap</i>	145
Figura 4.10. Amplificação com o marcador ISSR 11. Fragmentos amplificados de DNA de <i>Corynespora cassiicola</i> isolados de folhas (312, 313, 316, 317, 318, 322 e 323) e raízes (305, 306, 308, 314, 315, 319, 320 e 321) de soja. M: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). C-: Controle negativo	150
Figura 4.11. Agrupamento dos 15 isolados de <i>C. cassiicola</i> provenientes de folhas e raízes de soja, através da matriz de dissimilaridade calculada pelo coeficiente de Dice, utilizando o método UPGMA (com 10.000 randomizações) com base em 12 marcadores ISSR. O coeficiente de correlação cofenético (r) é = 0,979228.	152
Figura 4.12. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> provenientes de folhas e raízes de soja	154
Figura 4.13. Folhas de soja cinco dias após a inoculação com isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> provenientes de folhas.	157
Figura 4.14. Folhas de soja oito dias após a inoculação com isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> provenientes de raízes	157
Figura 4.15. Manifestação de sintomas de <i>Corynespora cassiicola</i> em raízes de soja inoculadas com isolados provenientes de folhas. A: raízes com disco de micélio visualizadas em lupa Olympus Sz40 sob aumento 10x. B e C: Raízes com sintomas sutis de infecção por <i>C. cassiicola</i>	159
Figura 4.16. Manifestação de sintomas e sinais de <i>Corynespora cassiicola</i> em raízes de soja inoculadas com isolados provenientes de raízes. A e B: raízes com disco de micélio.	

C: Raízes com sintomas severos de infecção por *C. cassiicola*. D: Raízes com sintomas severos de infecção por *C. cassiicola* visualizadas em lupa Olympus Sz40 sob aumento 10x. 160

Figura 4.17. Teste de inoculação cruzada em raiz de soja. Detecção molecular por meio do par de *primers* GA4-F/GA4-R (415 pb) específicos para *C. cassiicola*. C-: Controle negativo. C+: Controle positivo. M: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). Isolados de folha: 312, 317, 318 e 323. Isolados raiz 306, 308, 319 e 320....161

Figura 4.18. Teste de inoculação cruzada em raiz de soja. Detecção molecular por meio do par de *primers* CCF/CCR (272 pb) específicos para *C. cassiicola*. C-: Controle negativo. C+: Controle positivo. M: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). Isolados de folha: 312, 317, 318 e 323. Isolados raiz 306, 308, 319 e 320... 162

Figura 4.19. Sensibilidade dos isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de folhas de soja em função da concentração de diferentes princípios ativos de fungicidas..... 177

Figura 4.20. Sensibilidade dos isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de raízes de soja em função da concentração de diferentes princípios ativos de fungicidas. 178

RESUMO GERAL

JESUS, J. M. I. **Variabilidade genética e resistência de fungicidas em populações de *Corynespora cassiicola* provenientes de soja**. 2018. 179 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitossanidade) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2018¹.

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) Wei, pertence ao filo Ascomycota e já foi relatado como patógeno em mais de 402 espécies de plantas. Dentre as hospedeiras de *C. cassiicola* está a soja da qual é o agente causal da mancha-alvo e da podridão radicular de *Corynespora*. O uso intensivo de fungicidas para o controle de doenças na soja (principalmente a ferrugem-asiática) impacta as populações de patógenos, sendo necessário o monitoramento para detectar o surgimento de isolados resistentes aos principais fungicidas. O controle eficiente de doenças depende de vários fatores, dentre eles da correta identificação e o conhecimento a respeito da variabilidade genética do fitopatógeno. Diante disso, com este estudo objetivou-se: i) identificar os isolados por meio de técnicas moleculares e avaliar a diversidade genética de 203 isolados de *C. cassiicola* obtidos de plantas de soja por meio de marcadores moleculares ISSR; ii) determinar as EC₅₀ e EC₉₈ de sete fungicidas empregados no controle da ferrugem-asiática, frente a isolados “selvagens” de *C. cassiicola*; iii) avaliar (a partir da EC₅₀ e EC₉₈) a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* coletados de áreas onde têm sido realizadas sistemáticas aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática; iv) estudar as possíveis diferenças existentes entre isolados de *C. cassiicola* provenientes de folhas e raízes de soja através da caracterização morfológica e molecular, variabilidade genética a partir de marcadores moleculares ISSR e patogenicidade cruzada entre ambos os grupos de isolados; v) determinar a EC₅₀ e EC₉₈ para os isolados provenientes de folhas e raízes de soja. Todos os 203 isolados de folhas com sintomas de mancha-alvo foram identificados como *C. cassiicola*. A diversidade genética de *C. cassiicola* foi analisada com nove *primers* ISSR, com 100% de polimorfismo. O teste de Mantel apresentou correlação positiva ($r = 0,91$) entre a distância geográfica e a distância genética. Por meio da AMOVA, foi possível observar uma estruturação média para estado e alta para município de origem, sugerindo fluxo gênico entre as populações de *C. cassiicola* provenientes de cultivos de soja. Para a determinação das EC's 50 e 98, houve variação na sensibilidade entre os isolados “selvagens” de *C. cassiicola*, indicando uma variabilidade existente nessa espécie fúngica. O patógeno mostrou variabilidade na sensibilidade aos grupos fungicidas triazóis (DMI) e estrobilurinas (QoI), o que demonstra alto risco de seleção para resistência. Nos estudos relacionados com a diferenciação entre isolados provenientes de folhas e raiz de soja (mancha-alvo e podridão radicular de *Corynespora*) foi possível observar grande diferenciação entre ambos os grupos de isolados. Na caracterização molecular houve diferença entre os resultados dos *primers* específicos para *C. cassiicola* (CCF-1/CCR-1 e GA4F/GA4R) e também no sequenciamento para os dois genes (ITS e β -tubulina). A diversidade genética com *primers* ISSR obteve-se um percentual de polimorfismo de 97,2%. Os valores de dissimilaridade genética, calculados de acordo com o complemento do índice de Dice variaram de 0 a 0,797, refletindo uma variabilidade genética alta entre os grupos de isolados de *C. cassiicola*. Por meio da AMOVA, foi possível observar uma estruturação alta entre os dois grupos de isolados, referente ao tecido vegetal do qual são provenientes (raiz e folha). O teste patogenicidade cruzada demonstrou a capacidade dos dois grupos de isolados infectarem ambos os tecidos vegetais (folha e raiz), porém apresentando diferenças na velocidade e intensidade dos sintomas. Na avaliação de sensibilidade dos isolados a fungicidas, foi possível observar que os isolados de raiz apresentam maior

¹ Orientador: Prof. PhD. Marcos Gomes da Cunha. EA-UFG.

sensibilidade a fungicidas, sendo que as doses EC₅₀ e EC₉₈, estimadas para esse grupo também foram menores que as determinadas para os isolados de folhas. A partir dos resultados obtidos nesse estudo, é possível dizer que os dois grupos de isolados provenientes de soja (folha e raiz) não pertencem à mesma espécie fúngica.

Palavras-chave: Mancha-alvo, podridão radicular de *Corynespora*, variabilidade genética, concentração efetiva (EC₅₀ e EC₉₈), soja.

¹ Orientador: Prof. PhD. Marcos Gomes da Cunha. EA-UFG.

GENERAL ABSTRACT

JESUS, J. M. I. **Genetic variability and resistance to fungicides in *Corynespora cassiicola* populations from soybean**. 2018. 179 f. Dissertation (Master in Agronomy: Phytosanitary) - School of Agronomy, Federal University of Goiás, 2018¹.

The fungus *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) Wei belongs to the phylum Ascomycota and has been reported as a pathogen in more than 402 plant species. Among the hosts of *C. cassiicola* is the soybean of which is the causal agent of the target spot and root rot of *Corynespora*. The intensive use of fungicides to control diseases in soybean (mainly Asian rust) impacts populations of pathogens, and monitoring is necessary to detect the emergence of isolates resistant to the main fungicides. The efficient control of diseases depends on several factors, among them the correct identification and the knowledge about the genetic variability of the phytopathogen. The objective of this study was to: i) identify the isolates using molecular techniques and evaluate the genetic diversity of 203 *C. cassiicola* isolates obtained from soybean plants using molecular markers ISSR; ii) to determine the EC₅₀ and EC₉₈ of seven fungicides used in the control of Asian rust against "wild" isolates of *C. cassiicola*; iii) to evaluate (from EC₅₀ and EC₉₈) the sensitivity of *C. cassiicola* isolates collected from areas where systematic applications of fungicides for the control of Asian rust have been carried out; iv) to study the possible differences between *C. cassiicola* isolates from leaves and roots of soybean through the morphological and molecular characterization, genetic variability from ISSR molecular markers and cross pathogenicity between both groups of isolates; v) determine the EC₅₀ and EC₉₈ for the isolates from leaves and roots of soybean. All 203 leaf isolates with symptoms of target spot were identified as *C. cassiicola*. The genetic diversity of *C. cassiicola* was analyzed with nine ISSR primers, with 100% polymorphism. The Mantel test showed a positive correlation ($r = 0.91$) between the geographic distance and the genetic distance. Through AMOVA, it was possible to observe a medium structure for the state and high for the municipality of origin, suggesting gene flow among the populations of *C. cassiicola* from soybean crops. For the determination of the EC's 50 and 98, there was variation in sensitivity among the "wild" isolates of *C. cassiicola*, indicating an existing variability in this fungal species. The pathogen showed variability in sensitivity to the fungicidal groups triazoles (DMI) and strobilurins (QoI), which shows a high risk of selection for resistance. In the studies related to the differentiation between isolates from leaves and soybean root (target spot and *Corynespora* root rot), it was possible to observe great differentiation between both groups of isolates. In the molecular characterization there was a difference between the results of the primers specific for *C. cassiicola* (CCF-1 / CCR-1 and GA4F / GA4R) and also in the sequencing for the two genes (ITS and β -tubulin). The genetic diversity with ISSR primers obtained a percentage of polymorphism of 97.2%. The genetic dissimilarity values, calculated according to the complement of Dice index ranged from 0 to 0.797, reflecting a high genetic variability among the groups of *C. cassiicola* isolates. Through AMOVA, it was possible to observe a high structure between the two groups of isolates, referring to the plant tissue from which they come (root and leaf). The cross-pathogenicity test demonstrated the ability of the two groups of isolates to infect both plant tissues (leaf and root), but presenting differences in the speed and intensity of symptoms. In the evaluation of the sensitivity of the isolates to fungicides, it was possible to observe that the root sensitivity to fungicides, and the EC₅₀ and EC₉₈ doses estimated for this group were also lower than those determined for leaf isolates. From the

¹ Adviser: PhD. Marcos Gomes da Cunha. EA-UFG.

results obtained in this study, it is possible to say that the two groups of isolates from soybean (leaf and root) do not belong to the same fungal species.

Key words: Target Leaf Spot, Corynespora root rot, genetic variability, effective concentration (EC₅₀ and EC₉₈), soybean.

¹ Adviser: PhD. Marcos Gomes da Cunha. EA-UFG.

1- INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), pertencente à família das Fabáceas, é originária do continente asiático. O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador de soja no mundo. Na safra 2017/18 a produção ultrapassou 118.8 milhões toneladas, com um aumento de 4,2% se comparada com a safra passada (Conab, 2018). O complexo da soja ocupa lugar de destaque entre as *commodities* agrícolas nas exportações brasileiras, movimentando, no ano de 2017, mais de US\$ 31,72 bilhões que corresponde a 14,6% do total das exportações do país. Além disso, tem a maior participação no produto interno bruto agrícola e apresenta perspectivas de crescimento contínuo (Abiove; Secex, 2018; Brasil, 2018).

Entretanto no Brasil a cultura da soja pode ser afetada por aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus, com grande potencial de afetar a produtividade. Devido à prática do monocultivo, a expansão da área cultivada com soja nas regiões centrais do Brasil, e a introdução de novos patógenos, o número de patologias tem aumentado significativamente. Perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15 a 20% (Godoy, 2006; Grigolli, 2016).

Entre as doenças que incidem na cultura da soja, a mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis), Wei (1950) vem ganhando importância, principalmente na região do cerrado, em função dos danos que pode ocasionar a planta (Ribeiro et al., 2017). A incidência tem aumentado nas últimas safras em razão do aumento da semeadura de cultivares suscetíveis e da menor sensibilidade/maior resistência do fungo aos fungicidas comumente utilizados na sojicultura no Brasil. Os sintomas mais comuns da mancha-alvo são lesões nas folhas com halo amarelado e pontuação escura no centro, que podem causar desfolha severa de forma ascendente. Verificam-se também manchas nas hastes e nas vagens (Henning et al. 2005). Perdas de até 50% podem ser observadas em cultivares suscetíveis (Godoy et al., 2017). O fungo *C. cassiicola* também pode causar podridão radicular, sendo comum em plantios de soja com sistema de semeadura direta (Embrapa, 2010). As plantas doentes apresentam o amarelecimento das folhas e maturação desuniforme. As raízes infectadas por *C. cassiicola* apresentam coloração castanho-claro e, após a morte da planta, podem ser cobertas por uma camada negra de conidióforos e conídios do fungo (Henning et al., 2014; Almeida et al., 2005).

A identificação correta do patógeno é importante para adoção de métodos de controle. Porém, apenas a caracterização morfológica em muitos casos não é suficiente, devido à grande variação na cor, tamanho e crescimento de colônias (Ellis; Holiday, 1971, Krugner; Bacchi, 1995, Snow; Berggren Júnior, 1989, Sousa; Bentes, 2014, Veiga, 1978). Nestes casos, os métodos baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) podem ser usados na identificação de agentes patogênicos, utilizando *primers* específicos para espécie (Adachi; Oku, 2000).

Fitopatógenos podem apresentar variabilidade genética dentro e entre suas populações. Os estudos que abrangem a diversidade e estrutura genética em fungos têm usado com frequência a biologia molecular como ferramenta, principalmente os marcadores moleculares que são baseados nas reações de PCR. Dentre eles os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (Faleiro, 2007). A variabilidade genética é uma condição presente em patossistemas silvestres preservados e é aumentada em agroecossistemas. A alteração dos cultivos através do melhoramento das espécies cultivadas, a ampliação de fronteiras agrícolas e o uso desmedido de defensivos sistêmicos são fatores que aumentam a pressão de seleção exercida sobre as populações de patógenos. Todos estes fatores favorecem novos genes de virulência e o polimorfismo dessas populações de fitopatógenos (Araya, 2003). O uso frequente de compostos químicos constitui em uma mudança de ambiente para o fungo, que antes era sensível a uma determinada substância, tornando-se insensível após a sua adaptação a esta nova situação (McDonald; Linde, 2002 b; Reis et al., 2010).

A aplicação de fungicidas na cultura da soja tem sido direcionada principalmente ao controle da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), porém esses produtos também agem sobre as doenças de final de ciclo (DFC) como o cretamento foliar (*Cercospora kikuchii*), mancha-parda ou septoriose (*Septoria glycines*) e mancha-alvo (*C. cassiicola*). Portanto, a alta pressão de seleção causada pelo uso intensivo de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática, pode interferir nas populações de outros fungos, aumentando a presença de indivíduos resistentes em um curto período de tempo.

Devido à relevância de *C. cassiicola* e o impacto econômico causado em diversas culturas, dentre elas a soja, estudos sobre a variabilidade genética, sensibilidade a fungicidas e biologia do patógeno em interação com os diferentes “órgãos” do hospedeiro são necessários.

2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Corynespora cassiicola*

2.1 RESUMO

O fungo *Corynespora cassiicola*, pertencente ao filo Ascomycota, possui ampla gama de hospedeiros e já foi relatado como patógeno em mais de 402 espécies de plantas, como hortaliças, oleaginosas, florestais, frutíferas, ornamentais e algumas plantas invasoras. É membro dos Ascomycota mitospóricos, um grupo heterogêneo de fungos cuja característica comum é a ausência de reprodução sexual. No Brasil, os estudos referentes a esse patógeno têm aumentado principalmente pelos danos ocasionados a culturas de interesse econômico como a soja, o tomate, o mamão, o pepino dentre outros. O controle eficiente de doenças depende de vários fatores, dentre eles a correta identificação e o conhecimento a respeito da variabilidade genética do fitopatógeno. Este estudo objetivou a identificação molecular por meio de *primers* específicos e avaliação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares ISSR de 203 isolados de *C. cassiicola* obtidos de plantas de soja com sintomas de mancha-alvo coletados em diferentes safras e estados brasileiros. Para a confirmação molecular da espécie, o DNA total dos isolados em culturas puras foi extraído e submetido à técnica de PCR, por multiplex, utilizando dois pares de *primers*: ITS-1/ITS-4 e GA4-F/GA4-R. Todos os isolados foram confirmados como *C. cassiicola*. A diversidade genética de *C. cassiicola* foi analisada com nove *primers* ISSR, obtendo 58 *locus* polimórficos, e o percentual de polimorfismo foi 100%. Os valores de dissimilaridade genética, calculados de acordo com o complemento do índice de Dice variaram de 0 a 1, refletindo uma variabilidade genética alta entre os isolados de *C. cassiicola*. O teste de Mantel apresentou correlação positiva ($r = 0,91$) entre a distância geográfica e a distância genética. Por meio da AMOVA, foi possível observar uma estruturação média para estado e alta para município de origem dos isolados. Os resultados sugerem a ocorrência de fluxo gênico entre as populações de *C. cassiicola*.

Palavras-chave: Mancha-alvo, reprodução assexuada, variabilidade genética.

2.2 INTRODUÇÃO

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) Wei (1950), é o agente causal da mancha-alvo. Possui ampla gama de hospedeiros e já foi relatado como patógeno em mais de 402 espécies de plantas, como hortaliças, oleaginosas, florestais, frutíferas, ornamentais e algumas plantas invasoras (Farr and Rossman, 2018, Reis and Boiteux, 2007). O fungo é um ascomiceto, cosmopolita e inespecífico, tem extensa distribuição mundial, comum e abundante em regiões tropicais, presente também em subtropicais (Ellis and Holliday, 1971, Kurt, 2005, Silva et al., 2003).

Corynespora cassiicola é um membro dos Ascomycota mitospóricos, um grupo heterogêneo de fungos ascomicóticos cuja característica comum é a ausência de reprodução sexual, reproduzindo-se por conídios formados a partir de células conidiogênicas. Os conídios são esporos assexuados imóveis, os quais são dispersos pelo ar e servem para disseminar a doença rapidamente nos cultivos de soja ou outras plantas hospedeiras ao longo dos meses com temperaturas e umidade do ar elevadas (Gould, 2010).

Entre as hospedeiras economicamente importantes estão a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), o pepineiro (*Cucumis sativus* L.) e a seringueira (*Hevea brasiliensis* L.) (Pujade-Renaud, 2007). No Brasil, na cultura da soja, *C. cassiicola* tem aumentado sua relevância, em função dos danos que pode ocasionar à planta (Ribeiro et al., 2017). A doença foi relatada pela primeira vez no país no Paraná e depois em São Paulo (Almeida et al., 1976). A incidência tem aumentado nas últimas safras em razão do incremento da semeadura de cultivares suscetíveis e da menor sensibilidade/maior resistência do fungo aos fungicidas comumente utilizados na sojicultura no Brasil. Perdas de até 50% podem ser observadas em cultivares suscetíveis (Godoy et al., 2017).

A identificação do patógeno é importante para adoção de métodos de controle. Porém, apenas a caracterização morfológica em muitos casos não é suficiente. No caso do fungo *C. cassiicola*, a caracterização morfológica possui limitações, devido à grande variação na cor, tamanho e crescimento de colônias (Ellis and Holliday, 1971, Krugner and Bacchi, 1995, Snow and Berggren Júnior, 1989, Sousa and Bentes, 2014, Veiga, 1978) Métodos baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) estão se tornando comuns

na identificação de agentes patogênicos, utilizando *primers* específicos para a espécie do patógeno (Adachi and Oku, 2000).

Patógenos de plantas podem apresentar variabilidade genética dentro e entre suas populações. Diversos estudos demonstraram a variabilidade existente entre isolados de *C. cassiicola*, obtidos de diferentes espécies cultivadas (Aguilar, 2015, Cutrim and Silva, 2003, Dal'Sasso, 2017, Dixon et al., 2009, Duarte et al., 1981, Ferreira, 2014, Qi et al., 2011, Silva et al., 1998, Siviero and Assis, 1993). Sendo possível que ocorra variabilidade entre populações de *C. cassiicola* provenientes de uma mesma espécie hospedeira, como a soja. Essa variação entre os isolados pode afetar a eficácia das estratégias de controle, tanto químico (fungicidas) quanto genético (cultivares resistentes) ou cultural.

População é um grupo de indivíduos pertencentes à mesma espécie, que apresenta uma continuidade no tempo, vive numa área geográfica restrita o suficiente de maneira que possibilite que seus membros possam acasalar ao acaso e, portanto, trocar alelos entre si. Entretanto, não envolvem necessariamente todos os indivíduos de uma mesma espécie, mas sim as populações locais, que são as unidades de cruzamentos locais. A distribuição homogênea no espaço dos membros de uma espécie é rara: quase sempre a população é subdividida, devido à heterogeneidade ambiental. As unidades de cruzamento local de populações grandes e geograficamente estruturadas são de grande interesse (Ramalho et al., 2012).

A definição de estrutura genética de uma população é em função da quantidade e da distribuição da variação genética dentro e entre populações. É determinado pela história evolutiva e pelo potencial de alteração dos organismos de uma população. Sendo este, um resultado da interação entre os processos evolucionários como mutação, migração, seleção, deriva e recombinação (McDonald, 1997, McDonald and Linde, 2002b).

A migração é o movimento de indivíduos entre populações e subpopulações, sendo que a presença de alelos semelhantes em populações separadas geograficamente pode evidenciar a presença de fluxo gênico. As populações podem divergir entre si por deriva genética ou por seleção. Quando o modo reprodutivo é, em sua maioria assexuado, observa-se que genótipos inteiros podem ser trocados entre as populações, tendo em vista que, nesses organismos raramente há recombinação de genes. Um alto nível de fluxo gênico geralmente representa diversidade genética (Boeger et al., 1993, McDonald and Linde, 2002b).

Pode-se definir a deriva genética como a mudança nos alelos aleatoriamente dentro da população, podendo ocorrer com ou sem ação do processo de seleção (McDonald and Linde, 2002b, McDonald and McDermott, 1993). Já a mutação é uma alteração na sequência dos nucleotídeos, sendo um dos principais fatores evolucionários em uma população, atuando na introdução de novos alelos em linhagens clonais. É a principal fonte de variabilidade genética, sendo influenciada diretamente pelo tamanho, pois, populações maiores tendem a apresentar maior número de mutantes (McDonald and Linde, 2002b).

A recombinação por sua vez, tem por função reordenar as sequências do genoma aleatoriamente, ocorrendo através da reprodução sexual ou por hibridização somática, que pode ocorrer por fusão e recombinação (ciclo parassexual), sendo uma importante fonte de variabilidade genética em fungos. A recombinação do ponto de vista evolutivo pode gerar novos genótipos que permitam melhor adaptação às mudanças no ambiente, resistência a fungicidas ou a cultivares (Burdon and Silk, 1997, Milgroom, 1996).

A seleção é um processo que pode levar ao aumento ou a diminuição na frequência de genes, ou seja, seleciona os genes que tenham vantagens adaptativas para a população. Este processo não gera variabilidade na população. A variação genética nesse caso pode ocorrer através da seleção de um gene ou na combinação de vários, podendo atuar também na especiação a partir da acumulação de diferenças genéticas adaptativas entre populações isoladas (McDonald and Linde, 2002b, Zhan et al., 2002).

A seleção é a principal força que impulsiona mudanças nas frequências de alelos mutantes. A seleção direcional ocorre quando um dos principais genes de resistência se torna amplamente distribuído por uma grande área geográfica. Isto leva a um aumento na frequência do mutante virulento que perdeu o eliciador até que o principal gene de resistência do hospedeiro seja superado (McDonald and Linde, 2002b, Reis et al., 2010).

Os muitos exemplos em que o gene de resistência principal é superado oferecem evidências abundantes de que a seleção é eficiente em ecossistemas agrícolas que se baseiam na monocultura e na uniformidade genética. Existem várias possibilidades para implantar a resistência dos genes principais que podem mudar a maneira que a seleção opera em uma população de patógenos. Outro exemplo de seleção direcional ocorre no uso de controle químico, pois, a redução da sensibilidade envolve a habilidade de adaptação a diferentes condições de ambiente para sobreviver. O frequente uso de compostos químicos constitui em uma mudança de ambiente para o fungo, que antes era sensível a uma

determinada substância, torna-se insensível após a sua adaptação a esta nova situação (McDonald and Linde, 2002a, Reis et al., 2010).

Os estudos com a variabilidade genética são realizados com intuito de avaliar a magnitude da diversidade presente nas subpopulações (Frankham et al., 2008, Nei, 1973, Nei, 1978). Com os avanços da genética e da biologia molecular nos últimos anos, principalmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, foram criadas técnicas para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos (Ayad et al., 1997).

Entre as principais vantagens na utilização de marcadores moleculares estão a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento do organismo. Diferentes metodologias têm permitido estudos de evolução, diversidade genética inter e intraespecífica, identidade, origem genética e identificação de novas variantes, possibilitando diferentes ações de pesquisa (Faleiro, 2007).

É possível realizar várias análises a partir do uso de marcadores moleculares, incluindo a identificação de indivíduos, clones, estimativa de variabilidade genética, fluxo gênico, taxa de cruzamento e construção de cladogramas genéticos (Welsh and McClelland, 1990, Williams et al., 1990). Existem diversos tipos de marcadores moleculares, entre eles os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLPs, (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Microsatélites SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) entre outros. Cada marcador molecular apresenta características próprias e a sua escolha depende dos objetivos da pesquisa a ser desenvolvida (Faleiro, 2007, Ferreira and Grattapaglia, 1998, Zucchi, 2002). Os estudos que abrangem a diversidade e estrutura genética em fungos têm usado principalmente os marcadores moleculares que são baseados nas reações de PCR.

Baseando-se na hipótese de que, no Brasil, os isolados coletados em folhas sintomáticas de soja de diferentes safras e regiões, pertencem a um único clone de *Corynespora cassiicola*, os objetivos deste estudo foram: i) Identificar molecularmente isolados de *C. cassiicola*; ii) Analisar a diversidade genética de isolados de *C. cassiicola*

obtidos de plantas de soja com sintomas de mancha-alvo coletados em diferentes safras e estados brasileiros por meio de marcadores moleculares ISSR.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Núcleo de Pesquisa em Fitopatologia (NPF) da Universidade Federal de Goiás (UFG) entre novembro de 2016 a junho de 2018.

2.3.1 Área de estudo e amostragem

Plantas de soja com folhas apresentando sintomas típicos de Mancha-alvo (Figura 2.1) foram coletadas em áreas de cultivo nos estados de Goiás, Maranhão, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e Pará (Figura 2.2). As amostragens foram feitas ao longo das safras de 1997 a 2017 (Tabela 2.1, Apêndices).



Figura 2.1. Folha de soja com sintomas de Mancha-Alvo.

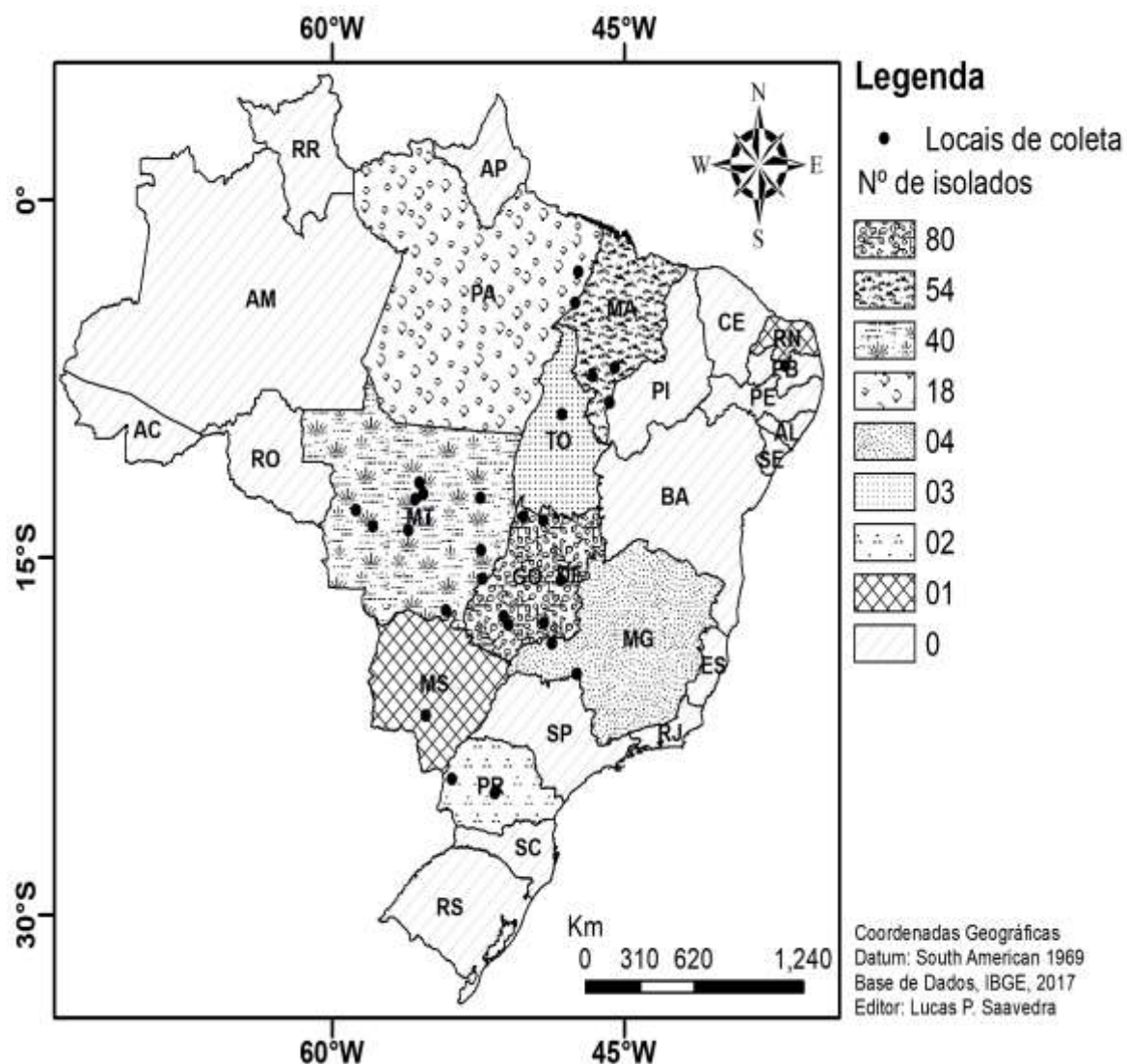


Figura 2.2. Locais de coleta dos isolados de *Corynespora cassiicola*.

2.3.2 Isolamento direto do patógeno

Para o isolamento destes fungos, folhas de soja com sintomas típicos de mancha-alvo (Figura 2.1) foram colocadas em câmara úmida para a esporulação, após três dias procedeu-se com a técnica de isolamento direto (Alfenas and Mafia, 2016), onde, com o auxílio de um estilete e sob uma lupa (Olympus Sz40), as estruturas do fungo foram transferidas para placas de Petri com meio ágar-ágar. Após o crescimento do fungo procedeu-se a repicagem para placas com o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA).

2.3.3 Obtenção de culturas monoconidiais

Para a obtenção de culturas monoconidiais adicionou-se em cada placa de Petri contendo colônias do fungo, 10 mL de água deionizada estéril. Em seguida, foi feita a desestruturação da colônia com o auxílio de um estilete, e o sobrenadante foi coletado em um béquer. Desta suspensão, foram retirados 100 µL que foram transferidos para microtubos contendo 900 µL de água destilada esterilizada, os quais foram submetidos a diluições fracionadas até a concentração 10^{-3} , retirando-se uma alíquota de 100 µL, e distribuído em placas de Petri contendo o meio BDA, e espalhadas uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 25 °C durante 24 horas, em regime de 12 horas/luz. Coletou-se um conídio germinado através do corte de um fragmento correspondente ao foco de luz do microscópio. O conídio germinado foi transferido para uma nova placa de Petri contendo BDA para constituir as colônias monoconidiais.

A preservação dos isolados foi feita utilizando o método Castellani (Castellani, 1939, Teramoto et al., 2011). Para tanto, foram depositados dez discos de micélio (9 mm) das culturas monoconidiais em cada tubo o de plástico (Eppendorf) de 10 mL completado o volume com água deionizada estéril. Esse procedimento foi feito em duplicata para cada isolado.

2.3.4 Identificação molecular dos isolados de *Corynespora cassiicola*

2.3.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo adaptado de Dellaporta et al. (1983). Para cada amostra, os fragmentos de micélio foram colocados em tubos plásticos (Eppendorf) (1,5 mL), com 500 µL de tampão de extração Dellaporta (NaCl 0,5M, Tris 0,1M, EDTA 0,05M) e em seguida macerados com pistilo. Adicionou-se 33 µL de SDS 20%, seguido de agitação por 2 minutos em vórtex. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos (banho-seco).

Foram acrescentados 160 µL de acetato de potássio 5M e novamente as amostras foram agitadas em vórtex por 2 minutos e em seguida centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos plásticos (Eppendorf),

onde foram adicionados 330 µl de isopropanol. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, mantendo o “pellet” no fundo do tubo. Lavou-se o “pellet” com 500 µl de etanol 70% e centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido com cuidado e, após secagem do “pellet” por 30 minutos a temperatura ambiente, o DNA total (pellet) foi ressuspensionado em 50 µL de água Milli-Q. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Após a leitura as amostras foram ajustadas para a concentração de 20 ng/µl de DNA.

2.3.4.2 PCR *multiplex* para a identificação molecular de *Corynespora cassiicola*

A PCR Multiplex foi realizada com dois pares de *primers*: ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990), para amplificação parcial do gene ribossômico (regiões ITS1, 5.8S rDNA e ITS2) com iniciadores específicos para organismos fúngicos e GA4-F (5'-CCTGCTCCGACTTTGTTGAG-3') e GA4-R (5'-GTCTGGGAGCAGCAAAGACT-3') (Dixon et al., 2009), que são específicos para amplificação do *locus* hipervariável *ga4* presente apenas em *C. cassiicola*.

O volume final das reações foi de 10 µl, sendo 1,0 µl de DNA, 8,2 µl de Master Mix (Emerald Master Mix Takara), 0,2 µl de *primer* ITS-1 e 0,2 µl de *primer* ITS-4, 0,2 µl de *primer* GA4-F e 0,2 µl de *primer* GA4-R. Para ambos os *primers* foram utilizadas amostras de controle positivo, além dos controles negativos de reação e ambiente. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler® Nexus, nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

2.3.4.3 Eletroforese

Os produtos amplificados pela reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % (p/v), utilizando-se o buffer TBE 1X, por uma hora a 80 volts. Foram utilizados 5 µl do produto da PCR e 2 µl do corante de GelRed™ (Biotium). O marcador 1Kb Plus DNA “Ladder” (Invitrogen, Life Technologies) foi adotado como

padrão de peso molecular. O gel foi observado em um transluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia®).

2.3.5 Análise da diversidade e estrutura genética por meio de marcadores ISSR

Para selecionar quais *primers* seriam utilizados no estudo, inicialmente foi realizada uma triagem com 12 *primers* ISSR. Após os ajustes, foram selecionados nove *primers* que apresentaram melhor resolução (Tabela 2.2). A amplificação foi feita em volume final de 10 µl, sendo 1,0 µl de DNA, 5,0 µl de Master Mix (Emerald Master Mix Takara), 3,6 µl de água ultrapura (dH₂O Kit Emerald Master Mix Takara) e 0,4 µl de *primer*. As condições para amplificação foram desnaturação inicial a 94 °C/5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C/30 segundos, um minuto de anelamento sendo que a temperatura variou de acordo com cada *primer* (Tabela 2.2), extensão a 72°C /2 minutos, e um ciclo de extensão final de 72 °C/10 min.

Tabela 2.2. *Primers* de marcadores ISSR e temperatura de anelamento (C°) utilizados.

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	C° Anelamento	Referências
ISSR10	CTCCTCCTCCTCRC	48	Serra et al. (2007)
ISSR11	GAGGAGGAGGAGRC	50	Serra et al. (2007)
MJ3	GTGCCTGTGCCTG	53	Nghia et al. (2008)
MJ4	GCCAACGCCAACG	44	Nghia et al. (2008)
MJ5	CCGTCACCGTCAA	46	Nghia et al. (2008)
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48	Qi et al. (2011)
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	46	Qi et al. (2011)
UBC826	ACACACACACACACACC	58	Nghia et al. (2008)
UBC828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	44	Nghia et al. (2008)

2.3.5.1 Eletroforese ISSR

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0 % (p/v) em buffer TBE 1X por uma hora e meia a 90 volts. Foram utilizados 5 µl da amostra do produto da PCR e 2 µl do corante de GelRed™ (Biotium). O tamanho relativo

dos fragmentos foi avaliado com o auxílio do marcador 1Kb Plus DNA “Ladder” (Invitrogen, Life Technologies). O gel foi analisado em transiluminador com luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia®).

2.3.5.2 Análise dos dados gerados pelos marcadores ISSR

Os dados das bandas geradas pela amplificação com os nove *primers* ISSR foram transformados em uma matriz de caráter binário atribuindo 1 para presença de banda e 0 para ausência. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada dividindo o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas amplificadas pelo referido *primer*. A dissimilaridade genética entre os indivíduos, sem considerar populações, foi mensurada, utilizando os coeficientes de Jaccard e Dice. O agrupamento dos indivíduos e a construção do dendrograma foram feitos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), pelo pacote *ape* (v. 5.1) utilizando-se do software R versão 3.4.1 (R Core Team, 2018).

Para testar a correlação entre a distância geográfica e a distância genética entre as populações e para a obtenção do valor cofenético foi realizado o teste de Mantel com 10.000 permutações, utilizando o R (v. 3.4.1) por meio do pacote *ape* (v. 5.1) (R Core Team, 2018). A análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi conduzida para evidenciar os fatores que determinam a formação dos grupos, pelo pacote *ade4* (v. 1.7-13) (R versão 3.4.1) (R Core Team, 2018). Para determinação dos índices de diferenciação genética de Φ_{ST} (F_{ST}) e a variância entre os componentes e seus níveis de significância foi feita a análise de variância molecular (AMOVA) com o pacote *pegas* (v. 0.11) implementado pelo R (versão 3.4.1) (R Core Team, 2018).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Identificação molecular dos isolados de *Corynespora cassiicola*

A metodologia de PCR multiplex permitiu confirmar molecularmente que os isolados pertencem à espécie *C. cassiicola*, corroborando com a classificação morfológica feita previamente. Após a eletroforese verificou-se a presença de dois fragmentos de DNA amplificados simultaneamente: um com aproximadamente 550 pb correspondente a região do gene ribossomal de fungos, compreendendo as regiões ITS1, 5.8S rDNA e ITS2, e o outro com aproximadamente 415 pb, correspondente ao *locus* *ga4* amplificado pelo par de *primers* GA4, o exemplo do padrão de amplificação é demonstrado na Figura 2.3.



Figura 2.3. 166-175: Fragmentos amplificados de DNA de *C. cassiicola* isolados de folhas de soja. Regiões amplificadas pelos *primers* ITS1 / ITS4 (550 pb) e GA4-F/GA4-R (415 pb). C-A: Controle negativo de ambiente. C-F: Controle negativo da reação. C+G: Controle positivo para reação com o par de *primers* GA4. C+I: Controle positivo para reação com o par de *primers* ITS. M- Marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder, Invitrogen).

Todos os 203 isolados avaliados foram confirmados como pertencentes à espécie *C. cassiicola* por meio da técnica de PCR multiplex. Estes resultados são importantes, pois mostram como essa é uma ferramenta rápida para a identificação de patógenos e/ou confirmação da caracterização morfológica.

Vários autores afirmam que para a identificação de patógenos em alguns casos é necessário um método robusto, sendo a PCR multiplex amplamente utilizada (Chen et al., 2015, Cho et al., 2016, Potrykus et al., 2014). Neste trabalho, evidenciou-se a eficiência dos *primers* GA4-F e GA4-R na identificação de isolados de *Corynespora cassiicola*. Ressalta-se a aplicabilidade e a praticidade da utilização do par de *primers* referentes à região ITS para o controle da reação em geral, principalmente quando trabalha-se com um número grande de isolados/amostras (como é o caso deste trabalho). A utilização destes *primers* é relevante para evitar resultados de falso-negativo, pois se a região ITS não for amplificada, evidencia que há erros no processo de extração ou na reação de PCR.

2.4.2. Análise da diversidade e estrutura genética por meio de marcadores ISSR

Os marcadores ISSR foram utilizados para analisar a variabilidade e a estrutura genética de 203 isolados de *C. cassiicola* provenientes de plantas de soja de diferentes regiões do Brasil. Os marcadores utilizados foram selecionados com base no polimorfismo e na resolução dos fragmentos amplificados. Os nove *primers* ISSR testados amplificaram 58 fragmentos, sendo todos polimórficos (100% de polimorfismo). O número de fragmentos polimórficos amplificados variou de quatro (para o marcador MJ3) a oito (marcadores ISSR10 e UBC809) (Tabela 2.3). O tamanho do fragmento das bandas amplificadas variou de 500 a 5000 pb. O perfil de amplificação dos *primers* ISSR é demonstrado na Figura 2.4.

Tabela 2.3. *Primers* de marcadores ISSR utilizados, temperatura de anelamento (C°), Fragmentos amplificados, fragmentos polimórficos e % de polimorfismo de cada marcador utilizado na análise da diversidade genética de isolados de *Corynespora cassiicola*.

<i>Primer</i>	C° Anelamento	Fragmentos Amplificados	Fragmentos Polimórficos	% Polimorfismo
ISSR10	48	8	8	100
ISSR11	50	6	6	100
MJ3	53	6	6	100
MJ4	44	6	6	100
MJ5	46	4	4	100
UBC807	48	7	7	100
UBC809	46	8	8	100
UBC826	58	7	7	100
UBC828	44	6	6	100

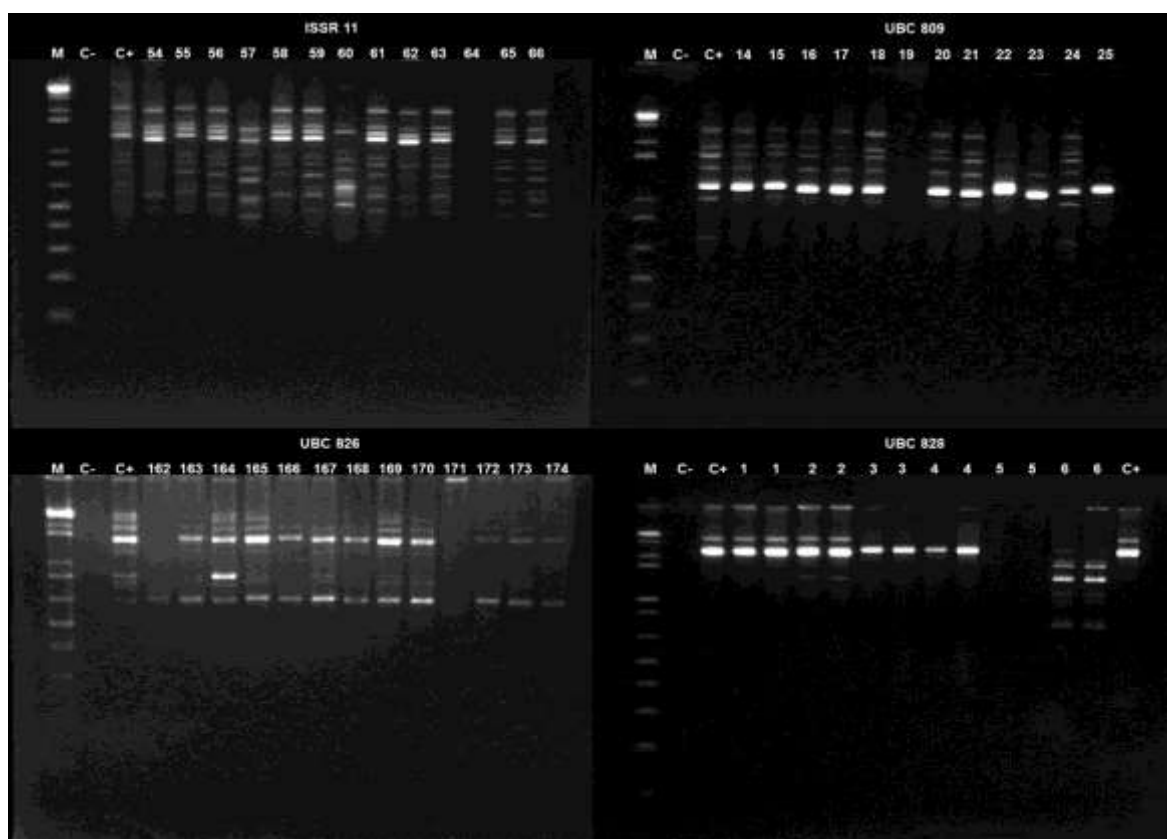


Figura 2.4. Fragmentos de DNA de *Corynespora cassiicola* amplificados por PCR utilizando marcadores ISSR. M: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). C-: Controle negativo. C+: Controle positivo.

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são fragmentos de DNA amplificados via PCR usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de sequência de microssatélites. As etapas de obtenção desses marcadores são a extração e amplificação via PCR do DNA, eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e visualização do polimorfismo por autorradiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida) ou por coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de agarose). As principais vantagens dos ISSR são a geração de grande número de bandas informativas por reação e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção do *primer* utilizado. A principal desvantagem é a dominância dos marcadores, não diferenciando os *locus* em heterozigose dos *locus* em homozigose. As principais aplicações são *Fingerprinting* (impressão genética), diversidade genética e análise filogenética (Bornet and Branchard, 2001, Faleiro, 2007, Godwin et al., 1997, Zietkiewicz et al., 1994).

Neste estudo os marcadores ISSR apresentaram boa resolução e capacidade de detectar polimorfismo, sendo que 100% dos fragmentos amplificados foram polimórficos. Esses resultados corroboram com os obtidos por Nghia et al. (2008) que utilizaram oito *primers* ISSR para avaliar características de 21 isolados de *C. cassiicola* obtidos de diferentes clones e plantios de seringueira na Malásia. Os autores relataram a amplificação de 106 fragmentos, destes, 91,5% foram polimórficos. Qi et al. (2011), utilizaram 16 *primers* ISSR e a região ITS para analisar as características morfológicas e moleculares de 22 isolados de *C. cassiicola* de diferentes hospedeiros coletados na China, e obtiveram 114 fragmentos amplificados, onde 89,4 % foram polimórficos. Estudos realizados por Ferreira (2014), avaliando a variabilidade genética de 169 isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiros do estado do Amazonas, a partir de oito marcadores ISSR, obtiveram 191 fragmentos amplificados com 100% de polimorfismo, apresentando boa resolução para análise da variabilidade intraespecífica dos isolados avaliados. O grau de polimorfismo do marcador pode determinar a eficiência deste em identificar a variação genética dentro da espécie (Grativol et al., 2011). Na literatura, encontram-se diversos trabalhos utilizando marcadores dominantes, inclusive os ISSR, os quais consideram/utilizam a porcentagem de *locus* polimórficos como medida de diversidade/variabilidade genética (Carvalho et al., 2012, Chen et al., 2006, Jesus et al., 2001, Nguyen et al., 2013). Neste sentido é possível concluir que há alta variabilidade genética nas populações de *C. cassiicola* avaliadas neste estudo.

A espécie fúngica *Corynespora cassiicola* é classificada como um Ascomycota mitospórico, esse grupo possui como principal característica a ausência de reprodução sexuada, apresentando apenas a produção de conídios (esporos assexuados). Logo, a alta variabilidade genética encontrada possivelmente está associada a processos de mutações espontâneas dentro das populações, visto que os isolados de *C. cassiicola* não sofrem recombinação regular o acumulo de mutações no genoma é uma fonte de variabilidade genética, o que é interessante do ponto de vista evolutivo, pois as alterações são passadas de uma geração para outra (Gould, 2010, Taylor et al., 1999).

As matrizes geradas após 10.000 randomizações no Teste de Mantel produziram os seguintes coeficientes de correlação cofenética: Dice 0,91 e Jaccard 0,90. O coeficiente de correlação cofenética estima o quanto o dendrograma está adequado às interações entre os acessos. O valor 1 significa que a relação entre os dados e o dendrograma é perfeita (May, 1999). Porém na literatura são utilizados diferentes valores de correlação cofenética. Parreira et al. (2016), Romesburg (1984) consideraram que valores maiores ou iguais a 0,80 são satisfatórios, já Vaz Patto et al. (2004) consideraram que valores acima de 0,56 representam um bom alinhamento entre as matrizes de dissimilaridade e agrupamento. Neste estudo, ambos os coeficientes de correlação cofenética (Dice e Jaccard) foram próximos, ambos com valores altos, demonstrando a confiabilidade nos resultados. Foi selecionada a matriz feita a partir do coeficiente de dissimilaridade de Dice para gerar os dendrogramas.

O dendrograma a partir da matriz gerada pelo coeficiente de dissimilaridade de Dice considerou os valores obtidos após as 10.000 randomizações pelo método UPGMA (Figura 2.5).

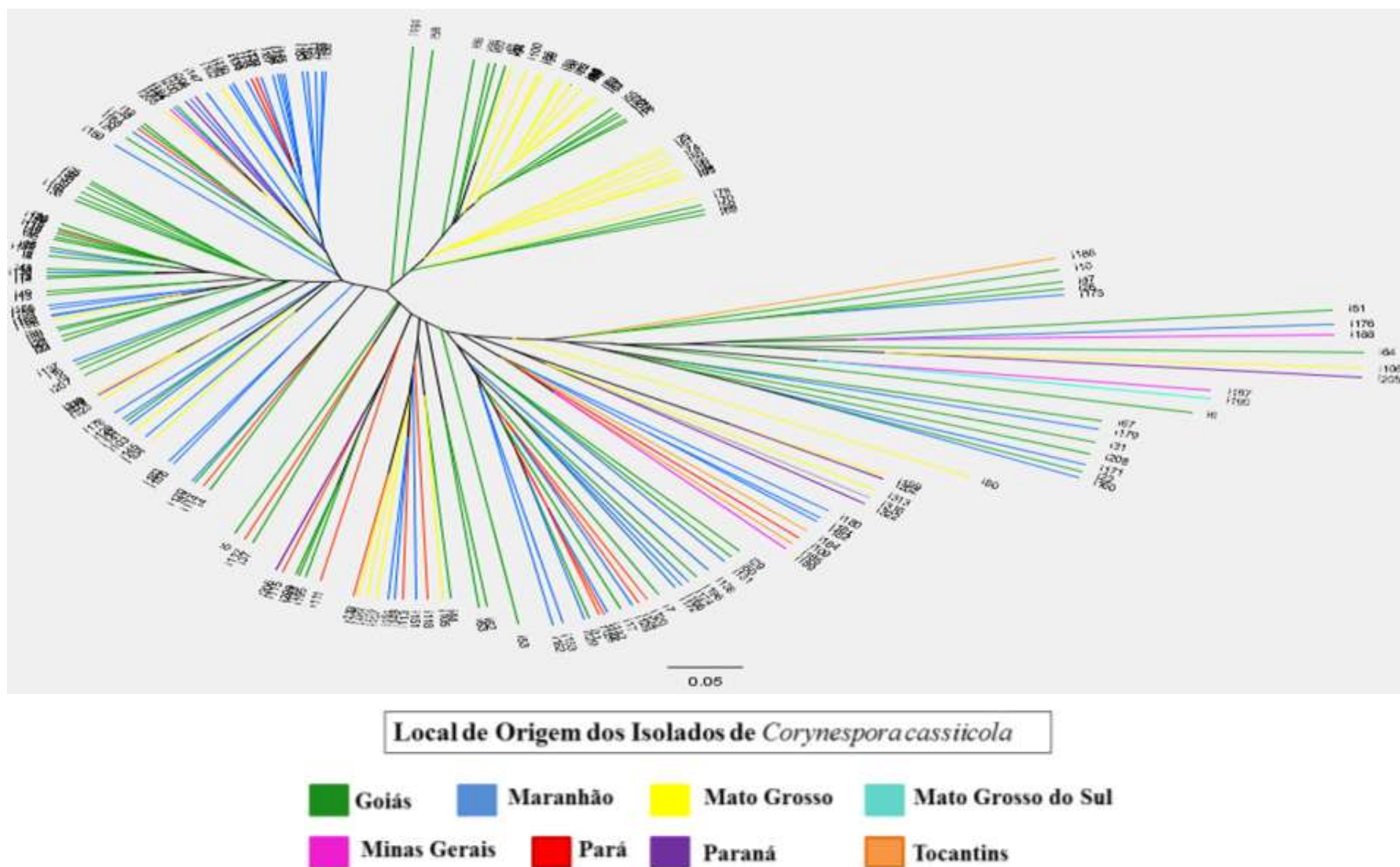


Figura 2.5. Dendrograma dos 203 isolados de *C. cassiicola* coletados em diferentes regiões e safras de soja no Brasil, baseado na similaridade de Dice e agrupados pelo método UPGMA com 10.000 randomizações.

Não foi observada uma formação clara de grupos atribuída ao estado, município ou safra de origem dos isolados de *C. cassiicola*. Na Figura 2.5 é possível observar uma distribuição aleatória de isolados de *C. cassiicola* coletados em diferentes regiões entre os clados.

Neste trabalho, a partir da utilização de marcadores ISSR foi encontrada uma grande variabilidade genética entre os isolados, corroborando com as inferências feitas por vários autores a respeito do polimorfismo encontrado com a utilização de marcadores moleculares (Ferreira, 2014, Hieu et al., 2014, Nghia et al., 2008, Qi et al., 2009, Silva et al., 2003, Silva et al., 1995). A variabilidade genética é uma condição presente em patossistemas silvestres preservados e é aumentada em agroecossistemas. A alteração dos cultivos por meio do melhoramento das espécies cultivadas, a ampliação de fronteiras agrícolas e o uso desmedido de defensivos sistêmicos são fatores que aumentam a força da seleção exercida sobre as populações de patógenos. Todos estes fatores favorecem novos genes, dentre eles os de virulência, e o aumento do polimorfismo na estrutura dessas populações de fitopatógenos (Araya, 2003).

A variabilidade de 24 isolados de *C. cassiicola* obtidos de vários clones de seringueira cultivados na China foi avaliada por meio de marcadores ISSR, gerando 103 fragmentos com o uso de 16 *primers*. Testes de patogenicidade e a análise de ISSR mostraram que não houve correlação entre a estrutura racial, a origem do patógeno e seus clusters, contudo a maioria dos isolados com diferentes níveis de patogenicidade compartilhavam os mesmos clados (Qi et al., 2009). Esses resultados se assemelham aos obtidos neste trabalho onde não houve diferenciação entre os clados formados pelos isolados de *C. cassiicola* com relação a origem (estado, município e safra).

Os valores de dissimilaridade genética (avaliada pelo coeficiente de dissimilaridade de Dice) variaram de 0 a 1, sendo que a menor dissimilaridade foi observada em 34 isolados, que não foram dissimilares, ou seja, se tratam de isolados idênticos geneticamente (clones) nos *locus* avaliados. A maior dissimilaridade foi observada entre 70 isolados que apresentaram a dissimilaridade máxima (1). Oliveira et al. (2007) estudando a diversidade genética entre acessos de açaizeiro encontraram valores de dissimilaridade variando de 0,06 a 0,67, demonstrando alta diversidade genética entre os acessos. Lorenzoni et al. (2014) avaliando a diversidade genética de 16 acessos de biribazeiro (*Rollinia mucosa*) a partir de 20 *primers* ISSR, encontraram valores de dissimilaridade genética variando de 0,0909 a 0,5147. Os autores atribuem essa alta dissimilaridade encontrada pelo fato desta ser uma frutífera ainda em processo

de domesticação. Diante do exposto, é possível inferir que os resultados de dissimilaridade genética, neste trabalho, refletem uma variabilidade genética alta entre os isolados de *C. cassiicola*. De acordo com Shimomoto et al. (2011) a variabilidade genética existente entre isolados de *C. cassiicola* deve-se, principalmente a ocorrência e acúmulo de mutações espontâneas.

Dal’Sasso (2017) estudando a relação entre as isoformas de cassiicolina e a estruturação filogenética dos isolados de *C. cassiicola*, relatou a ausência de recombinantes intragênicos entre as linhagens de isolados apontando para uma possível inexistência de ciclo sexual. Entretanto, a ausência de uma associação bem definida entre os as isoformas de cassiicolina e os clados filogenéticos formados, sugere uma possível permuta de isoformas entre as linhagens. A autora sugere que a avaliação de um número maior de isolados pode levantar evidências para uma possível sexualidade críptica ou recombinação parassexual em *C. cassiicola*, diante da alta variação genética existente dentro das linhagens. A fase de reprodução sexuada ainda não foi relatada para a espécie *C. cassiicola*, porém, os trabalhos de Sivanesan (1996) e Tanaka et al. (2005), demonstraram a ocorrência da fase teleomórfica para outras espécies do gênero *Corynespora*.

A análise de variância molecular (AMOVA) com os 203 isolados de *C. cassiicola*, foi realizada considerando a diferença entre estados (nove) (Tabela 2.4), entre municípios de origem (28 municípios) (Tabela 2.5), e por fim considerando a interferência da variação do componente município dentro do componente estado (para inferir quanto dessa variação atribuída a estado é originada dos diferentes municípios) (Tabela 2.6).

Tabela 2.4. Análise de variância molecular (AMOVA) entre estados de origem dos isolados de *C. cassiicola*.

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	FST	p -valor
Entre Estados	8	4,207404	0,1335	0,00
Erro	194	26,553582		
Total	202	30,760986		

Tabela 2.5. Análise de variância molecular (AMOVA) entre os municípios de origem dos isolados de *C. cassiicola*.

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	FST	p -valor
-------------------	----	--------------------	-----	----------

Entre Municípios	27	9,205859	0,2088382	0,00
Erro	175	21,555127		
Total	202	30,760986		

Tabela 2.6. Análise de variância molecular (AMOVA) avaliando o efeito do município e do estado de origem na variação global, e o efeito do “componente” município dentro da variação do estado de origem dos isolados de *C. cassicola*.

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	FST	p -valor
Estado no Global	8	4,207404	-0,10292100	0
Município no Global	19	4,998455	0,07468944	0
Município em Estado			0,16103640	0
Erro	175	21,555127		
Total	202	30,760986		

Os valores das diferenciações genéticas das populações de *C. cassicola* (F_{ST}) foram todos obtidos pela AMOVA, e foram significativos ($p < 0,001$) com probabilidades calculadas por 10.000 permutações ao acaso. O valor da diferenciação genética (F_{ST}) de populações de *C. cassicola* entre estados foi 0,1335. Já o valor da diferenciação genética entre município de origem foi de 0,20883. Por meio da AMOVA, foi possível observar que ao se avaliar o estado de origem, isoladamente, explica-se 13,35% da variação genética. Quando avaliado o município de origem, esse explica 20,88% da variação genética das populações de *C. cassicola*.

Na análise global é possível observar que da variação total observada, 7,46% são explicados pelo município de origem, e 16,10% da variação encontrada dentro dos estados é explicada pelo município de origem. Podendo-se compreender a variação atribuída a município de origem como “dentro” de populações e a variação entre os estados de origem como “entre populações”. Em estudos realizados por Ferreira (2014) avaliando a variabilidade genética de nove populações de *C. cassicola* de diferentes hospedeiros, observou que a maior variação genética estava dentro das populações, com 84,3% da variação total, e os 15,7% da variação genética restante foram observados entre populações.

A análise de coordenadas principais (PCoA) reduziu a dimensionalidade dos dados e permitiu a observação da estrutura espacial das populações de *C. cassicola* quanto à sua distribuição (Figura 2.6). Desse modo, é possível observar que grande parte dos isolados se agrupa em dois grupos principais de distribuição espacial, porém vários outros isolados se distribuem numa “faixa intermediária” e aleatória sem

agrupamento. É possível observar que apesar de uma aparente estruturação, existem isolados intermediários distribuídos espacialmente independentes do município, estado ou safra de origem.

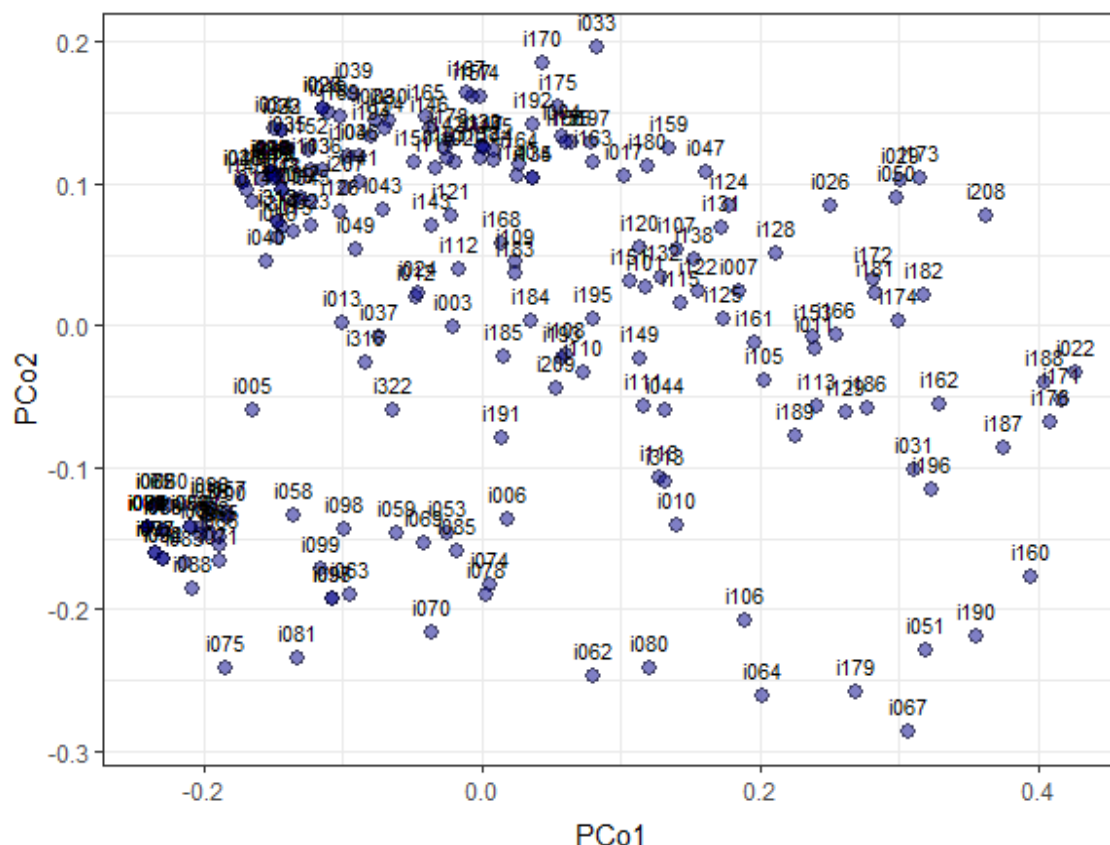


Figura 2.6. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) em populações de *Corynespora cassiicola* provenientes de plantas de soja do Brasil.

Neste estudo avaliando a diversidade genética de isolados provenientes de soja de diferentes origens e safras do Brasil, observa-se que os isolados não apresentaram uma estruturação e agrupamentos tão evidentes. Na literatura vários autores estudaram a variabilidade genética de isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiros, obtendo uma estruturação populacional maior, o que sugere que o hospedeiro pode interferir diretamente na estruturação de populações de *C. cassiicola*. Como no trabalho realizado por Ferreira (2014), que avaliou a diversidade de 169 isolados de *C. cassiicola* de diferentes hospedeiros e regiões do estado do Amazonas, a partir do uso de oito *primers* de marcadores ISSR, que apresentaram boa resolução para a avaliação da variabilidade intraespecífica em *C. cassiicola*, revelando a elevada variabilidade genética existente nas populações estudadas. Neste trabalho detectou-se 4

grupos genéticos com mistura de genótipos nos grupos 2 e 3, sugerindo fluxo gênico com estruturação por hospedeiro no grupo 1(mamão) e 4(tomate). Segundo o autor a população está estruturada, com grande diferenciação entre elas. A grande diversidade genética relatada se assemelha a obtida no presente trabalho, sendo que, para isolados provenientes apenas de um hospedeiro (soja), a diversidade genética foi alta, e foram detectados 5 grupos genéticos, sugerindo também, um fluxo gênico entre populações de isolados de diferentes origens, devido a ausência de grupos distintos associados a regiões.

O dendrograma baseado na dissimilaridade genética (Figura 2.5) demonstrou que não existe uma estruturação forte nas populações de *C. cassiicola*, esse comportamento também pôde ser observado nos resultados da análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Figura 2.6). Foi possível observar grande variabilidade genética nas populações de *C. cassiicola* ao longo dos município, estados e safras de origem. Em trabalho realizado por Dal'Sasso (2017) avaliando a diversidade genética entre 32 isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes locais no Brasil relatou a ausência de correlação entre dados filogenéticos e a origem geográfica, reforçando a hipótese de um movimento global recente de isolados de *C. cassiicola* proposta por Dixon et al. (2009).

Na AMOVA foi possível observar uma estruturação para estado e município de origem, porém a mistura entre os grupos genéticos nas diferentes localidades sugere a ocorrência de fluxo gênico entre as populações de *C. cassiicola* causadoras de mancha-alvo em soja. O fluxo gênico é um processo no qual, alelos específicos (genes) ou indivíduos (genótipos) são trocados entre populações separadas geograficamente. Para organismos estritamente assexuais (que não recombina genes), genótipos inteiros podem ser trocados entre populações (Boeger et al., 1993, McDonald and Linde, 2002b). De acordo com McDonald and Linde (2002b), o fluxo genético / genotípico é o processo que move alelos e genótipos mutantes virulentos entre diferentes populações de campo. Espera-se que os patógenos que exibem um alto grau de fluxo de gene / genótipo tenham maior diversidade genética do que os patógenos com baixos graus de fluxo gene / genótipo, porque o alto fluxo de genes / genótipos aumenta não só o tamanho da população, mas também a diversidade da vizinhança genética dentro das populações.

Apesar de a AMOVA apontar uma estruturação média por estado e alta por município de origem, não foram formados grupos de isolados de *C. cassiicola*

fortemente estruturados vinculados à origem, podendo indicar assim um forte fluxo gênico/genotípico entre as populações de *C. cassiicola*. Isto pode ser explicado pelo fato de que o inóculo do fungo é mantido/disperso por restos culturais, sementes/grãos infectados, além de essa espécie apresentar a produção de clamidósporos, células de resistência com parede celular espessa que permitem a sobrevivência do fungo no campo por longos períodos (Figura 2.7). Ou seja, a partir dos restos culturais e da presença de clamidósporos é possível que o isolado se mantenha infestando uma área por longos períodos. A partir das sementes/grãos infectados é possível a ocorrência de dispersão por longas distâncias. Logo se associado ao modelo de transporte das safras de grãos do país (prioritariamente rodoviário), e ao fato que vários grãos são perdidos ao longo das estradas (e esses podem estar contaminados). A manutenção de um grupo de isolados no campo e a entrada frequente de novos isolados das mais diversas regiões do país através de sementes/grãos contaminados poderia explicar esse intenso fluxo gênico entre diferentes populações de *C. cassiicola* ao longo das regiões produtoras de soja do país, apesar de uma prévia estruturação local. Outro fator que pode interferir diretamente na diversidade genética do fungo, é ampla gama de hospedeiros (mais de 402 espécies) “alternativos” dentre eles plantas daninhas, o que dificulta o manejo da doença.

Essas inferências corroboram com os resultados obtidos nos estudos de McDonald and Linde (2002b), que afirmam que o tamanho da vizinhança genética pode ser afetado por atividades antrópicas. Os seres humanos podem mover muitos patógenos para além de seus limites naturais de dispersão através de práticas agrícolas e intercontinentais viagens e comércio. Assim, o grau real de fluxo de gene / genótipo pode ser muito maior do que o esperado com base nos traços da história de vida. Os autores levantam ainda a hipótese de que o fluxo gênico envolvendo propágulos assexuados (fluxo genotípico) representa um risco maior que o movimento de propágulos sexuais (fluxo gênico), porque o propágulo assexuado representa um pacote vinculado de alelos coadaptados que já foi selecionado.

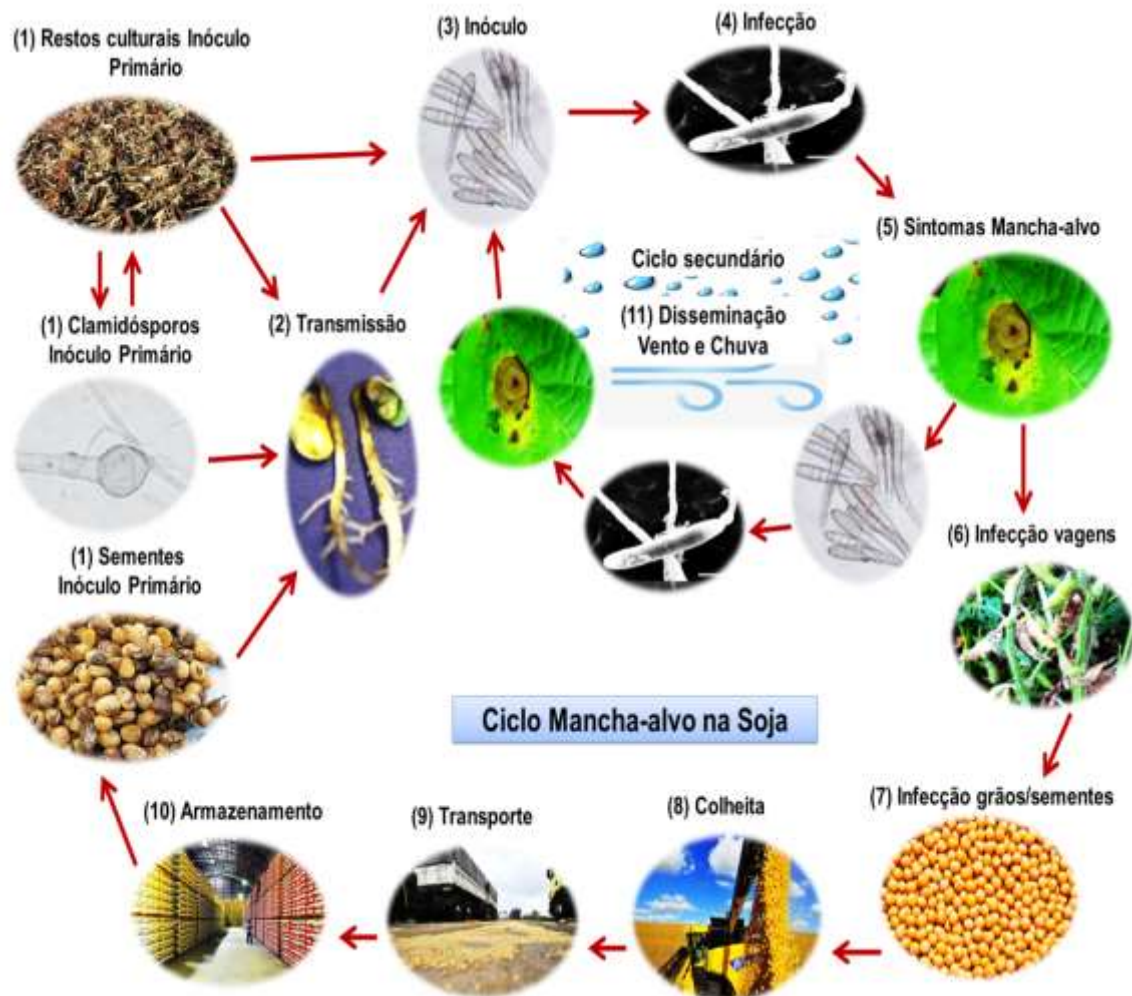


Figura 2.7. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro de *Corynespora cassiicola* em soja. (Jesus; Cunha, 2018).

Diante disso, a vasta gama de hospedeiros alternativos, a grande variabilidade genética e a ocorrência de fluxo genotípico (organismos assexuados) dificultam o manejo da mancha-alvo nos agrossistemas. Os intensos processos de seleção direcional dos isolados por meio de frequentes aplicações de fungicidas para o controle de doenças, principalmente da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), no caso da soja, podem explicar a diferenciação e estruturação de subpopulações de *C. cassiicola*. A possível pressão de seleção e consequente variação da sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* a diferentes fungicidas utilizados no controle químico da ferrugem-asiática serão abordados no próximo capítulo (Capítulo 3).

2.5 CONCLUSÕES

- 1- A variabilidade genética entre os isolados de *C. cassiicola* é alta.
- 2- Marcadores ISSR são eficientes na determinação da variabilidade de *C. cassiicola*.
- 3- Os isolados de *C. cassiicola*, causadores de mancha-alvo em soja, utilizados no presente trabalho apresentam estruturação geográfica no Brasil, com indícios de ocorrência de intenso fluxo gênico entre as populações.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, N. & OKU, T. 2000. PCR-mediated Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Amplification of the 16S–23S rDNA Spacer Region Sequence. *Journal of General Plant Pathology*, 66, 303-309.
- AGUIAR, F. M. 2015. *Caracterização de isolados de Corynespora cassiicola e avaliação da sensibilidade in vitro a fungicidas*. Doctor, Universidade de Brasília.
- ALFENAS, A. C. & MAFIA, R. G. 2016. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa, UFV.
- ALMEIDA, A. M. R., MACHADO, C. C., FERREIRA, L. P., LEHMAN, P. S. & ANTONIO, H. 1976. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 1, 111-112.
- ARAYA, C. M. 2003. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 221-228.
- AYAD, W. G., HODGKIN, T., JARADAT, A. & RAO, V. R. 1997. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*, Rome, International Plant Genetic Resources Institute.
- BOEGER, J., CHEN, R. & MCDONALD, B. 1993. Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. *Phytopathology*, 83, 1148-1154.
- BORNET, B. & BRANCHARD, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter*, 19, 209-215.
- BURDON, J. & SILK, J. 1997. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*, 87, 664-669.
- CARVALHO, R. S., PINTO, J. F. N., REIS, E. F., SANTOS, S. C. & DIAS, L. A. S. 2012. Variabilidade genética de cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile* st. hill.) por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34, 227-233.
- CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42, 225-226.
- CHEN, J. M., GITURU, W. R., WANG, Y. H. & WANG, Q. F. 2006. The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): comparative results for RAPD and ISSR markers. *Aquatic Botany*, 84, 301-307.
- CHEN, S., CAO, Y.-Y., LI, T.-Y. & WU, X.-X. 2015. Simultaneous detection of three wheat pathogenic fungal species by multiplex PCR. *Phytoparasitica*, 43, 449-460.

- CHO, H. J., HONG, S. W., KIM, H. & KWAK, Y.-S. 2016. Development of a Multiplex PCR Method to Detect Fungal Pathogens for Quarantine on Exported Cacti. *The Plant Pathology Journal*, 32, 53-57.
- CUTRIM, F. A. & SILVA, G. S. 2003. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 193-194.
- DAL'SASSO, T. C. S. 2017. *Filogeografia Molecular de Corynespora cassiicola, um fungo polífago e causador da Mancha-Alvo*. Magister Scientiae em Genética e Melhoramento, UFV.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J. & HICKS, J. B. 1983. A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- DIXON, L. J., SCHLUB, R. L., PERNEZNY, K. & DATNOFF, L. E. 2009. Host Specialization and Phylogenetic Diversity of *Corynespora cassiicola*. *PHYTOPATHOLOGY* 99, 1015-1027.
- DUARTE, M. L. R., ASANO, S. & ALBUQUERQUE, F. C. 1981. *Estudo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de Corynespora cassiicola (Berk & Curt) Wei*, Belém, CPATU/EMBRAPA.
- ELLIS, M. & HOLLIDAY, P. 1971. *Corynespora cassiicola* CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 303, 1-2.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- FALEIRO, F. G. 2007. *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*, Planaltina, DF, Embrapa Cerrados.
- FARR, D. F. & ROSSMAN, A. Y. 2018. *Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA* [Online]. Available: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases> [Accessed 10 de novembro 2018].
- FERREIRA, A. F. T. A. F. 2014. *Diversidade genética e estrutura de população entre isolados de Corynespora cassiicola no estado do Amazonas*. Mestrado Universidade Federal do Amazonas.
- FERREIRA, M. E. & GRATAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em análise genética*, Brasília, Embrapa - Cenargen.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. & BRISCOE, D. 2008. *Fundamentos de genética da conservação*, Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.
- GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M., MEYER, M. C., CAMPOS, H. D., PIMENTA, C. B. & MIGUEL-WRUCK, D. S. 2017. *Eficiência de Fungicidas para o Controle da Mancha-Alvo, Corynespora cassiicola, na Safra 2016/17*:

- GODWIN, I. D., AITKEN, E. A. B. & SMITH, L. W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18, 1524-1528.
- GOULD, A. B. 2010. Fungos fitopatogênicos e oomicetos. In: TRIGIANO, R. N., WINDHAM, M. T. & WINDHAM, A. S. (eds.) *Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed.
- GRATIVOL, C., L., M. C. F., HEMERLY, A. S. & FERREIRA, P. C. G. 2011. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. *Molecular*, 38, 4245–4256.
- HIEU, N. D., NGHIA, N. A., CHI, V. T. Q. & DUNG, P. T. 2014. Genetic Diversity and Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Trees and Other Hosts in Vietnam. *Journal of Rubber Research*, 17.
- JESUS, F. F., SOLFERINI, V. N., SEMIR, J. & PRADO, P. I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plants Systematics and Evolution*, 226, 59-68.
- KRUGNER, T. & BACCHI, L. 1995. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H. & AMORIM, L. (eds.) *Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos*. São Paulo: Ceres Agronomica.
- KURT, S. 2005. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*, the target leaf spot pathogen. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8, 618-621.
- LORENZONI, R. M., SOARES, T. C. B., SANTIAGO, V. F., SILVA, J. A. & COELHO, R. I. 2014. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de Biribazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 251-257.
- MAY, A. C. W. 1999. Towards more meaningful hierarchical classification of amino acid scoring matrices. *Protein Engineering*, 12, 707-712.
- MCDONALD, B. A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87, 448-453.
- MCDONALD, B. A. & LINDE, C. 2002a. Pathogen population genetics and the durability of disease resistance. *Euphytica*.
- MCDONALD, B. A. & LINDE, C. 2002b. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual review of phytopathology*, 40, 349-379.
- MCDONALD, B. A. & MCDERMOTT, J. M. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*, 311-319.

- MILGROOM, M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual review of phytopathology*, 34, 457-477.
- NEI, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 3321-3323.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- NGHIA, N. A., KADIR, J., SUNDERASAN, E., ABDULLAH, M. P., MALIK, A. & NAPIS, S. 2008. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. *Mycopathologia*, 166, 189-201.
- NGUYEN, H. T. T., CHOI, K. S. & PARK, S. J. 2013. Genetic diversity and differentiation of a narrowly distributed and endemic species, *Aster spathulifolius* maxim (Asteraceae), revealed with inter simple sequence repeat markers. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56, 255-262.
- OLIVEIRA, M. S. P., AMORIM, E. P., SANTOS, J. B. & FERREIRA, D. F. 2007. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, 1.645-1.653.
- PARREIRA, D. F., ZAMBOLIM, L., GOMES, E. A., COSTA, R. V., SILVA, D. D., LANA, U. G. D. P., NEVES, W. D. S., FIGUEIREDO, J. E. F. & COTA, L. V. 2016. Diversidade genética estimada através de Marcadores ISSR de *Colletotrichum graminicola* no Brasil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 15, 186-194.
- POTRYKUS, M., SLEDZ, W., GOLANOWSKA, M., SLAWIAK, M., BINEK, A., MOTYKA, A., ZOLEDOWSKA, S., CZAJKOWSKI, R. & LOJKOWSKA, E. 2014. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *The Annals of Applied Biology*, 165, 474-487.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- PUJADE-RENAUD, V. 2007. Cassiicolin, a toxin produced by a pathogenic fungus of rubber trees. *CIRAD - Preventing and Managing Health Risks*, 82, 29-30.
- QI, Y.-X., ZHANG, X., PU, J.-J., LIU, X.-M., LU, Y., ZHANG, H., ZHANG, H.-Q., LV, Y.-C. & XIE, Y.-X. 2011. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 130, 83-95.

- QI, Y., XIE, Y., ZHANG, X., PU, J., ZHANG, H., HUANG, S. & ZHANG, H. 2009. Molecular and Pathogenic Variation Identified Among Isolates of *Corynespora cassiicola*. *Molecular Biotechnology*, 41, 145-151.
- R, C. T. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: COMPUTING, R. F. F. S. (ed.) 3.4.1 ed. Vienna.
- RAMALHO, M. A. P., SANTOS, J. B., PINTO, C. A. B. P., SOUZA, E. A., GONÇALVES, F. M. A. & SOUZA, J. C. 2012. *Genética na Agropecuária*, Lavras, UFLA.
- REIS, A. R. & BOITEUX, L. 2007. *Mancha-de-corynespora do tomateiro*, Brasília, DF, Embrapa Hortaliças
- REIS, E. M., REIS, A. C. & CARMONA, M. A. 2010. *Manual De Fungicidas – Guia Para o Controle Químico de Doenças de Plantas*, Passo Fundo, UPF.
- RIBEIRO, F. D. C., COLOMBO, G. A., CARVALHO, E. V. D., PELÚZIO, J. M. & ERASMO, E. A. L. 2017. Controle Químico Da Mancha-Alvo da Soja (*Corynespora cassiicola*) no Cerrado Tocantinense-Brasil. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 4, 26-36.
- ROMESBURG, H. C. 1984. *Cluster analysis for researchers*, Belmont, Lifetime Learning Publishers.
- SERRA, I. S., PROCACCINI, G., INTRIERI, M. C., MIGLIACCIO, M., MAZZUCA, S. & INNOCENTI, A. M. 2007. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, 338, 71–79.
- SHIMOMOTO, Y., SATO, T., HOJO, H., MORITA, Y., TAKEUCHI, S., MIZUMOTO, H. & AL., E. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathology*, 60, 253-260.
- SILVA, W. P. K., DEVERALL, B. J. & LYON, B. R. 1998. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology*, 47, 267-277.
- SILVA, W. P. K., KARUNANAYAKE, E. H., WIJESUNDERA, R. L. C. & PRIYANKA, U. M. S. 2003. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. *Mycological research*, 107, 567-571.
- SILVA, W. P. K., MULTANI, D. S., DEVERALL, B. J. & LYON, B. R. 1995. RFLP and Rapd Analyses in the Identification and Differentiation of Isolates of the Leaf Spot Fungus. *Australian Journal of Botany*, 43, 609–618.
- SIVANESAN, A. 1996. *Corynesporasca caryotae* gen. et sp. nov. with a *Corynespora* anamorph, and the family Corynesporascaceae. *Mycological Research* 100, 783-788.

- SIVIERO, A. & ASSIS, L. A. G. 1993. Especificidade de isolados de *Corynespora cassiicola* da região de Manaus. *Fitopatologia Brasileira*, 18, 324.
- SNOW, J. & BERGGREN JÚNIOR, G. 1989. Target spot. In: SINCLAIR, J. & BACKMAN, P. (eds.) *Compendium of Soy bean Diseases*. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- SOUSA, F. M. G. & BENTES, J. L. D. S. 2014. Variabilidade de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei procedentes do Amazonas, em meios de cultura. *Summa Phytopathologica*, 40, 84-87.
- TANAKA, K., OOKI, Y., HATAKEYAMA, S., HARADA, Y. & BARR, M. E. 2005. Pleosporales in Japan (5): Pleomassaria, Asteromassaria, and Splanchnonema. *Mycoscience*, 46, 248-260.
- TAYLOR, J., JACOBSON, D. & FISHER, M. 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual review of phytopathology*, 37, 197-246.
- TERAMOTO, A., MARTINS, M. C. & CUNHA, M. G. 2011. Avaliação de Métodos para preservação de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41, 296-298.
- VAZ PATTO, M. C., SATOVIC, Z., PÊGO, S. & FEVEREIRO, P. 2004. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, 137, 63-72.
- VEIGA, P. 1978. Mancha-alvo: uma nova doença no Rio Grande do Sul. *Revista Centro Ciências Rurais*, 8, 79-82.
- WEI, C. T. 1950. Notes on *Corynespora*. *Mycological Papers*, 30, 10.
- WELSH, J. & MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213-7218.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SHINSKY, J. J. & WHITE, T. J. (eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic.
- WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- ZHAN, J., MUNDT, C. C., HOFFER, M. E. & MCDONALD, B. A. 2002. Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 634-647.

- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. & LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.
- ZUCCHI, M. I. 2002. *Análise da estrutura genética de Eugenia dysenterica DC utilizando marcadores RAPD e SSR*. Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP.

2.7 APÊNDICES

Tabela 2.1. Origem dos isolados de *Corynespora cassiicola*

Trat.	Código na coleção do NPF	Código Molecular	Ano do Isolamento/Safra	Município/Estado
1	GO-13-1-3	1	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
2	GO-13-1-4	2	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
3	GO-13-1-5	3	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
4	GO-13-1-6	4	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
5	GO-13-1-8	5	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
6	GO-13-1-9	6	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
7	GO-13-1-10	7	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
8	GO-13-1-11	8	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
9	GO-13-1-13	9	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
10	GO-13-1-14	10	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
11	GO-13-1-15	11	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
12	GO-13-1-17	12	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
13	GO-13-1-18	13	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
14	GO-13-1-19	14	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
15	GO-13-1-20	15	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
16	GO-13-1-21	16	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
17	GO-13-1-22	17	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
18	GO-13-1-23	18	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
19	GO-13-1-27	19	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
20	GO-13-1-32	20	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
21	GO-13-1-33	21	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
22	GO-13-1-35	22	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
23	GO-13-1-36	23	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
24	GO-13-1-38	24	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
25	GO-13-1-41	25	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
26	GO-13-1-42	26	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
27	GO-13-1-43	27	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
28	GO-13-1-44	28	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
29	GO-13-1-55	29	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
30	GO-13-1-56	30	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
31	GO-13-1-57	31	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
32	GO-13-1-58	32	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
33	GO-13-1-59	33	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
34	GO-13-1-60	34	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
35	GO-13-1-62	35	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
36	GO-13-1-63	36	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
37	GO-13-1-70	37	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
38	GO-13-1-74	38	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
39	GO-13-1-76	39	Safra 2012/2013	Santo Antônio /GO
40	GO-12-2-1	40	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
41	GO-12-2-2	41	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
42	GO-12-2-3	42	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
43	GO-12-2-4	43	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
44	GO-12-2-5	44	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
45	GO-12-2-6	45	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
46	GO-12-2-7	46	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
47	GO-12-2-8	47	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
48	GO-12-2-9	48	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO

49	GO-12-2-10	49	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
50	GO-12-2-11	50	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
51	GO-12-2-12	51	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
52	GO-12-2-13	52	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
53	GO-12-2-14	53	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
54	GO-12-2-15	54	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
55	GO-12-2-16	55	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
56	GO-12-2-17	56	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
57	GO-12-2-18	57	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
58	GO-12-2-19	58	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
59	GO-12-2-20	59	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
60	GO-12-2-21	60	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
61	GO-12-2-22	61	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
62	GO-12-2-23	62	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
63	GO-12-2-24	63	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
64	GO-12-2-25	64	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
65	GO-12-2-26	65	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
66	GO-12-2-27	66	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
67	GO-12-2-28	67	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
68	GO-12-2-29	68	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
69	GO-12-2-30	69	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
70	GO-12-2-31	70	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
71	GO-12-2-32	71	Safra 2011/2012	Morrinhos/GO
72	MT-12-1-1	72	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
73	MT-12-1-2	73	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
74	MT-12-1-3	74	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
75	MT-12-1-4	75	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
76	MT-12-1-6	77	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
77	MT-12-1-7	78	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
78	MT-12-1-8	79	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
79	MT-12-1-9	80	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
80	MT-12-1-10	81	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
81	MT-12-1-11	82	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
82	MT-12-1-12	83	Safra 2011/2012	Nova Xavantina/MT
83	MT-13-2-1	84	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
84	MT-13-2-10	85	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
85	MT-13-2-11	86	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
86	MT-13-2-12	87	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
87	MT-13-2-13	88	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
88	MT-13-2-2	89	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
89	MT-13-2-3	90	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
90	MT-13-2-4	91	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
91	MT-13-2-5	92	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
92	MT-13-2-6	93	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
93	MT-13-2-7	94	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
94	MT-13-2-8	95	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
95	MT-13-2-9	96	Safra 2012/2013	Nova Xavantina/MT
96	MT-12-4-1	97	Safra 2011/2012	Sorriso/MT
97	MT-12-4-2	98	Safra 2011/2012	Sorriso/MT
98	MT-12-4-3	99	Safra 2011/2012	Sorriso/MT
99	MT-12-4-4	100	Safra 2011/2012	Sorriso/MT
100	MT-12-3-1	101	Safra 2011/2012	Querência/MT
101	MT-12-3-2	102	Safra 2011/2012	Querência/MT
102	MT-12-3-3	103	Safra 2011/2012	Querência/MT
103	MT-12-7-1	104	Safra 2011/2012	Barra do Garças/MT

104	MT-12-7-2	105	Safra 2011/2012	Barra do Garças/MT
105	MT-12-5-1	106	Safra 2011/2012	Sinop/MT
106	MT-12-5-2	107	Safra 2011/2012	Sinop/MT
107	MT-13-1-1	108	Safra 2012/2013	Vera/MT
108	PA-13-1-1	109	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
109	PA-13-1-9	110	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
110	PA-13-1-10	111	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
111	PA-13-1-11	112	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
112	PA-13-1-12	113	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
113	PA-13-1-2	114	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
114	PA-13-1-3	115	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
115	PA-13-1-4	116	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
116	PA-13-1-5	117	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
117	PA-13-1-6	118	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
118	PA-13-1-7	119	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
119	PA-13-1-8	120	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
120	PA-13-1-13	121	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
121	PA-13-1-14	122	Safra 2012/2013	Paragominas/PA
122	PA-12-1-1	123	Safra 2011/2012	Paragominas/PA
123	PA-12-1-2	124	Safra 2011/2012	Paragominas/PA
124	PA-12-1-3	125	Safra 2011/2012	Paragominas/PA
125	PA-12-1-4	126	Safra 2011/2012	Dom Eliseu/PA
126	MA-13-1-2	128	Safra 2012/2013	Riachão/MA
127	MA-13-1-3	129	Safra 2012/2013	Riachão/MA
128	MA-13-1-4	130	Safra 2012/2013	Riachão/MA
129	MA-13-1-5	131	Safra 2012/2013	Riachão/MA
130	MA-13-1-6	132	Safra 2012/2013	Riachão/MA
131	MA-13-1-7	133	Safra 2012/2013	Riachão/MA
132	MA-13-1-8	134	Safra 2012/2013	Riachão/MA
133	MA-13-1-9	135	Safra 2012/2013	Riachão/MA
134	MA-13-1-10	136	Safra 2012/2013	Riachão/MA
135	MA-13-1-11	137	Safra 2012/2013	Riachão/MA
136	MA-13-1-12	138	Safra 2012/2013	Riachão/MA
137	MA-13-1-14	140	Safra 2012/2013	Riachão/MA
138	MA-13-1-15	141	Safra 2012/2013	Riachão/MA
139	MA-13-1-16	142	Safra 2012/2013	Riachão/MA
140	MA-13-1-17	143	Safra 2012/2013	Riachão/MA
141	MA-13-1-18	144	Safra 2012/2013	Riachão/MA
142	MA-13-1-19	145	Safra 2012/2013	Riachão/MA
143	MA-13-1-20	146	Safra 2012/2013	Riachão/MA
144	MA-13-1-21	147	Safra 2012/2013	Riachão/MA
145	MA-13-2-1	148	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
146	MA-13-2-2	149	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
147	MA-13-2-3	150	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
148	MA-13-2-4	151	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
149	MA-13-2-5	152	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
150	MA-13-2-6	153	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
151	MA-13-2-7	154	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA

152	MA-13-2-8	155	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
153	MA-13-2-9	156	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
154	MA-13-2-10	157	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
155	MA-13-2-11	158	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
156	MA-13-2-12	159	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
157	MA-13-2-13	160	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
158	MA-13-2-14	161	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
159	MA-13-2-15	162	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
160	MA-13-2-16	163	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
161	MA-13-2-17	164	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
162	MA-13-2-18	165	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
163	MA-13-2-19	166	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
164	MA-13-2-20	167	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
165	MA-13-2-21	168	Safra 2012/2013	São Raimundo das Mangabeiras/MA
166	MA-13-3-1	169	Safra 2012/2013	Tasso Fragoso/MA
167	MA-13-3-2	170	Safra 2012/2013	Tasso Fragoso/MA
168	MA-13-3-3	171	Safra 2012/2013	Tasso Fragoso/MA
169	MA-13-3-4	172	Safra 2012/2013	Tasso Fragoso/MA
170	MA-13-3-5	173	Safra 2012/2013	Tasso Fragoso/MA
171	MA-13-3-6	174	Safra 2012/2013	Tasso Fragoso/MA
172	MA-13-3-7	175	Safra 2012/2013	Tasso Fragoso/MA
173	MA-13-3-8	176	Safra 2012/2013	Tasso Fragoso/MA
174	MA-12-3-1	178	Safra 2011/2012	Tasso Fragoso/MA
175	MA-12-3-2	179	Safra 2011/2012	Tasso Fragoso/MA
176	MA-12-3-3	180	Safra 2011/2012	Tasso Fragoso/MA
177	MA-12-3-4	181	Safra 2011/2012	Tasso Fragoso/MA
178	MA-12-3-5	182	Safra 2011/2012	Tasso Fragoso/MA
179	MA-12-3-6	183	Safra 2011/2012	Tasso Fragoso/MA
180	TO-12-1-1	184	Safra 2011/2012	Pedro Afonso/TO
181	TO-12-1-2	185	Safra 2011/2012	Pedro Afonso/TO
182	TO-12-1-3	186	Safra 2011/2012	Pedro Afonso/TO
183	MG-12-1-1	187	Safra 2011/2012	Tupaciguara/MG
184	MG-12-1-2	188	Safra 2011/2012	Tupaciguara/MG
185	MG-12-1-3	189	Safra 2011/2012	Tupaciguara/MG
186	MS-12-1-1	190	Safra 2011/2012	Maracaju/MS
187	GO-12-4-1	191	Safra 2011/2012	Rio Verde/GO
188	GO-12-4-5	192	Safra 2011/2012	Montividiu/GO
189	GO-12-4-2	193	Safra 2011/2012	Rio Verde/GO
190	GO-12-4-6	194	Safra 2011/2012	Montividiu/GO
191	GO-13-3-1	195	Safra 2012/2013	Porangatu/GO
192	GO-13-3-2	196	Safra 2012/2013	Porangatu/GO

193	MG-13-2-1	197	Safra 2012/2013	Sacramento/MG
194	GO-12-4-3	207	Safra 2011/2012	Rio Verde/GO
195	GO-12-4-4	208	Safra 2011/2012	Rio Verde/GO
196	GO-13-5-1	209	Safra 2012/2013	São Miguel/GO
197	312	312	Safra 1997/98	Itiquira/MT
198	313	313	Safra 1997/98	Nova Mutum/MT
199	316	316	Safra 1998/99	Equador
200	317	317	Safra 1998/99	Palotina/PR
201	318	318	Safra 1998/99	Campo Novo Parecis/MT
202	322	322	Safra 2000/01	Boa Ventura de São Roque/PR
203	323	323	Safra 2000/01	Sapezal/MT
Total	203 isolados			28 municípios

3 SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* A FUNGICIDAS UTILIZADOS NO MANEJO DA FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA

3.1 RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), pertencente à família das Fabáceas, é originária do continente asiático. A sojicultura representa grande importância para a economia do Brasil, segundo maior produtor e líder das exportações de soja no mundo. A ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) é a principal doença da cultura no país e, nos últimos anos, intensificou-se a aplicação de fungicidas para o seu controle, consequentemente impactando os demais patógenos, dentre eles *Corynespora cassiicola*. A mancha-alvo (*C. cassiicola*) tornou-se uma importante doença na maioria das regiões produtoras de soja no Brasil. É necessário o monitoramento de populações do patógeno para detectar o surgimento de isolados resistentes aos principais fungicidas utilizados na cultura da soja. Diante disso, objetivou-se a determinar as EC₅₀ e EC₉₈ de sete fungicidas (cyproconazol, difeconazol, tebuconazol, trifloxistrobina + tebuconazol, trifloxistrobina + prothioconazol, epoxiconazol + piraclostrobina e epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina) empregados no controle da ferrugem-asiática, frente a isolados “selvagens” de *C. cassiicola* (coletados em safras que antecedem o emprego de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática); avaliar (a partir da EC₅₀ e EC₉₈) a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* coletados de áreas onde têm sido realizadas sistemáticas aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática. Para a avaliação da sensibilidade de sete isolados “selvagens” e determinação das EC’s, foram utilizadas sete concentrações dos fungicidas (0,0; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0% de i.a.) que foram adicionados ao meio de cultura BDA, com quatro repetições, o experimento foi conduzido em esquema fatorial (7x7) e após dez dias mensurou-se o crescimento micelial. A determinação das EC’s foi feita a partir da análise da regressão entre o crescimento micelial de *C. cassiicola* (variável dependente) e a concentração do fungicida (variável independente). Após o cálculo das EC’s, a sensibilidade das populações de *C. cassiicola*, foi estimada. Cada isolado foi submetido a três dosagens (0, EC₅₀ e EC₉₈) de cada um dos sete fungicidas com quatro repetições, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). O patógeno mostrou variabilidade na sensibilidade aos grupos fungicidas triazóis (DMI) e estrobilurinas (QoI), o que demonstra alto risco de seleção para resistência.

Palavras-chave: Mancha-alvo; *Glycine max* (L.) Merrill; Redução da sensibilidade a fungicidas; Concentração Efetiva (EC₅₀ e EC₉₈).

3.2 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), pertencente à família das Fabáceas, é originária do continente asiático, tendo como provável origem a região central e ocidental da China. Os maiores produtores de soja no mundo são os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina, os quais são responsáveis por mais de 80% da produção mundial. O Brasil é o segundo maior produtor, e lidera as exportações de soja no mundo. Segundo levantamento feito pela Conab (2018), a área plantada apresentou incremento de 3,7%, chegando a mais de 35,1 milhões de hectares, na safra 2017/18. Com uma produção de mais de 118,8 milhões de toneladas, um aumento de 4,2% se comparada com a safra passada. Nas últimas 12 safras, o Brasil teve incremento de 14,5 milhões hectares novos destinados a sojicultura que, atualmente, corresponde à cerca de 57% da área total semeada com grãos no país.

O complexo soja ocupa lugar de destaque entre as *commodities* agrícolas nas exportações brasileiras, movimentando, no ano de 2017, mais de US\$ 31,72 bilhões que corresponde a 14,6% do total das exportações do país. Além disso, tem a maior participação no produto interno bruto agrícola e ainda apresenta perspectivas de crescimento nos próximos anos (Abiove and Secex, 2018, Brasil, 2018).

No Brasil, a sojicultura pode ser afetada por aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus, com grande potencial de comprometer a produtividade. Devido à prática do monocultivo, a expansão da área cultivada nas regiões centrais do Brasil, e a incidência de novos patógenos, o número de patologias tem aumentado significativamente. Desse modo, a importância econômica de cada doença da soja tem variado, de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas verificadas a cada safra. Perdas totais anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15 a 20% (Godoy, 2006, Grigolli, 2016).

Dentre os maiores desafios para a sojicultura atual, destaca-se o manejo fitossanitário das patologias fúngicas, que podem promover perdas de até 75% na produtividade de algumas lavouras (Juhász et al., 2013). Entre as doenças que incidem na cultura da soja, a mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) Wei (1950) tem ganhando importância, principalmente na região do cerrado, em função dos danos que pode ocasionar à planta (Ribeiro et al., 2017).

O primeiro relato de mancha-alvo na cultura da soja foi feito nos Estados Unidos, em 1945, por Olive et al. (1945), com o nome de *Helminthosporium vignae*. No

Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez no estado do Paraná, por Yorinori e no estado de São Paulo por Almeida et al. (1976). Atualmente é encontrada em todo o Brasil causando danos à cultura. A incidência dessa doença tem aumentado nas últimas safras em razão do aumento da semeadura de cultivares suscetíveis e da menor sensibilidade/resistência do fungo aos fungicidas comumente utilizados no Brasil. Perdas de até 50% podem ser observadas em cultivares suscetíveis (Godoy et al., 2017).

A doença apresenta diferentes níveis de incidência e severidade em cultivares de distintas de soja. O fungo pode infectar raízes, hastes, vagens, sementes e principalmente, as folhas, onde causam redução da área fotossintética. Os sintomas da doença nas folhas iniciam-se por pontuações pardas, com halo amarelado, evoluindo para manchas circulares de coloração castanho-claro a castanho-escuro. Normalmente, as manchas apresentam pontuação no centro e anéis concêntricos de coloração mais escura. Cultivares suscetíveis podem sofrer desfolha precoce, antes que ocorra o completo enchimento dos grãos (Almeida et al., 2005, Godoy et al., 2016b, Henning et al., 2005, Silva et al., 2008).

O fungo sobrevive em restos culturais de maneira saprofítica, podendo colonizar uma ampla gama de resíduos no solo e sementes infectadas, sendo essa uma forma de disseminação (Almeida et al., 2005, Godoy et al., 2016b, Henning et al., 2005, Silva et al., 2008). Condições de alta umidade relativa e temperaturas amenas são favoráveis à infecção na folha, assim como o plantio de cultivares suscetíveis, monocultura, plantio direto e chuvas frequentes na fase vegetativa. O fungo pode infectar também as raízes, causando podridão radicular e intensa esporulação (Godoy et al., 2016a, Henning et al., 2005, Romero et al., 2013).

Entre as estratégias de manejo recomendadas para essa doença está a utilização de cultivares resistentes, o tratamento de sementes, a rotação/sucessão de culturas com milho e outras espécies de gramíneas e o controle químico (Almeida et al., 2005, Godoy et al., 2016a). O controle genético é uma importante ferramenta, porém, dentre as 1740 cultivares de soja registradas e recomendadas para região central do país (Brasil, 2016), a reação à mancha-alvo é conhecida em somente 187 cultivares (Ferreira Filho, 2012, Teramoto et al., 2013). Diante disso, e após a chegada da ferrugem-asiática da soja no Brasil, intensificou-se o uso de fungicidas como principal medida adotada para o manejo das doenças da soja.

Phakopsora pachyrhizi é o fungo causador da ferrugem-asiática da soja, sendo esta uma das doenças mais severas que incide na cultura, com danos variando de

10% a 90% nas diversas regiões geográficas onde foi relatada (Hartman et al., 2015, Yorinori et al., 2005). Constatada pela primeira vez no Brasil em 2001, a doença é favorecida por chuvas bem distribuídas e longos períodos de molhamento. A temperatura ótima para a infecção varia entre 18°C e 26,5°C (Embrapa, 2013). O manejo para a ferrugem-asiática inclui a utilização de cultivares com genes de resistência, ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada. Inclui também a eliminação voluntária de plantas de soja e a ausência de cultivo na entressafra por meio do vazio sanitário. Além disso, o monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura, a utilização de fungicidas no aparecimento dos sintomas ou preventivamente (Tecnologias, 2013).

Os fungicidas recomendados para o controle químico da ferrugem-asiática na região Central do Brasil segundo a Embrapa (2013) são: azoxistrobina, azoxistrobina + cyproconazol, azoxistrobina + flutriafol, azoxistrobina + tebuconazol, cyproconazol + propiconazol, difenoconazol, epoxiconazol, flutriafol, metconazol, picoxistrobina + cyproconazol, piraclostrobina + epoxiconazol, piraclostrobina + metconazol, picoxistrobina + tebuconazol, tebuconazol, tetraconazol, tiofanato metílico + flutriafol, trifloxistrobina + cyproconazol, trifloxistrobina + tebuconazol, piraclostrobina + epoxiconazol, trifloxistrobina + protioconazol.

A aplicação de fungicidas na cultura da soja tem sido direcionada principalmente ao controle de *P. pachyrhizi*, porém esses produtos também agem sobre as doenças de final de ciclo (DFC) como o crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*), mancha-parda ou septoriose (*Septoria glycines*) e mancha-alvo (*C. cassicola*). Portanto, a alta pressão de seleção causada pelo uso intensivo de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática, pode interferir nas populações de outros fungos, aumentando a presença de indivíduos resistentes em um curto período de tempo. Após relatos de falhas do controle da mancha-alvo nas últimas safras na região Centro-Oeste do Brasil, onde foi verificada a baixa eficiência do controle químico, mesmo após sucessivas aplicações, levantou-se a possibilidade da ocorrência da redução ou perda da sensibilidade do fungo a determinados grupos químicos tradicionalmente empregados para o controle a campo (Avozani and Ferreira, 2012, Romero et al., 2013).

Vários trabalhos de pesquisa, em condições de campo, têm sido desenvolvidos, visando o controle químico da mancha-alvo, principalmente, testando a eficiência de diferentes fungicidas (Godoy et al., 2015, Godoy et al., 2013, Godoy et al., 2012, Godoy et al., 2014, Godoy et al., 2017, Godoy et al., 2016b, Moreira et al., 2010,

Godoy et al., 2018). Porém estudos e metodologias de pesquisa em condições de laboratório ou em ambiente controlado ainda precisam ser gerados e aprimorados, principalmente dentro do patossistema *C. cassiicola* x soja. Informações sobre a fungitoxidade de substâncias químicas para o fungo *C. cassiicola* é uma importante informação para este patossistema (Avozani and Ferreira, 2012, Cabral, 2014). A determinação da fungitoxidade de uma substância é quantificada pela DE₅₀ (dose efetiva), EC₅₀ (concentração efetiva) ou CI₅₀ (concentração inibitória), e se refere à concentração do ingrediente ativo que inibe 50% do crescimento micelial ou da germinação de esporos (Edgington et al., 1971, Lehner et al., 2015, Reis et al., 2010, Sharvelle, 1961). Sendo uma importante ferramenta para avaliar a redução da sensibilidade de populações de fungos a fungicidas ao longo do tempo.

O presente estudo baseia-se na hipótese de que o manejo para controle químico da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) tem causado pressão de seleção nas populações de *Corynespora cassiicola*, contribuindo para o aumento da insensibilidade desse patógeno a vários fungicidas ao longo das últimas safras. O uso contínuo dos mesmos fungicidas tem favorecido o aparecimento/seleção de isolados resistentes a algum(s) princípio(s) químico(s). Os objetivos desse estudo foram: i) Avaliar a sensibilidade dos isolados de *C. cassiicola*, coletados em safras que antecedem o frequente emprego de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática no Brasil; ii) definir a EC₅₀ e a EC₉₈ para diferentes fungicidas frente a *C. cassiicola*. ; iii) determinar a sensibilidade em populações de *C. cassiicola* coletadas em áreas onde têm sido realizadas aplicações sistemáticas de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Núcleo de Pesquisa em Fitopatologia (NPF) da Universidade Federal de Goiás (UFG) entre novembro de 2016 e abril de 2018.

3.3.1 Estimativa da EC₅₀ e EC₉₈

A estimativa da EC₅₀ e EC₉₈ (concentração do fungicida que reduz 50% e 98% do crescimento micelial) para os fungicidas dos grupos dos triazóis e misturas com estrobilurinas e carboxamidas foram realizadas utilizando sete isolados pertencentes à coleção micológica da Embrapa Soja (PR), obtidos em múltiplas regiões do Brasil de 1997 a 2000 (Tabela 3.1), portanto em safras que antecedem a presença de ferrugem-asiática no país, ou seja, isolados que não sofreram processo intenso de seleção pela aplicação de fungicidas.

Tabela 3.1. Isolados de *C. cassiicola* utilizados na determinação da EC₅₀ e EC₉₈.

Isolado	Data de Coleta	País	UF	Cidade
312	13/11/1997	Brasil	MT	Itiquira
313	02/03/1998	Brasil	MT	Nova Mutum
316	20/01/1999	Equador		
317	18/02/1999	Brasil	PR	Palotina
318	14/03/1999	Brasil	MT	Campo Novo Parecis
322	04/04/2001	Brasil	PR	Nova Ventura de São Roque
323	03/03/2001	Brasil	MT	Sapezal

Foram avaliados seis fungicidas (Tabela 3.2) recomendados para o controle da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) na cultura da soja (Embrapa, 2013), e um sétimo fungicida, com mistura tripla (epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina) lançado no ano de 2017, também recomendado para o controle dessa doença.

Tabela 3.2. Fungicidas empregados nos testes de sensibilidade

Nome Comercial	Ingrediente Ativo (i.a.)	Concentração de i.a	Modo de Ação do Grupo
Alto 100	Cyproconazol	10%	DMI*
Score 250 EC	Difenoconazol	25%	DMI
Folicur 200 EC	Tebuconazol	20%	DMI
Fox	Trifloxistrobina + Protiocanazol	15 + 17%	Qol + DMI
Nativo	Trifloxistrobina + Tebuconazol	10% + 20%	Qol + DMI
Ópera	Epoxiconazol + Piraclostrobina	5% + 13%	DMI + Qol
Ativum	Epoxiconazol + Fluxapiroxade + Piraclostrobina	5% + 5% + 8%	DMI + SDHI + Qol

*DMI – Inibidores da demetilação. Qol - Inibidores do Complexo III da cadeia respiratória, que atuam na enzima ubiquinol oxidase. SDHI – Inibidores do Complexo II da cadeia respiratória, que atuam na enzima Succinato Desidrogenase.

As EC_{50} e EC_{98} foram determinadas pelo método de diluição seriada de fungicida em meio de cultura sólido (Becher et al., 2010, Lehner et al., 2015, Machado, 2016, Spolti et al., 2014). Cada fungicida foi adicionado em meio BDA (batata dextrose ágar) a 45-50 °C. As concentrações dos fungicidas testadas foram: 0 (controle); 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Discos de micélio (9 mm de diâmetro) foram retirados da borda de colônias de *C. cassiicola* (10 dias a 25 °C) e depositados em placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo 25 mL BDA + fungicida, em seguida as placas foram seladas com filme plástico de PVC. Para cada combinação isolado-dose-fungicida, foram usadas quatro replicatas. Após 10 dias de incubação a 25 °C, em regime de 12 horas/luz, o diâmetro da colônia foi medido em duas direções perpendiculares.

Nesta avaliação da variação de sensibilidade entre os isolados “selvagens” de *C. cassiicola* o delineamento experimental adotado para o teste de cada fungicida foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 7x7, sendo sete doses de fungicida e sete isolados com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias do fator “isolados” foram comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram executadas através do software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011). Os dados do fator “doses” foram submetidas à análise de regressão.

Para cada fungicida, a EC_{50} e EC_{98} foram determinadas por meio de ajuste de regressão linear entre a porcentagem de inibição [(diâmetro do crescimento radial no controle – diâmetro na dose com fungicida)/diâmetro no controle x100] e o logaritmo das concentrações do fungicida relativa ao crescimento micelial na dose zero (sem o fungicida). O diâmetro do disco de micélio (9 mm) foi subtraído do diâmetro da colônia (Becher et al., 2010, Lehner et al., 2015, Machado, 2016, Spolti et al., 2014).

3.3.2 Avaliação da sensibilidade aos fungicidas em populações de *C. cassiicola* usando as EC_{50} e EC_{98}

Para o teste de sensibilidade aos fungicidas nas doses EC_{50} e EC_{98} , foram selecionados 62 isolados de *C. cassiicola* pertencentes à coleção do Núcleo de Pesquisa em Fitopatologia da UFG, provenientes dos estados de Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará e Tocantins (Safras 2011/12, 2012/13 e 2016/17) previamente identificados por características morfológicas e moleculares. A descrição da origem dos isolados está na Tabela 3.3 (Apêndices).

Para o teste, um disco de micélio (9 mm de diâmetro) foi retirado das margens de colônias de *C. cassiicola* com sete dias (25 °C) e depositado no centro de uma placa de petri (90 mm de diâmetro) contendo 25 mL de BDA + fungicida (testemunha, EC_{50} e EC_{98} com quatro repetições para cada combinação dose + fungicida). Após sete dias de incubação a 25 °C em fotoperíodo 12 horas/luz, o diâmetro da colônia foi medido em duas direções perpendiculares. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC). As médias foram analisadas pelo teste F e quando apresentavam diferenças significativas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, com auxílio do software estatístico Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

A partir da determinação das EC_{50} e EC_{98} em população sabidamente sensível, essas doses foram utilizadas para avaliar a sensibilidade e/ou insensibilidade de isolados de *C. cassiicola* provenientes de áreas com frequente aplicação de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática. Para tanto foi desenvolvida uma escala para avaliação e comparação entre os isolados.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Estimativa da EC_{50} e EC_{98} em isolados “selvagens” de *C. cassiicola*

Os sete isolados de *C. cassiicola* utilizados na estimativa das EC_{50} e EC_{98} apresentaram diferenças significativas no crescimento micelial/sensibilidade entre as doses e os fungicidas testados (Figuras 3.1 a 3.4). Na análise fatorial houve interação entre os fatores “dose” e “isolados” (Tabelas 3.4 a 3.10 em Apêndices) indicando assim a existência de variação na sensibilidade a fungicidas mesmo em isolados que não sofreram um processo intenso de seleção pela aplicação frequente de fungicidas. Esse fato pode ser explicado pela existência de variabilidade genética nessa espécie fúngica. A partir dos resultados obtidos na determinação das EC_{50} e EC_{98} e da variação apresentada pela população “selvagem” utilizada nos testes, foi criada uma escala para avaliação da sensibilidade para os isolados das populações de *C. cassiicola*, levando em consideração essa variação de crescimento.

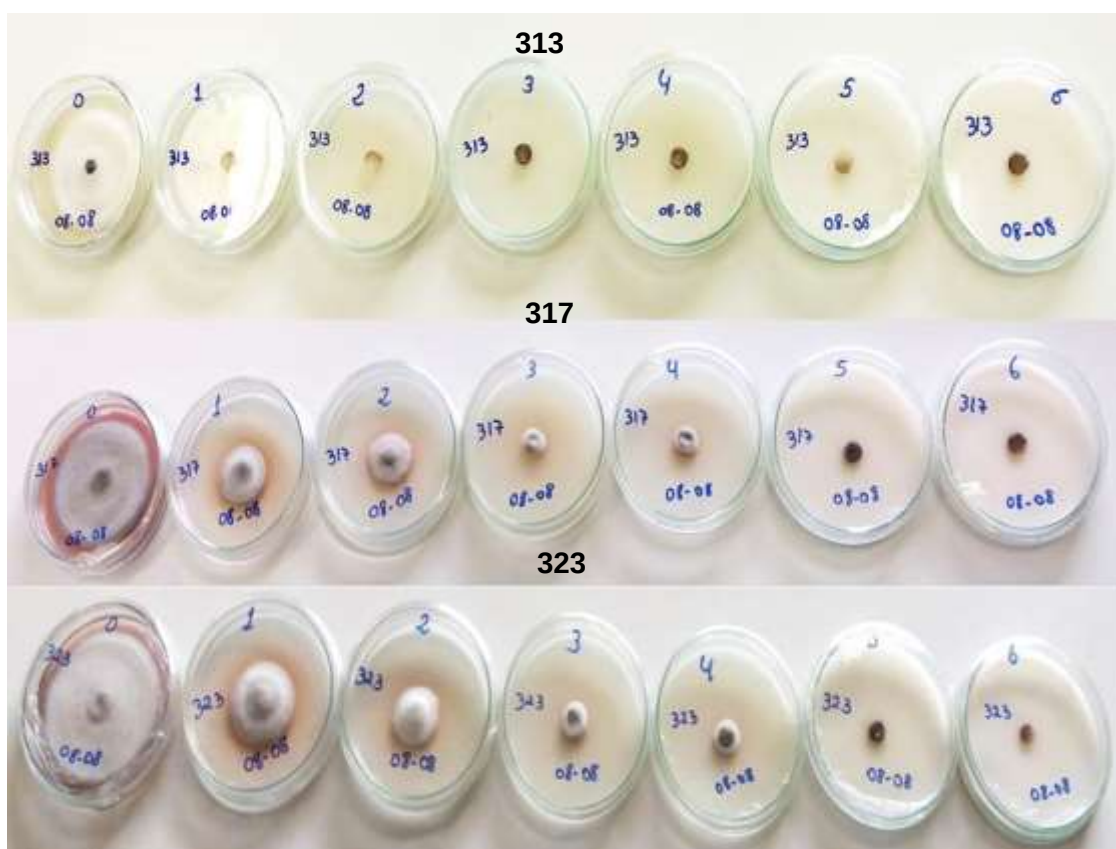


Figura 3.1. Variação no crescimento dos isolados 313, 317 e 323 submetidos a diferentes doses do fungicida a base da mistura Epoxiconazol + Piraclostrobina.

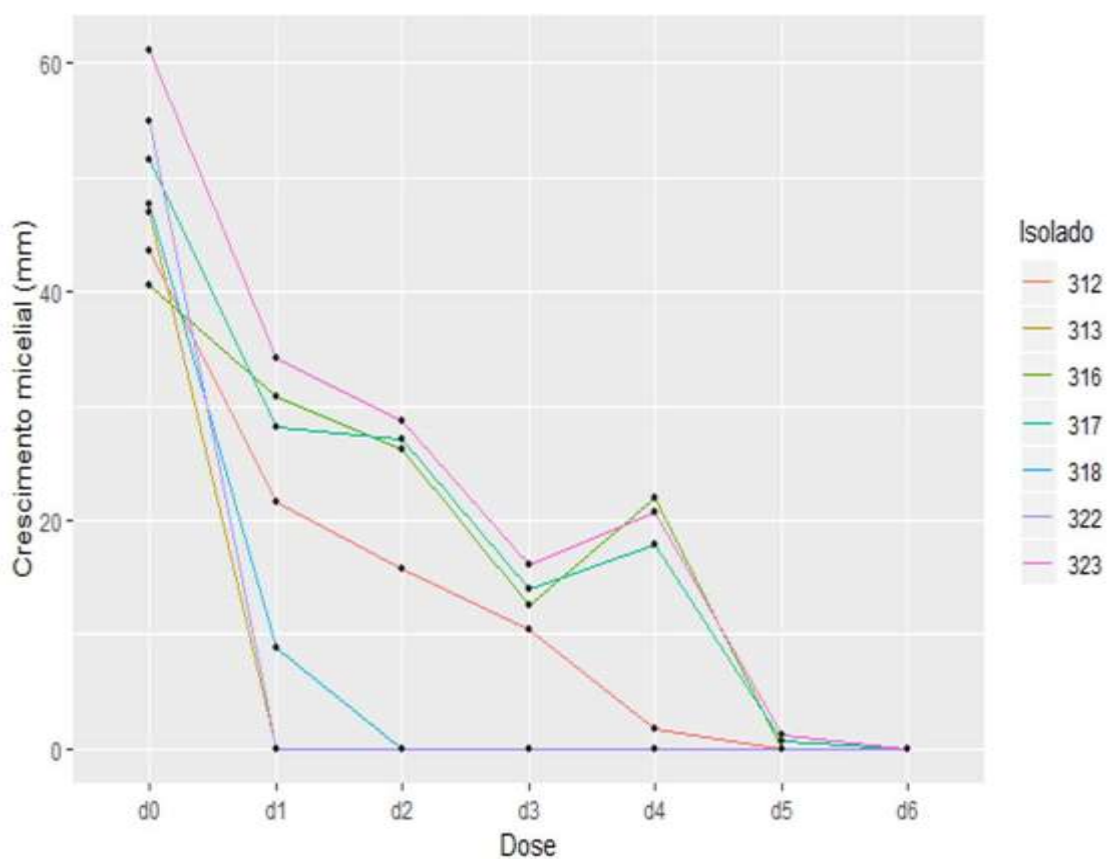


Figura 3.2. Variação no crescimento dos isolados “selvagens” de *C. cassicola* submetidos a diferentes doses do fungicida Cyproconazol.

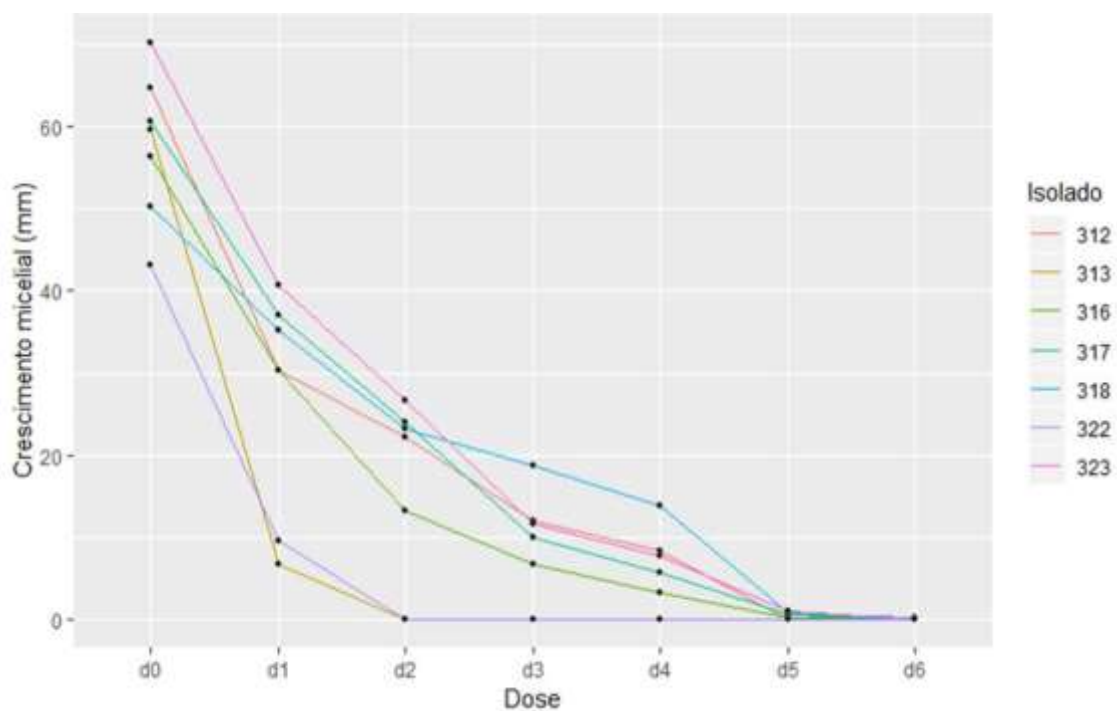


Figura 3.3. Variação no crescimento dos isolados “selvagens” de *C. cassicola* submetidos a diferentes doses do fungicida Epoxiconazol + Piraclostrobina.

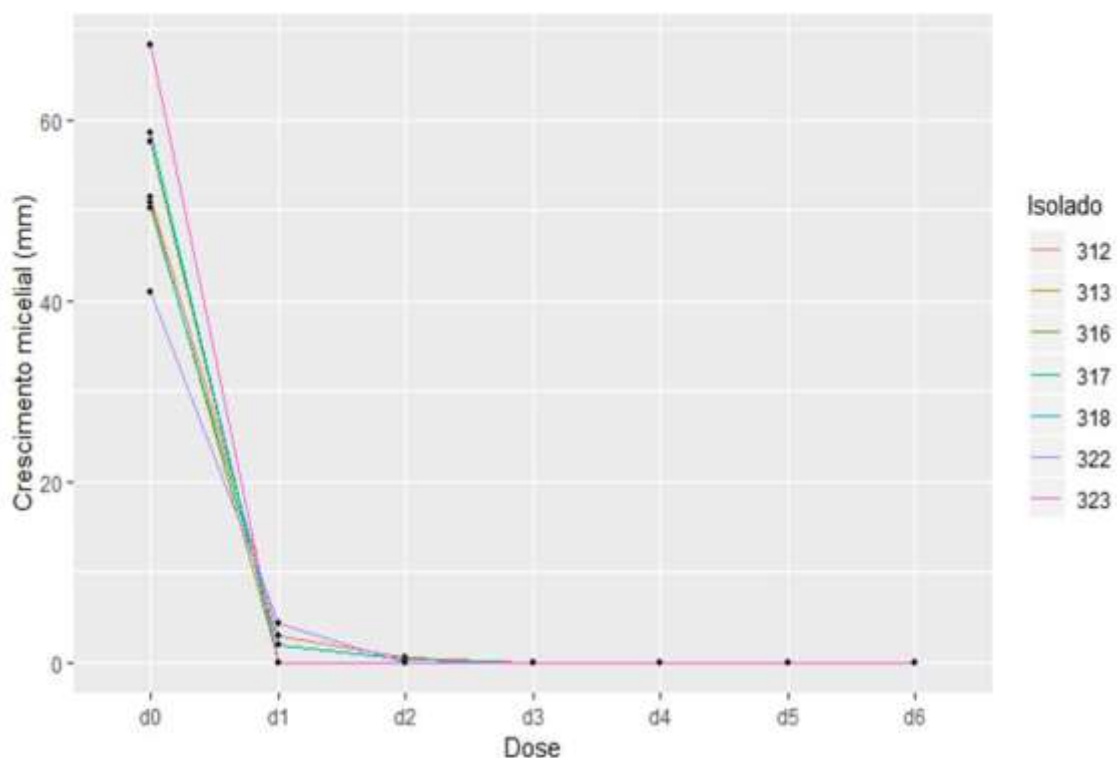


Figura 3.4. Variação no crescimento dos isolados “selvagens” de *C. cassicola* submetidos a diferentes doses do fungicida Epoxiconazol + Fluxapiroxade + Piraclostrobina.

Na análise da regressão entre o crescimento micelial (variável dependente y) e a concentração do fungicida (variável independente x), o modelo logarítmico foi o que mais se adequou e representou a relação entre as duas variáveis (Figura 3.5), o maior coeficiente de determinação (R^2) foi obtido por este modelo. A partir dos dados de sensibilidade dos sete isolados, foi possível gerar uma equação geral para a determinação das doses EC_{50} e EC_{98} para cada um dos fungicidas utilizados. A equação linear geral foi: $y = a \cdot \log(x) + b$. A partir da equação geral foi possível determinar o volume de ingrediente (s) ativo (s) de cada fungicida para as EC_{50} e EC_{98} (Tabela 3.11).

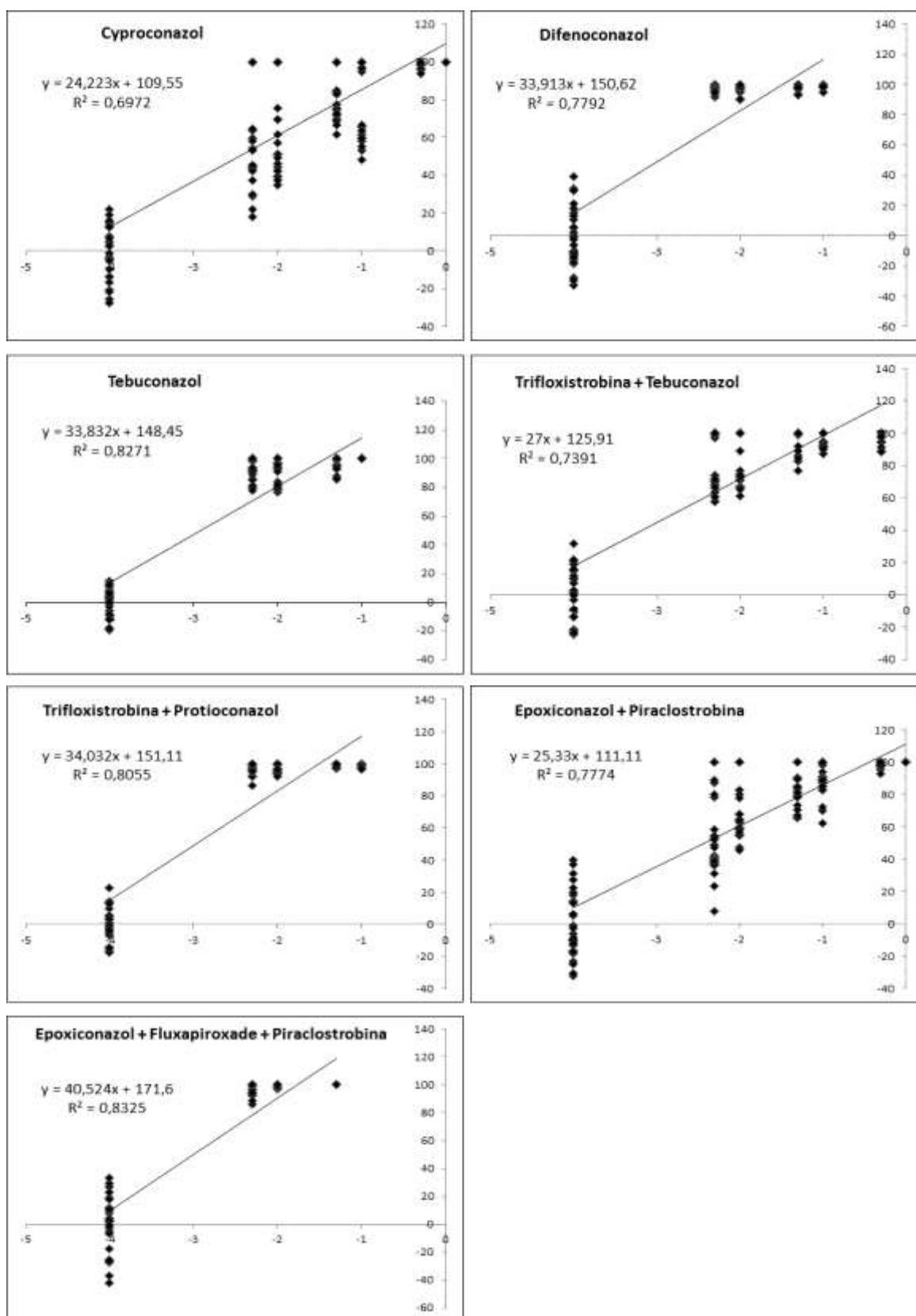


Figura 3.5. Sensibilidade dos isolados de *Corynespora cassicola* em função da concentração de diferentes princípios ativos de fungicidas.

Para fungicidas compostos por misturas (dupla ou tripla) os valores foram ajustados para o ingrediente ativo presente em menor concentração, para garantir a quantidade mínima de cada princípio ativo indicado. A quantidade calculada/utilizada de cada ingrediente ativo que compõem cada fungicida para as EC₅₀ e EC₉₈ é apresentada na Tabela 3.11.

Tabela 3.11. Quantidade de ingrediente ativo em cada fungicida em função da Concentração Efetiva 50 (EC₅₀) e 98 (EC₉₈) em µg.mL⁻¹, Equação da regressão e R² para cada fungicida.

<i>Corynespora cassiicola</i> (L.)				
i.a.	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	EC ₉₈ (µg.mL ⁻¹)	Equação	R ²
Cyproconazol	0,855	6,207	y = 24,223x + 109,55	0,6972
Difenoconazol	0,2058	0,8476	y = 33,913x + 150,62	0,7792
Tebuconazol	0,2725	1,125	y = 33,832x + 148,45	0,8271
Trifloxistrobina + Tebuconazol	0,601 + 1,202	3,556 + 7,112	y = 27x + 125,91	0,7391
Trifloxistrobina + Protiocanazol	0,3416 + 0,386	1,40 + 1,586	y = 34,032x + 151,11	0,8055
Epoxiconazol + Piraclostrobina	1,79 + 4,654	11,918 + 30,996	y = 25,33x + 111,11	0,7774
Epoxiconazol + Fluxapiraxade + Piraclostrobina	0,995 + 0,995 + 1,592	3,252 + 3,252 + 5,203	y = 40,524x + 171,6	0,8325

Vários autores já propuseram escalas de avaliação para a sensibilidade de isolados a fungicidas (Tabela 3.12). O trabalho clássico na avaliação de sensibilidade de fungos a fungicidas é de Edgington et al. (1971), que propôs uma escala de fungitoxidade a benzimidazóis para vários grupos taxonômicos fúngicos. Diversos autores se basearam nesse estudo, criando e adaptando escalas de avaliação de sensibilidade a diferentes mecanismos de ação de fungicidas a variados grupos de fungos. A utilização de valores padronizados referentes à inibição de crescimento é uma importante ferramenta para o monitoramento de sensibilidade e elaboração de estratégias de manejo de doenças.

Estudos desenvolvidos por vários autores procuraram avaliar a sensibilidade a fungicidas e/ou determinar a CI_{50} para isolados de *C. cassiicola* de diferentes regiões e hospedeiros. Avozani et al. (2014) realizaram ensaios *in vitro* avaliando a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola*, (provenientes de plantas de soja) aos grupos triazol e benzimidazol, encontrando diferentes níveis de sensibilidade entre os isolados. Os autores relataram a ausência de informações da CI_{50} de referência determinada para isolados selvagens de *C. cassiicola*. Em virtude disso, a escala obtida por eles (utilizando os valores de inibição entre os isolados mais sensíveis e os não sensíveis), foi proposta como padrão em trabalhos de monitoramento da sensibilidade para essa espécie fúngica (Tabela 3.12). Miyamoto et al. (2009) avaliaram a resistência de isolados de *C. cassiicola* coletados em plantas de pepino, tomate, soja, berinjela e feijão-caupi em diferentes locais do Japão, a fungicidas do grupo dos inibidores do complexo II da cadeia respiratória, que atuam na enzima Succinato Desidrogenase (SDHI). Leroux et al. (2010) estudaram os mecanismos de resistência de isolados de *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento, a fungicidas que atuam na cadeia respiratória e propuseram uma escala de avaliação de sensibilidade aos fungicidas inibidores do complexo III, que atuam no sítio de oxidação da enzima Ubiquinol (Qol). Já Teramoto et al. (2017), baseando-se nos estudos de Leroux et al. (2010), propuseram uma escala adaptada para a avaliação de isolados de *C. cassiicola* provenientes de plantas de soja coletas em várias regiões do Brasil, para esse grupo químico.

Tabela 3.12. Escalas de avaliação de sensibilidade de fungos a vários fungicidas propostas por vários autores.

Classificação	Edgington et al. (1971)	Avozani et al. (2014)	Miyamoto et al. (2009)	Leroux et al. (2010)	Teramoto et al. (2017)
	MBC (mg L ⁻¹)	MBC e DMI (µg mL ⁻¹)	SDHI (µg mL ⁻¹)	QoI (µg mL ⁻¹)	QoI (µg mL ⁻¹)
Sensível (S)	<1	<1	<1	<0,025	<0,16
Moderadamente Sensível (MS)	1 e 50	1-50	1-10	0,05-0,3	0,16 -1
Não Sensível (NS)	> 50	50-100	10-25		1-25
Altamente não Sensível (HNS)		>100	>25	>10	>25

Neste estudo, a partir dos valores de sensibilidade encontrados para a população selvagem foi estabelecida uma equação consenso para cada um dos fungicidas avaliados, tanto para a EC₅₀ quanto para EC₉₈. A equação foi determinada a partir da análise da regressão entre o crescimento micelial e a concentração do fungicida, utilizando os valores obtidos para os sete isolados de referência (selvagens). A partir da variação significativa entre o crescimento dos isolados foi estabelecida uma escala de avaliação para as populações de *C. cassicola* (Tabelas 3.13 e 3.14).

Para a EC₅₀ (dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial em 50%) foram considerados sensíveis (S) isolados que apresentassem o crescimento de até 10% (ou seja sensíveis a uma dose menor que a EC₅₀ calculada). Moderadamente sensíveis (MS) os isolados que apresentassem crescimento de 11 a 50%. Não sensíveis (NS), os isolados que apresentassem crescimento de 51 a 75% e altamente não sensíveis (HNS) isolados que apresentassem crescimento entre 76 a 100% quando comparados ao tratamento testemunha (sem adição de fungicidas). As percentagens de crescimento referentes às dosagens EC₅₀ para cada fungicida e a classificação de sensibilidade adotada são apresentadas na Tabela 3.13.

Tabela 3.13. Classificação de sensibilidade de isolados de *C. cassicola* a diferentes fungicidas em função da EC₅₀.

Produto Comercial	i.a.	Conc. i.a. %	Classificação EC ₅₀ (i.a. µg.mL ⁻¹)			
			S (0 a 10% cresc.)	MS (11 a 50%)	NS (51 a 75%)	HNS (76 a 100%)
Alto 100	cyproconazol	10	0,855	0,855	0,855	0,855
Score 250	difenoconazol	25	0,205	0,205	0,205	0,205
EC						
Folicur 200	tebuconazol	20	0,272	0,272	0,272	0,272
EC						
Fox	trifloxistrobina + protioconazol	15 + 17	0,341 + 0,386	0,341 + 0,386	0,341 + 0,386	0,341 + 0,386
Nativo	trifloxistrobina + tebuconazol	10 + 20	0,601 + 1,202	0,601 + 1,202	0,601 + 1,202	0,601 + 1,202
Ópera	epoxiconazol + piraclostrobina	5 + 13	1,79 + 4,654	1,79 + 4,654	1,79 + 4,654	1,79 + 4,654
Ativum	epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina	5 + 5 + 8	0,995 + 0,995 + 1,592	0,995 + 0,995 + 1,592	0,995 + 0,995 + 1,592	0,995 + 0,995 + 1,592

Os valores para a EC₅₀ obtidos nesse estudo diferem com alguns disponíveis na literatura. Em estudos realizados por Aguiar (2015) determinando a EC₅₀ do fungicida tebuconazol para isolados de *C. cassicola* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões do Brasil, foram obtidos valores que variaram de 0,50 a 18,79 mg.L⁻¹. Já no trabalho realizado por Avozani (2011), na determinação da EC₅₀ frente a isolados de *C. cassicola* provenientes de cultivos de soja, encontrou valores variando entre 1,89 e 2,91 mg.L⁻¹. Já para cyproconazol os valores variaram de 9,21 a 20,32 mg.L⁻¹. Os valores obtidos e propostos nesse trabalho, para a escala de avaliação da EC₅₀ (Tabela 3.13), em

a

geral, são menores que os disponíveis na literatura, um resultado já esperado, em decorrência da utilização de isolados sabidamente sensíveis (selvagens) para a determinação das EC's. Porém, mesmo assim, a escala se assemelha às proposições da literatura, onde, é considerado sensível um isolado que apresente EC₅₀ menor que 1 µg.mL⁻¹ (Avozani et al., 2014, Edgington et al., 1971, Leroux et al., 2010, Miyamoto et al., 2009, Teramoto et al., 2017).

Nesse estudo foi estipulada uma faixa para cada grupo avaliado, sendo considerados sensíveis (S) isolados que apresentem crescimento abaixo de 10% em concentrações menores de 0,855 mg.L⁻¹ para cyproconazol, 0,205 mg.L⁻¹ para difeconazol e 0,272 mg.L⁻¹ para tebuconazol em ingredientes únicos. Para as misturas, foram considerados sensíveis isolados que apresentassem sensibilidades a doses menores que 0,341 mg.L⁻¹ (trifloxistrobina) + 0,386 mg.L⁻¹ (protioconazol), 0,601 mg.L⁻¹ (trifloxistrobina) + 1,202 mg.L⁻¹ (tebuconazol), 1,79 mg.L⁻¹ (epoxiconazol) + 4,654 mg.L⁻¹ (piraclostrobina) e para a mistura tripla 0,995 mg.L⁻¹ (epoxiconazol) + 0,995 mg.L⁻¹ (fluxapiroxade) + 1,592 mg.L⁻¹ (piraclostrobina). Com relação às misturas a complexidade é maior devido à interação entre as dosagens e diferentes modos de ação.

No caso da EC₉₈, não são encontradas informações com frequência na literatura, como acontece com a EC₅₀. Para a avaliação dos resultados da EC₉₈, foram considerados sensíveis (S) isolados que apresentassem o crescimento limite de 1,89%. Moderadamente sensíveis (MS) os isolados que apresentassem crescimento de 1,90 a 2,1%, não sensíveis (NS) os isolados que apresentassem crescimento de 2,2 a 10% e altamente não sensíveis (HNS) os isolados que apresentassem crescimento maior que 10% quando comparados ao tratamento testemunha (sem adição de fungicidas) (Tabela 3.14).

Tabela 3.14. Classificação de sensibilidade de isolados de *C. cassicola* a diferentes fungicidas em função da EC₉₈.

Produto Comercial	i.a.	Conc. i.a. %	Classificação EC ₉₈ (i.a. µg.mL ⁻¹)			
			S (0 a 1,89%)	MS (1,9 a 2,1%)	NS (2,2% a 10%)	HNS (>10%)
Alto 100	cyproconazol	10	6,207	6,207	6,207	6,207
Score 250 EC	difenoconazol	25	0,847	0,847	0,847	0,847
Folicur 200EC	tebuconazol	20	1,125	1,125	1,125	1,125
Fox	trifloxistrobina + protioconazol	15 + 17	1,40 + 1,586	1,40 + 1,586	1,40 + 1,586	1,40 + 1,586
Nativo	trifloxistrobina + tebuconazol	10 + 20	3,556 + 7,112	3,556 + 7,112	3,556 + 7,112	3,556 + 7,112
Ópera	epoxiconazol + piraclostrobina	5 + 13	11,918 + 30,996	11,918 + 30,996	11,918 + 30,996	11,918 + 30,996
Ativum	epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina	5 + 5 + 8	3,252 + 3,252 + 5,203	3,252 + 3,252 + 5,203	3,252 + 3,252 + 5,203	3,252 + 3,252 + 5,203

A EC₉₈ é uma dose que, em teoria, é capaz de eliminar quase que por completo o crescimento do fungo, tendo uma faixa de crescimento máximo esperada muito pequena, ou seja, 2%. Sendo assim, um grande crescimento dos isolados pode indicar um processo de resistência. Essa dose teria uma capacidade maior de apresentar alterações sutis nos comportamentos dos isolados, pois pequenas taxas de crescimento nessa dose já indicam um possível processo de significativa perda da sensibilidade. Diante disso, o esperado máximo de

crescimento para essa dose é de 2%, um isolado que apresente um crescimento acima de 10%, ou seja, mais de cinco vezes o máximo esperado propõem-se que seja classificado como altamente não sensível (HNS).

3.4.2 Avaliação da sensibilidade aos fungicidas em populações de *C. cassiicola* usando as EC₅₀ e EC₉₈

Na Tabela 3.15 (Apêndices) estão os resultados dos testes de avaliação da sensibilidade aos fungicidas nas populações de *C. cassiicola* usando as EC₅₀ para cyproconazol, difeconazol e tebuconazol, fungicidas pertencentes ao grupo químico dos triazóis (DMI). Para o fungicida com ingrediente ativo a base de cyproconazol o isolado CC-151 (Nova Xavantina/MT, safra 2011/12) apresentou a maior média de crescimento discriminada pelo teste de Scott-Knott a 5%. O isolado CC-9 coletado também na safra 2012/13, na cidade de Santo Antônio /GO, foi o que apresentou maior sensibilidade a esse ingrediente ativo, tendo o seu crescimento totalmente inibido, sendo classificado como sensível (S) para esse ingrediente ativo. Os outros 61 isolados foram classificados como moderadamente sensíveis (MS) para esse fungicida.

Para o fungicida difeconazol dois isolados apresentaram maior sensibilidade sendo eles CC-101 e 144 ambos da safra 2011/12. Juntamente com o isolado CC-149 coletado na mesma safra, foram classificados como sensíveis (S). Para esse fungicida, os outros 59 isolados foram classificação como moderadamente sensíveis (MS). O isolado mais sensível ao fungicida tebuconazol foi CC-9, sendo inibido totalmente. Os outros 61 isolados foram classificados como moderadamente sensíveis (MS).

Para a mistura trifloxistrobina + tebuconazol, o isolado que apresentou a maior média de crescimento, diferindo estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5 %, foi o CC-141 (Porangatu/GO, Safra 2012/13). Para essa mistura 11 isolados (CC-9, CC-144, CC-149, CC-180, CC-187, CC-190, CC-213, CC-243, CC-249, CC-257 e CC-261) foram classificados como sensíveis (S), e os outros 51 isolados foram classificados como moderadamente sensíveis (MS) (Tabela 3.16, Apêndices).

Para a mistura trifloxistrobina + protioconazol, os isolados que apresentaram maior crescimento foram CC-21, CC-101, CC-132 e CC-135 diferindo estatisticamente dos demais pelo teste de Scott-Knott a 5 %. Catorze isolados (CC-9, CC-20, CC-137, CC-147, CC-152, CC-180, CC-213, CC-216, CC-254, CC-272, CC-

304, CC-312, CC-314, CC-315) foram classificados como sensíveis (S) para esse fungicida, os outros 48 isolados foram classificados como moderadamente sensíveis (MS) (Tabela 3.16, Apêndices).

Entre os fungicidas compostos por mistura dupla, epoxiconazol + piraclostrobina apresentou maior fungicitoxidade aos isolados de *C. cassiicola*, tendo apenas dois isolados, CC-101 (Morrinhos-GO, Safra 2011/12) e CC-141 (Porangatu-GO, Safra 2012/13) classificados como moderadamente suscetíveis (MS) e todos os outros 60 isolados classificados como sensíveis (S) (Tabela 3.17, Apêndices).

A mistura tripla (epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina) foi o fungicida que apresentou maior capacidade de inibição de crescimento de todos os isolados de *C. cassiicola*. A inibição total do crescimento fúngico foi observada já na dose EC_{50} , sendo assim todos os isolados foram classificados como sensíveis (S) (Tabela 3.17, Apêndices).

Dentre os resultados obtidos na avaliação da EC_{50} , foi possível observar que o isolado CC-9 proveniente da cidade de Santo Antônio de Goiás, coletado na safra 2012/13 foi o mais sensível entre todos, tendo seu crescimento totalmente inibido na EC_{50} de quatro (cyproconazol, trifloxistrobina + tebuconazol, epoxiconazol + piraclostrobina e epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina) dos sete fungicidas avaliados e apresentando as menores médias de crescimento em seis dos sete fungicidas testados.

Na Tabela 3.18 (Apêndices) são apresentados os resultados de sensibilidade das populações de *C. cassiicola* a EC_{98} dos triazóis: cyproconazol, difeconazol e tebuconazol. Para o fungicida com ingrediente ativo a base de cyproconazol, os isolados CC-163 proveniente de Sinop /MT (Safra 2011/12), CC-240 coletado em Paragominas/PA (Safra 2012/13), e os isolados CC-262, CC-272, CC-274, CC-284, CC-312 provenientes de Senador Canedo/GO (Safra 2016/2017), apresentaram a maior média de crescimento detectada pelo teste de Scott-Knott a 5%. Seis desses isolados foram classificados como não sensíveis (NS). O isolado CC-272, entretanto apresentou a maior média de crescimento entre todos os isolados (10,398 mm) sendo classificado como altamente não sensível (HNS). Entre os isolados, 27 foram classificados como sensíveis (S) (CC-3, CC-9, CC-17, CC-19, CC-20, CC-21, CC-99, CC-101, CC-102, CC-132, CC-137, CC-144, CC-148, CC-152, CC-180, CC-193, CC-213, CC-216, CC-241, CC-242, CC-243, CC-246, CC-248, CC-249, CC-253, CC-259 e CC-314) a EC_{98} de cyproconazol.

Observa-se que alguns isolados coletados nas safras 2011/12 e 2012/13 demonstraram sensibilidade a EC₉₈. Por outro lado, apenas um isolado (CC-312) coletado em Senador Canedo/GO, na safra 2016/17 foi sensível (S), todos os outros apresentaram um comportamento altamente não sensível (HNS). Demonstrando uma perda de sensibilidade das populações do fungo ao fungicida cyproconazol ao longo das safras (Figura 3.6). De acordo com Ghini and Kimati (2000), a resistência adquirida pela população de um patógeno ao produto é diretamente proporcional às doses aplicadas, à frequência de aplicação, ao grau de cobertura obtido, à persistência na cultura ou no solo e ao tamanho da área tratada. Numa população de fungos fitopatogênicos sensível a um determinado fungicida, indivíduos com menor sensibilidade ao produto surgem devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade dos seres vivos, na qual a aplicação do fungicida sistêmico com modo de ação específico seleciona os resistentes e elimina os sensíveis (Parreira et al., 2009).

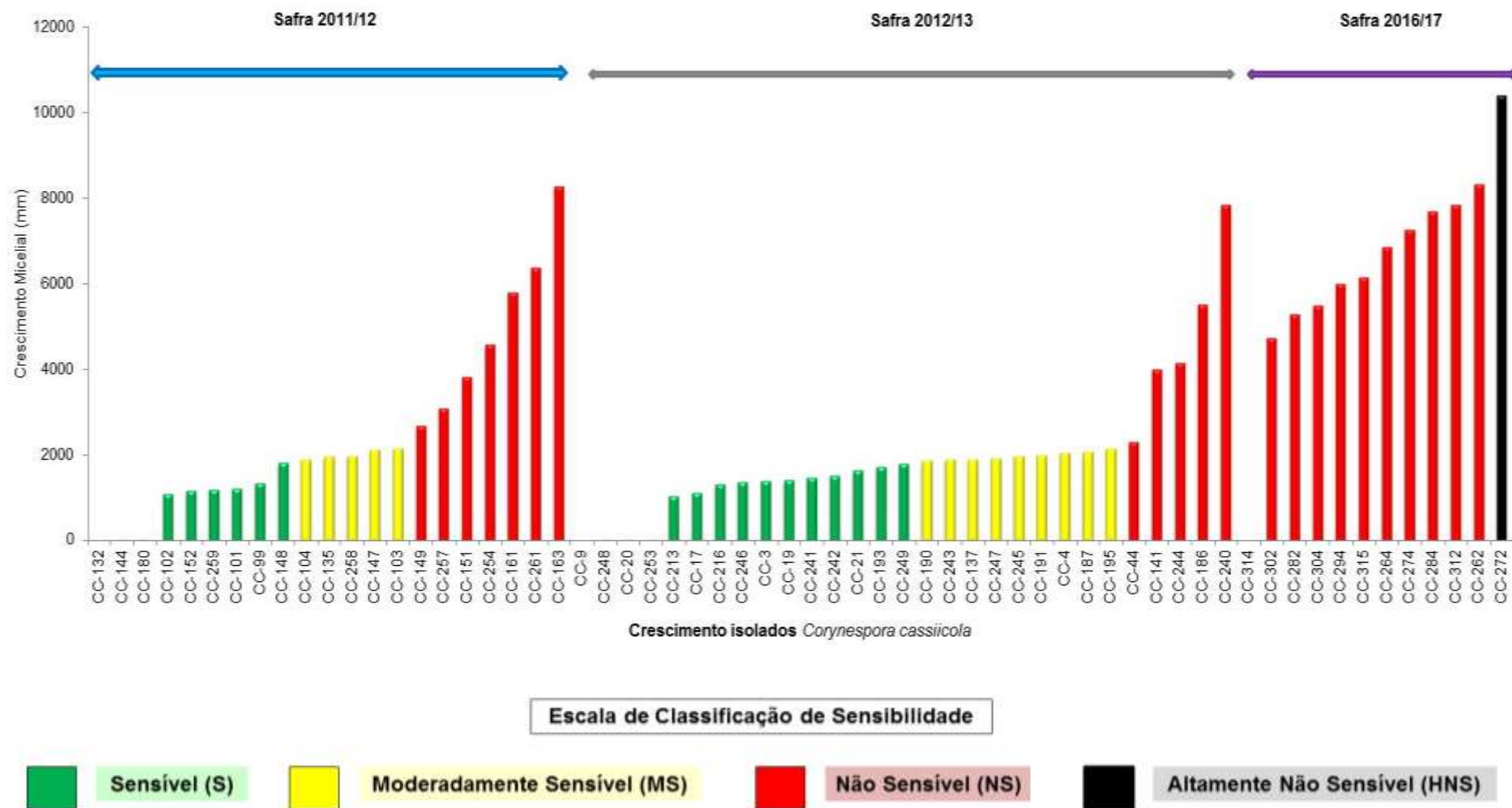


Figura 3.6. Variação de Crescimento entre os isolados *Corynespora cassiicola* submetidos a EC₉₈ de Cyproconazol.

Na EC₉₈ do fungicida difeconazol, cinco isolados apresentaram as maiores médias de crescimento, diferindo estatisticamente dos demais isolados pelo teste de Scott-Knott a 5%, sendo eles: CC-187, CC-190 (Riachão/MA Safra 2012/13), CC-213 (São Raimundo das Mangabeiras/MA, Safra 2012/13), CC-245 (Paragominas/PA, Safra 2012/13) e CC-302 (Senador Canedo/GO, Safra 2016/2017), todos os cinco classificados como altamente não sensíveis (HNS). No total, 50 isolados foram classificados como altamente não sensíveis (HNS) ao crescerem significativamente na EC₉₈ de difeconazol, ou seja, apresentaram um crescimento micelial médio maior que 10%, quando o esperado seria no máximo 2%, em comparação com a população “selvagem” a partir da qual a EC₉₈ foi estimada. Todos os isolados da safra 2016/17 (Senador Canedo/GO) foram classificados como HNS. Cinco isolados foram classificados como sensíveis (S), sendo quatro da safra 2011/12 (CC-101 proveniente de Morrinhos/GO e CC-144, CC-149, CC-151 provenientes de Nova Xavantina/MT) e um da safra 2012/13 (CC-141, Porangatu/GO).

A maioria dos isolados não foi sensível a difeconazol em ambas às safras e regiões (Figura 3.7). O nível de crescimento dos isolados na dose em questão foi muito mais alto que o esperado (2%) chegando a 27,19 % (isolado CC-302 safra 2016/17 de Senador Canedo/GO). Esse resultado demonstra que os isolados coletados a partir da 2011/12 já apresentavam significativamente uma menor sensibilidade ao fungicida difeconazol, em comparação com os isolados coletados nas safras anteriores a 2001 (isolados utilizados para a determinação das EC 50 e 98%), que antecederam a aplicação sistêmica de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja. A alteração na sensibilidade de fungos aos fungicidas IDMs é um fenômeno quantitativo (Ghini and Kimati, 2000, Reis et al., 2010), caracterizando-se por redução gradativa da eficácia. Entre os triazóis utilizando a EC₉₈, foi possível observar que o difeconazol apresentou a menor fungitoxidade, sendo que a maioria dos isolados de *C. cassicola* demonstrou comportamento altamente não sensível (HNS) (Figura 3.7). Essa perda da sensibilidade a uma dose alta de fungicida indica um processo de seleção da população, onde apesar do aumento da dosagem do químico, não é possível erradicar por completo o patógeno, ou reduzir o nível populacional até o esperado (nesse caso no máximo a 2% de crescimento). O frequente uso de compostos químicos constitui-se em uma mudança de ambiente para o fungo que antes era sensível a uma determinada substância, tornando-o insensível, após a sua adaptação a esta nova condição (Reis et al., 2010).

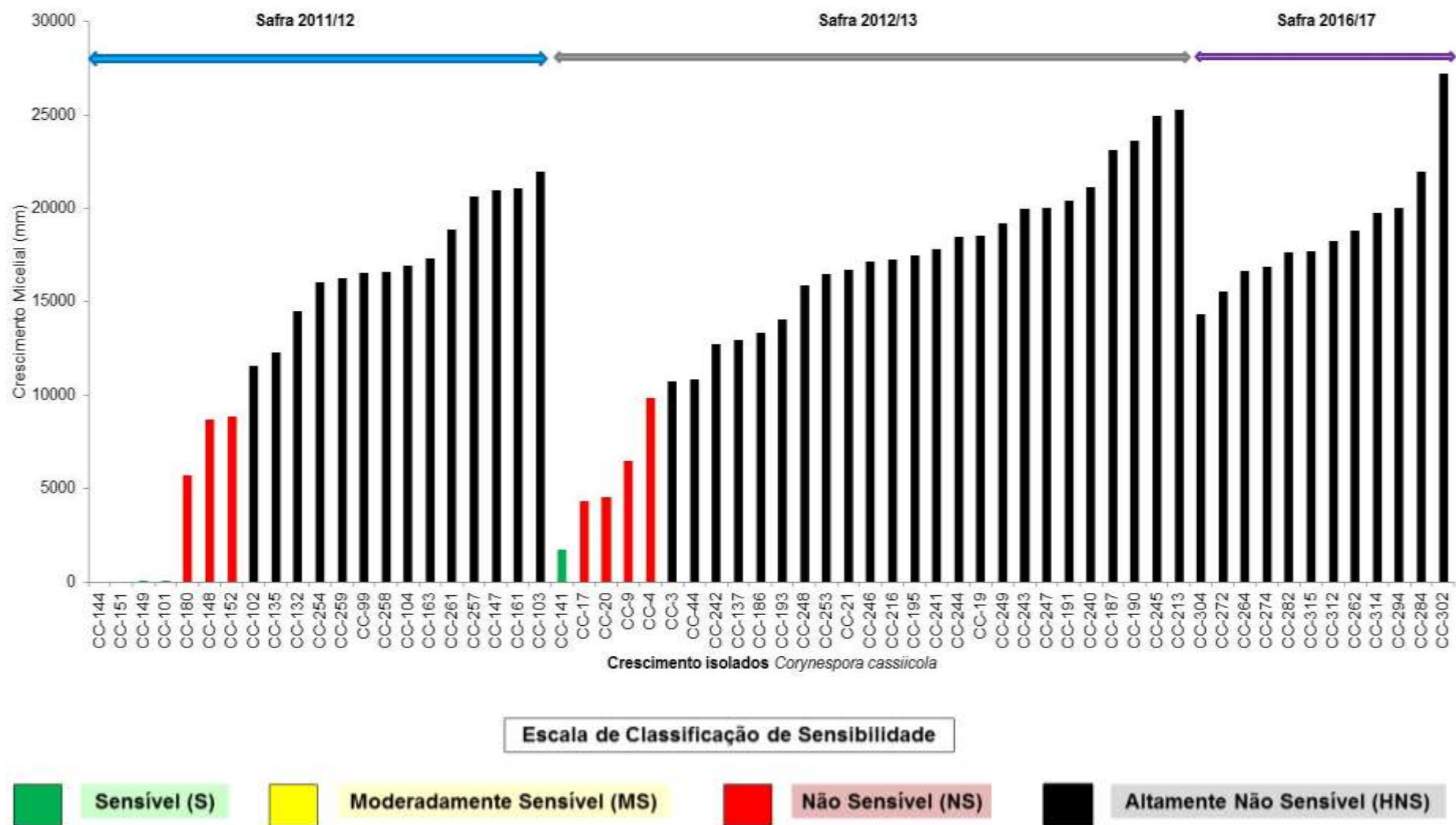


Figura 3.7. Variação de Crescimento entre os isolados *Corynespora cassiicola* submetidos a EC₉₈ de Difeconazol.

Por meio da EC₉₈, entre os triazóis, tebuconazol apresentou maior fungitoxidade para os isolados de *C. cassiicola*, sendo 59 isolados classificados como sensíveis (S). O isolado CC-274 (Senador Canedo/GO, Safra 2016/2017) foi classificado como moderadamente sensível (MS), e os isolados CC-193 (Riachão/MA) e CC-242 (Paragominas/PA) ambos da Safra 2012/13, foram classificados como não sensíveis (NS).

Grande variação na eficiência foi detectada entre os fungicidas pertencentes ao grupo dos triazóis (DMI) (cyproconazol, difeconazol, tebuconazol, proticonazol, epoxiconazol e etc.). Essa variação também foi encontrada no trabalho realizado por Avozani (2011), estudando a sensibilidade de *C. cassiicola* a diferentes fungicidas, dentre eles tebuconazol, cyproconazol e epoxiconazol. Os autores observaram que de modo geral, entre os triazóis utilizados, o cyproconazol apresentou menor fungitoxidade a todos os isolados avaliados. Neste estudo podemos observar que, de maneira geral, para as duas EC's (50 e 98), difeconazol foi o triazol que apresentou a menor fungitoxidade aos isolados de *C. cassiicola*, seguido por cyproconazol. No caso de ingrediente ativo único, tebuconazol foi o que apresentou maior fungitoxidade frente aos isolados, resultado semelhante ao obtido nos trabalhos de Aguiar (2015) e Avozani (2011).

A variação na eficiência entre os DMI's deve-se em parte a dinâmica do sítio celular de atuação. Os triazóis inibem o citocromo P-450, impedindo a demetilação. Os esteróis metilados cumprem algumas funções na constituição das membranas, mas não conseguem executar outras funções específicas, o que leva ao desequilíbrio entre os lipídios das membranas, com inibição de fosfolipídios e acúmulo de ácidos graxos livres, que chegam a níveis tóxicos para os fungos. A falta de ações específicas dos esteróis demetilados, mais o desequilíbrio lipídico, levam os fungos à morte. O nível de inibição pelo citocromo P-450 é variável de composto a composto. Por isso o grau de eficiência dos diversos fungicidas contra diversas espécies de fungos e também variável (Forcelini, 1994, Tomlin, 2002, Zambolim et al., 2007). Essa variação pode ser verificada nesse trabalho em corroboração a vários outros disponíveis na literatura (Aguiar, 2015, Avozani, 2011, Avozani et al., 2014, Teramoto et al., 2017). Essa característica pode representar um desafio na escolha/adoção de métodos de controle de doenças, tendo em vista que os DMI são classificados como de médio risco de desenvolvimento de resistência, devido a essa grande diferença no espectro de atividade.

Para a mistura trifloxistrobina + tebuconazol na EC₉₈, o isolado que apresentou a maior média de crescimento, diferindo estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5 %,

foi o CC-314 (Senador Canedo/GO, Safra 2016/17), sendo classificado como HNS. Ao todo nove isolados (CC-20, CC-163, CC-193, CC-243, CC-247, CC-264, CC-274, CC-302 e CC-314) apresentaram o comportamento altamente não sensível (HNS) para EC₉₈. Treze isolados (CC-3, CC-9, CC-19, CC-103, CC-144, CC-149, CC-180, CC-186, CC-187, CC-190, CC-213, CC-241, CC-246) foram classificados como sensíveis (S) para essa dosagem e fungicida (Tabela 3.19, Apêndices). Já para a mistura entre trifloxistrobina + prothioconazol, 24 isolados foram classificados como altamente não sensíveis (HNS) (CC-17, CC-19, CC-20, CC-101, CC-103, CC-132, CC-141, CC-144, CC-147, CC-151, CC-161, CC-163, CC-180, CC-187, CC-193, CC-216, CC-241, CC-242, CC-246, CC-248, CC-259, CC-261, CC-264 e CC-274). Outros seis isolados (CC-9, CC-247, CC-272, CC-312, CC-314 e CC-315) foram classificados como sensíveis (Tabela 3.19, Apêndices).

Na EC₉₈, epoxiconazol + piraclostrobina apresentou grande fungitoxidade contra *C. cassicola*, sendo que todos os 62 isolados avaliados foram classificados como sensíveis (S). Apenas o isolado CC-151 (Nova Xavantina/MT, Safra 2011/12), apresentou um pequeno crescimento médio (0,181 mm) (porém, não diferindo estatisticamente dos demais), todos os outros 61 isolados tiveram o crescimento inibido em 100% (Tabela 3.20, Apêndices). Resultado semelhante foi constatado no teste de sensibilidade a EC₉₈ para a mistura tripla entre epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina, onde os 62 isolados tiveram o crescimento inibido em 100%, sendo todos classificados como sensíveis (S) (Tabela 3.20, Apêndices). Ensaios em campo realizados por Godoy et al. (2017) e Godoy et al. (2018), avaliando a eficiência de fungicidas frente à mancha-alvo em diferentes regiões produtoras de soja, demonstraram que as menores taxas de severidade e as maiores porcentagens de controle foram observadas em tratamentos compostos por misturas triplas como o fungicida epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina. Sendo possível observar nesses ensaios que misturas triplas, apresentaram resultados satisfatórios nos parâmetros avaliados (severidade da doença, porcentagem de controle em relação à testemunha, produtividade e porcentagem de redução de produtividade).

Nesse estudo a mistura tripla (epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina), composto por três grupos de modo de ação (triazol, carboxamida e estrobilurina, respectivamente) apresentou alta fungitoxidade aos isolados de *C. cassicola*. Resultado esperado devido a ser o produto lançado por último no mercado, e apresentar ação em três sítios da fisiologia do fungo: na estrutura da parede celular, e em dois sítios da respiração celular. Fungicidas compostos por misturas triplas têm sido incorporados recentemente

como estratégias de manejo de doenças fúngicas, devido ao crescente processo de perda de sensibilidade aos fungicidas sítio-específicos (sistêmicos) quando aplicados isoladamente. Reis et al. (2010) descrevem que a redução da sensibilidade envolve uma propriedade fundamental dos organismos, a habilidade de adaptação a diferentes condições de ambiente para sobreviver. O uso frequente de compostos químicos (principalmente os sistêmicos) modifica o ambiente para os fungos, tornando-os insensíveis após a adaptação (seleção de indivíduos) a esta nova situação.

Fungicidas dos grupos químicos benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas são tradicionalmente aplicados, isoladamente ou em mistura, para o controle da mancha-alvo em soja. Essa doença tem sido encontrada em diferentes cultivares apresentando níveis variados de incidência e severidade (Almeida et al., 2005, Silva et al., 2008). Entretanto, com a baixa eficiência no controle do patógeno por muitos desses fungicidas quando utilizados isoladamente (Godoy et al., 2015, Godoy et al., 2013, Godoy et al., 2012, Godoy et al., 2014, Godoy et al., 2017, Godoy et al., 2016b, Meyer et al., 2013, Godoy et al., 2018), novos princípios ativos estão sendo incorporados às moléculas tradicionais, já existentes no mercado, a exemplo do ingrediente ativo fluxapiraxade (Agrofit, 2016), do grupo químico das carboxamidas, diversificando as estratégias químicas de manejo.

Moléculas do grupo das carboxamidas mostram-se eficientes na inibição do crescimento micelial do patógeno ao atuarem sobre a respiração mitocondrial dos fungos, especificamente no complexo II, impedindo a ação da enzima Succinato Desidrogenase e, posteriormente, bloqueando a produção de ATP (Carrijo, 2014). A incorporação desse outro grupo tem se mostrado eficiente principalmente em virtude da redução da eficiência dos grupos benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas usados tradicionalmente no controle da ferrugem-asiática e consequentemente afetando as populações de fungos causadores das doenças de final de ciclo (DFC), entre elas mancha-alvo.

Foi possível observar uma variação/redução da sensibilidade dos isolados de *C. cassiicola* aos diferentes fungicidas aplicados. Essa redução foi mais evidente na utilização da EC₉₈, onde, para a maioria dos fungicidas compostos por ingrediente único ou para as misturas duplas houve redução no nível de sensibilidade dos isolados. Apenas a mistura tripla (epoxiconazol + fluxapiraxade + piraclostrobina), foi capaz de inibir por completo o crescimento micelial em ambas as doses (EC₅₀ e EC₉₈). Esse resultado pode indicar que alguns isolados já apresentam algum nível de resistência simultânea aos princípios ativos dos grupos dos triazóis e das estrobilurinas, tendo em vista que a carboxamida só estava

presente na mistura tripla, e que, na utilização das demais misturas duplas (compostas por triazol + estrobilurina) alguns isolados apresentam resistência. Esses resultados corroboram com os obtidos por Basso et al. (2015), que avaliando diferentes fungicidas no controle de mancha-alvo em soja, no Mato Grosso, não observaram ganhos significativos com os fungicidas Trifloxistrobina + Prothioconazol e Picoxystrobina + Cyproconazol, (ambas misturas entre triazóis e estrobilurinas) com resultados de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) estatisticamente iguais à testemunha, sem aplicação de fungicidas. Ensaios *in vitro* realizados por Teramoto et al. (2017) verificaram que os isolados de *C. cassiicola* demonstraram variabilidade na sensibilidade aos grupos SDHI, DMI e QoI, o que aponta um alto risco de seleção por resistência e sugere que a resistência múltipla a fungicidas pode ocorrer em isolados de *C. cassiicola*.

O uso indiscriminado de fungicidas, inclusive os não recomendados para o patógeno ou cultura específica, pode levar ao surgimento de sérios problemas, entre eles a baixa eficiência no controle químico devido ao surgimento de isolados do patógeno resistentes aos compostos químicos utilizados. Esse processo têm sido evidenciado desde o início da década de 70 (Frac, 2015, Ghini and Kimati, 2000, Ishii, 2005, Garcia, 1999). Estudos evidenciaram a variação significativa da eficácia de fungicidas entre isolados de *C. cassiicola* provenientes de regiões produtoras distintas. Portanto, recomenda-se levar em consideração a interação cultivar de soja - fungicida - região (isolado) para avaliar a eficácia real de um fungicida no controle da mancha-alvo, diante da variabilidade genética do patógeno, eficácia de controle de diferentes fungicidas em locais distintos, com alta pressão da doença (Avozani, 2011, Teramoto et al., 2013). Além desses fatores, nesse estudo foi possível observar que o controle químico realizado para ferrugem-asiática está interferindo/variando a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* a fungicidas.

De maneira geral, os isolados da população de *C. cassiicola* classificados como sensíveis (S), apresentaram esse comportamento para ambas as doses (EC₅₀ e EC₉₈). Foi possível observar também que, em alguns casos, quando os isolados apresentavam algum nível de redução da sensibilidade na EC₅₀, ela se acentuou na EC₉₈. Apesar da EC₉₈, no geral, ser uma dose muito mais alta de ingrediente ativo (em comparação com a EC₅₀), a inibição esperada (98%) na grande maioria dos isolados para os diferentes fungicidas não foi alcançada.

Os resultados deste estudo indicam que a EC₉₈ possui maior eficácia para detectar diferenças entre os isolados fúngicos submetidos a fungicidas distintos. A EC₉₈ é

interessante por avaliar a quantidade de ingrediente ativo necessária para quase impedir por completo as atividades biológicas dos isolados fúngicos e praticamente erradicar o crescimento micelial. Pequenas variações na sensibilidade dos isolados já puderam ser identificadas a partir dessa dose, pois à medida que o isolado torna-se gradativamente resistente, maior será a dose de ingrediente ativo necessário para impedir por completo o crescimento do fungo. Pelo fato do crescimento máximo esperado ser de 2%, já é possível observar processos crescentes de resistência a partir de pequenas variações.

No caso da EC₉₈ não foram encontrados trabalhos prévios para a comparação dos resultados. Porém foi possível observar uma capacidade maior para detectar processos de resistência acumulando-se safra a safra dentro das diferentes regiões. O uso de isolados "selvagens" permite avaliar o estado dos processos de seleção/resistência em isolados de *C. cassiicola* brasileiros ao longo das safras. Houve variabilidade na sensibilidade *C. cassiicola* aos fungicidas dos diferentes grupos e misturas avaliados.

Diante dos resultados obtidos é possível observar que um importante fator que interfere no manejo e nos processos de perda de sensibilidade/maior resistência de isolados de *C. cassiicola* a fungicidas, são as técnicas de manejo da ferrugem asiática (principalmente o manejo químico). De acordo com Henning et al. (2014), para o controle da ferrugem recomenda-se a utilização de fungicidas formulados em mistura de diferentes grupos químicos, com aplicações preventivas (ou nos primeiros sintomas da doença). A semeadura no início da época recomendada, utilizando-se, preferencialmente, cultivares de ciclo precoce e cumprir o vazio sanitário. O controle genético, utilizando cultivares resistentes, que estão disponíveis para algumas regiões do Brasil, no entanto, não dispensam a utilização de fungicidas, uma vez que populações virulentas podem ser selecionadas em decorrência da variabilidade do patógeno. O tratamento de sementes, a rotação/sucessão de culturas com milho e outras espécies de gramíneas. A adoção de todas essas medidas favorece o manejo adequado da ferrugem-asiática impactando diretamente nas demais populações de fitopatógenos, dentre elas *C. cassiicola*.

3.5 CONCLUSÕES

- 1- Os isolados “selvagens” de *Corynespora cassiicola* apresentam variação na sensibilidade a fungicidas, indicando variabilidade genética pré-existente nessa espécie;
- 2- Os valores das EC₅₀ e EC₉₈ para o crescimento micelial, gerados a partir de isolados “selvagens” de *C. cassiicola*, podem ser utilizados como fator de referência para a realização de trabalhos futuros, *in vitro*, de monitoramento da sensibilidade de *Corynespora cassiicola* a fungicidas, empregados na cultura da soja;
- 3- Há grande variação na sensibilidade de populações de *C. cassiicola* de diferentes regiões e safras aos fungicidas empregados para o controle químico da ferrugem-asiática, indicando que esses produtos estão causando pressão de seleção nas populações de *C. cassiicola* e muito possivelmente aos outros patógenos de final de ciclo;
- 4- Os isolados apresentaram variabilidade na sensibilidade a fungicidas dos grupos dos triazóis (DMI) e das estrobilurinas (QoI), o que denota um alto risco de seleção por resistência e sugere que a resistência múltipla aos fungicidas pode estar ocorrendo em *C. cassiicola*.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOVE & SECEX. 2018. Estatística. Available:
http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/06072018-112745-exp_201806.pdf [Accessed 11 de julho de 2018].
- AGROFIT. 2016. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Available:
http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons [Accessed 11 novembro 2016].
- AGUIAR, F. M. 2015. *Caracterização de isolados de Corynespora cassiicola e avaliação da sensibilidade in vitro a fungicidas*. Doctor, Universidade de Brasília.
- ALMEIDA, A. M. R., FERREIRA, L. P., YORINORI, J. T., SILVA, J. F. V., HENNING, A. A., GODOY, C. V., COSTAMILAN, L. M. & MEYER, M. C. 2005. Doenças da Soja. In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. A. (eds.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4 ed.: Agronômica Ceres.
- ALMEIDA, A. M. R., MACHADO, C. C., FERREIRA, L. P., LEHMAN, P. S. & ANTONIO, H. 1976. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 1, 111-112.
- AVOZANI, A. 2011. *Sensibilidade de Corynespora cassiicola, isolados da soja, a fungicidas in vitro*. Mestrado, Universidade de Passo Fundo.
- AVOZANI, A. & FERREIRA, A. S. 2012. Mancha-alvo da soja. In: REIS, E. M. & CASA, R. T. (eds.) *Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado*. Passo Fundo, RS: Berthier.
- AVOZANI, A., REIS, E. M. & TONIN, R. B. 2014. Sensitivity loss by *Corynespora cassiicola*, isolated from soybean, to the fungicide carbendazim. *Summa Phytopathologica*, 40, 273-276.
- BASSO, P., BONALDO, S. M. & RUFFATO, S. 2015. Avaliação de fungicidas no controle de Antracnose e Mancha-alvo, e no rendimento da cultura da soja. *Scientia Agraria Paranaensis*, 14, 191-199.
- BECHER, R., HETTWER, U., KARLOVSKY, P., DEISING, H. B. & WIRSEL, S. G. R. 2010. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology*, 100, 444-453.
- BRASIL 2016. Zoneamento agrícola. In: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. (ed.). Brasília: BRASIL.
- BRASIL 2018. Estatísticas do Comércio Exterior: Visão Geral dos Produtos Exportados. In: MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, C. E. E. S. (ed.). Brasília: BRASIL.

- CABRAL, W. C. 2014. *Avaliação do efeito de fungicidas sob *Corynespora cassiicola* em condições de campo e em laboratório*. . Dissertação (Magister Scientiae) Universidade de Rio Verde – Campus Rio Verde.
- CARRIJO, D. R. 2014. *Efeitos fisiológicos provocados pelo fungicida Fluxapirroxade, isolado e em mistura com a Piraclostrobina, na cultura de soja*. . Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- CONAB 2018. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. v.5 - Safra 2017/18, n.10 - Décimo levantamento.
- EDGINGTON, L. V., KNEW, K. L. & BARRON, G. L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, 61, 42-44.
- EMBRAPA 2013. *Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil 2014*. , Londrina, Embrapa Soja.
- FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- FERREIRA FILHO, A. S. 2012. *Caracterização morfológica e enzimática de isolados de *Corynespora cassiicola* e reação de cultivares de soja à mancha-alvo*. . Doutorado, Universidade de Passo Fundo.
- FORCELINI, C. A. 1994. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I. triazoles. . *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 2, 335-355.
- FRAC. 2015. Fungicide resistance action committee. Available: <http://www.frac.info/home> [Accessed 01 de julho de 2018].
- GARCIA, A. 1999. *A resistência dos fungos como consequência da utilização de fungicidas sistêmicos: mecanismos de resistência. monitoramento e estratégias anti-resistência.*, Porto Velho, Embrapa Rondônia.
- GHINI, R. & KIMATI, H. 2000. *Resistência de Fungos a Fungicidas.*, Jagariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente.
- GODOY, C. V. 2006. Manejo de Doenças deve Ocorrer de Forma Integrada. *Visão Agrícola*, 5, 93-95.
- GODOY, C. V., ALMEIDA, A. M. R., COSTAMILAN, L. M., MEYER, M. C., DIAS, W. P., SEIXAS, C. D. S., SOARES, R. M., HENNING, A. A., YORINORI, J. T., FERREIRA, L. P. & SILVA, J. F. V. 2016a. Doenças da Soja In: AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. A. (eds.) *Manual De Fitopatologia: v. 2. Doenças das Plantas Cultivadas*. 5 ed. São Paulo - SP: Ceres.
- GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M., MEYER, M. C., CAMPOS, H. D., LOPES, I. D. O. N., DIAS, A. R., BULHÕES, C. C., PIMENTA, C. B., MIGUEL-WRUCK, D. S.,

- MOREIRA, E. N., RAMOS JUNIOR, E. U., BORGES, E. P., SIQUERI, F. V., ARAÚJO JÚNIOR, I. P., GRIGOLLI, J. F. J., NUNES JUNIOR, J., BELUFI, L. M. D. R., CARREGAL, L. H., VOLF, M. R., GOUSSAIN, M., DIAS, M. D., MARTINS, M. C. & CARLIN, V. J. 2018. *Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, Corynespora cassiicola, na cultura da soja, na safra 2017/18: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos*, Londrina, PR, Embrapa Soja.
- GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M., MEYER, M. C., CAMPOS, H. D., PIMENTA, C. B., BORGES, E. P., SIQUERI, F. V., JULIATTI, F. C., GRIGOLLI, J. F. J., NUNES JR., J., BELUTI, L. M. R., SILVA, L. H. C. P., SATO, L. N., VOLF, M. R., DIAS, M. D., MARTINS, M. C., CARLIN, V. J. & VENANCIO, W. S. 2015. *Eficácia de Fungicidas para o Controle Da Mancha-Alvo, Corynespora cassiicola, na Safra 2014/15: Resultados Sumarizados dos Ensaio Cooperativos*. , Londrina, PR, Embrapa Soja.
- 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., MADALOSSO, M., VOLF, M. R., MARTINS, M. C., BALARDIN, R. S., MONTECELLI, T. D. N., CARLIN, V. J. & VENÂNCIO, W. S. 2013. *Eficiência de Fungicidas para o Controle da Mancha-Alvo, Corynespora cassiicola, na Safra 2012/13: Resultados Sumarizados dos Ensaio Cooperativos*, Londrina - PR, Embrapa Soja.
- 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., MADALOSSO, M., BARROS, R., BALARDINI, R. S., MONTECELLI, T. D. N. & CARLIN, V. J. 2012. *Eficiência de Fungicidas para Controle da Mancha-Alvo, Corynespora cassiicola, na Safra 2011/12: Resultados Sumarizados dos Ensaio Cooperativos*., Londrina, PR, Embrapa Soja.
- GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M., MEYER, M. C., CAMPOS, H. D., PIMENTA, C. B. & JACCOUD FILHO, D. S. 2014. *Eficiência de Fungicidas para o Controle da Mancha-Alvo, Corynespora cassiicola, na Safra 2013/14: Resultados Sumarizados dos Ensaio Cooperativos*, Londrina - PR, Embrapa Soja.
- GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M., MEYER, M. C., CAMPOS, H. D., PIMENTA, C. B. & MIGUEL-WRUCK, D. S. 2017. *Eficiência de Fungicidas para o Controle da Mancha-Alvo, Corynespora cassiicola, na Safra 2016/17: Resultados Sumarizados dos Ensaio Cooperativos*, Londrina - PR, Embrapa Soja.
- GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M., MEYER, M. C., CAMPOS, H. D., PIMENTA, C. B., MIGUEL-WRUCK, D. S. & BORGES, E. P. 2016b. *Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, Corynespora cassiicola, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos*, Londrina, PR, Embrapa Soja.
- GRIGOLLI, J. F. J. 2016. Manejo de Doenças na Cultura da Soja. In: MELOTTO, A. M., LOURENÇÃO, A. L. F., GITTI, D. C. & GRIGOLLI, J. F. J. (eds.) *Tecnologia e Produção Safra 2015/2016*. 1 ed. Curitiba - PR: Midiograf.

- HARTMAN, G. L., SIKORA, E. J. & RUPE, J. C. 2015. Rust. In: HARTMAN, G. L., RUPE, J. C., SIKORA, E. J., DOMIER, L. L., DAVIS, J. A. & STEFFEY, K. L. (eds.) *Compendium of Soybean Diseases and Pests*. 5 ed. Saint Paul: Aps Press.
- 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. 2005. *Manual de Identificação de Doenças de Soja*, Londrina, Embrapa Soja.
- 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. 2014. *Manual de identificação de doenças de soja*, Londrina, Embrapa Soja.
- ISHII, H. 2005. Resistance Management Strategies for Fungicides. In: CLARK, J. M. & OHKAWA, H. (eds.) *Environmental Fate And Safety Management Of Agrochemicals*. Washington, Dc: American Chemical Society.
- JUHÁSZ, A. C. P., PÁDUA, G. P., WRUCK, D. S. M., FAVORETO, L. & N.R., R. 2013. Desafios Fitossanitários para a Produção de Soja. *Informe Agropecuário*, 34, 66-75.
- LEHNER, M. S., SILVA, R. A., VIEIRA, R. F., CARNEIRO, J. E. S., SCHNABEL, G. & MIZUBUTI, E. S. G. 2015. Fungicide Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: A Thorough Using Discriminatory Dose, Ec 50, High Resolution Melt Assessment Analysis and Description of New Point Mutation Associated with Resistance. *Plant Disease*, 99, 1537–1543.
- LEROUX, P., GREDT, M., LEROCH, M. & WALKER, A. S. 2010. Exploring Mecanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors In Field Strains of *Botrytis cinerea*, The Causal Agent Of Gray Mold. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 6615-6630.
- MACHADO, F. J. 2016. *Giberela do Trigo: Resistência a Fungicidas e Metanálise da Eficácia do Controle Químico* Dissertação (Magister Scientiae), Universidade Federal de Viçosa.
- MEYER, M. C., GODOY, C. V., VENÂNCIO, W. S. & TERAMOTO, A. 2013. *Manejo Equilibrado*, Pelotas, Cultivar Grandes Culturas.
- MIYAMOTO, T., ISHII, H., SEKO, T., KOBORI, S. & TOMITA, Y. 2009. Occurrence of *Corynespora cassiicola* Isolates Resistant to Boscalid on Cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology*, 58, 1144-1151.
- MOREIRA, E. N., COSTA, M. J. N., WAGNER, J. R. A., RIBOLI, E., CASONATTO, A. & LUPATINI, F. 2010. Momento, Número de Aplicações e Desenvolvimento de Fungicidas no Controle da Mancha-Alvo da Soja. *Tropical Plant Pathology*, 35, 79.
- OLIVE, L. S., BAIN, D. C. & LEFEBVRE, C. L. 1945. A Leaf Spot Of Cowpea and Soybean Caused By an Undescribed Species Of *Helminthosporium*. *Phytopathology*, 35, 822-831.

- PARREIRA, D. F., NEVES, W. S. & ZAMBOLIM, L. 2009. Resistência de Fungos A Fungicidas Inibidores de Quinona *Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas*, 3, 24-34.
- REIS, E. M., REIS, A. C. & CARMONA, M. A. 2010. *Manual De Fungicidas – Guia Para o Controle Químico de Doenças de Plantas*, Passo Fundo, UPF.
- RIBEIRO, F. D. C., COLOMBO, G. A., CARVALHO, E. V. D., PELÚZIO, J. M. & ERASMO, E. A. L. 2017. Controle Químico Da Mancha-Alvo da Soja (*Corynespora cassiicola*) no Cerrado Tocantinense-Brasil. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 4, 26-36.
- ROMERO, A. L., OLIVEIRA, R. R. D., ROMERO, R. B., ALMEIDA, A. L. D., DINIZ, S. P. S. D. S. & VIDA, J. B. 2013. Efeito de Monoterpenos Naturais no Crescimento Micelial e Germinação de Conídios de *Corynespora cassiicola*. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, 18, 3-7.
- SHARVELLE, E. G. 1961. *The Nature Uses of Modern Fungicides*, Minneapolis, Burgess Publishing Company.
- SILVA, L. H. C. P., CAMPOS, H. D. & SILVA, J. C. 2008. Fortalecida e Agressiva. *Revista Cultivar – Grandes Culturas*, 20-22.
- SPOLTI, P., DEL PONTE, E. M., DONG, Y., CUMMINGS, J. A. & BERGSTROM, G. C. 2014. Triazole Sensitivity in a Contemporary Population of *Fusarium graminearum* From New York Wheat And Competitiveness of a Tebuconazole-Resistant Isolate. *Plant Disease*, 98, 607–613.
- TECNOLOGIAS 2013. *Tecnologias de Produção de Soja – Região Central Do Brasil 2014*, Londrina, Embrapa Soja.
- TERAMOTO, A., MACHADO, T. A., SANTOS, L. M. D., VOLF, M. R., MEYER, M. C. & CUNHA, M. G. D. 2013. Reação de cultivares de soja à *Corynespora cassiicola*. *Tropical Plant Pathology*, 38, 68-71.
- TERAMOTO, A., MEYER, M. C., SUASSUNA, N. D. & CUNHA, M. G. D. 2017. In vitro sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. *Summa Phytopathologica*, 43, 281-289.
- TOMLIN, C. D. S. 2002. *The Pesticide Manual: A World Compendium*, Surrey, Uk, British Crop Protection Council.
- WEI, C. T. 1950. Notes on *Corynespora*. *Mycological Papers*, 30, 10.
- YORINORI, J. T., PAIVA, W. M., FREDERICK, R. D., COSTAMILAN, L. M., BERTAGNOLLI, P. F., HARTMAN, G. L., GODOY, C. V. & NUNES JUNIOR, J. 2005. Epidemics Of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) In Brazil And Paraguay. *Plant Disease*, 89, 675-677.
- ZAMBOLIM, L., VENÂNCIO, W. S. & OLIVEIRA, S. H. F. 2007. *Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas*, Viçosa - MG, UFV.

3.7 APÊNDICES

Tabela 3.3. Origem dos isolados de *Corynespora cassiicola*

Trat.	Código na coleção do NPF	Código de Trabalho	Ano do Isolamento/ Safr	Município/Estado
1	GO-13-1-3	CC-3	2012/13	Santo Antônio /GO
2	GO-13-1-4	CC-4	2012/13	Santo Antônio /GO
3	GO-13-1-9	CC-9	2012/13	Santo Antônio /GO
4	GO-13-1-17	CC-17	2012/13	Santo Antônio /GO
5	GO-13-1-19	CC-19	2012/13	Santo Antônio /GO
6	GO-13-1-20	CC-20	2012/13	Santo Antônio /GO
7	GO-13-1-21	CC-21	2012/13	Santo Antônio /GO
8	GO-13-1-44	CC-44	2012/13	Santo Antônio /GO
9	GO-12-2-1	CC-99	2011/12	Morrinhos/GO
10	GO-12-2-3	CC-101	2011/12	Morrinhos/GO
11	GO-12-2-4	CC-102	2011/12	Morrinhos/GO
12	GO-12-2-5	CC-103	2011/12	Morrinhos/GO
13	GO-12-2-6	CC-104	2011/12	Morrinhos/GO
14	GO-12-4-2	CC-132	2011/12	Rio Verde/GO
15	GO-12-4-5	CC-135	2011/12	Montividiu/GO
16	GO-13-5-1	CC-137	2012/13	São Miguel/GO
17	GO-13-3-2	CC-141	2012/13	Porangatu/GO
18	MT-12-1-3	CC-144	2011/12	Nova Xavantina/MT
19	MT-12-1-6	CC-147	2011/12	Nova Xavantina/MT
20	MT-12-1-7	CC-148	2011/12	Nova Xavantina/MT
21	MT-12-1-8	CC-149	2011/12	Nova Xavantina/MT
22	MT-12-1-10	CC-151	2011/12	Nova Xavantina/MT
23	MT-12-1-11	CC-152	2011/12	Nova Xavantina/MT
24	MT-12-5-1	CC-161	2011/12	Sinop/MT
25	MT-12-7-1	CC-163	2011/12	Barra do Garças/MT
26	MA-12-3-2	CC-180	2011/12	Tasso Fragoso/MA
27	MA-13-1-2	CC-186	2012/13	Riachão/MA
28	MA-13-1-3	CC-187	2012/13	Riachão/MA
29	MA-13-1-6	CC-190	2012/13	Riachão/MA
30	MA-13-1-7	CC-191	2012/13	Riachão/MA
31	MA-13-1-9	CC-193	2012/13	Riachão/MA
32	MA-13-1-11	CC-195	2012/13	Riachão/MA
33	MA-13-2-8	CC-213	2012/13	São Raimundo das Mangabeiras/MA
34	MA-13-2-11	CC-216	2012/13	São Raimundo das Mangabeiras/MA
35	PA-13-1-1	CC-240	2012/13	Paragominas/PA
36	PA-13-1-2	CC-241	2012/13	Paragominas/PA
37	PA-13-1-3	CC-242	2012/13	Paragominas/PA
38	PA-13-1-4	CC-243	2012/13	Paragominas/PA

39	PA-13-1-5	CC-244	2012/13	Paragominas/PA
40	PA-13-1-6	CC-245	2012/13	Paragominas/PA
41	PA-13-1-7	CC-246	2012/13	Paragominas/PA
42	PA-13-1-8	CC-247	2012/13	Paragominas/PA
43	PA-13-1-9	CC-248	2012/13	Paragominas/PA
44	PA-13-1-10	CC-249	2012/13	Paragominas/PA
45	PA-13-1-14	CC-253	2012/13	Paragominas/PA
46	TO-12-1-1	CC-254	2011/12	Pedro Afonso/TO
47	MG-12-1-1	CC-257	2011/12	Tupaciguara/MG
48	MG-12-1-2	CC-258	2011/12	Tupaciguara/MG
49	MG-12-1-3	CC-259	2011/12	Tupaciguara/MG
50	MS-12-1-1	CC-261	2011/12	Maracaju/MS
51	GO-17-7-1	CC-262	2016/17	Senador Canedo/GO
52	GO-17-7-3	CC-264	2016/17	Senador Canedo/GO
53	GO-17-7-11	CC-272	2016/17	Senador Canedo/GO
54	GO-17-7-13	CC-274	2016/17	Senador Canedo/GO
55	GO-17-7-21	CC-282	2016/17	Senador Canedo/GO
56	GO-17-7-23	CC-284	2016/17	Senador Canedo/GO
57	GO-17-7-33	CC-294	2016/17	Senador Canedo/GO
58	GO-17-7-41	CC-302	2016/17	Senador Canedo/GO
59	GO-17-7-43	CC-304	2016/17	Senador Canedo/GO
60	GO-17-7-51	CC-312	2016/17	Senador Canedo/GO
61	GO-17-7-53	CC-314	2016/17	Senador Canedo/GO
62	GO-17-7-54	CC-315	2016/17	Senador Canedo/GO

Tabela 3.4. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de *C. cassiicola* a doses crescentes de cyproconazol.

Isolado	0		0,005		0,01		0,05		0,1		0,5		1,0	
312	43,500*	d	21,500	c	15,750	b	10,375	b	1,750	b	0,000	a	0,000	a
313	46,875	c	0,000	e	0,000	c	0,000	c	0,000	b	0,000	a	0,000	a
316	40,500	d	30,750	b	26,250	a	12,625	b	21,875	a	0,000	a	0,000	a
317	51,500	b	28,125	b	27,125	a	14,000	a	17,875	a	0,750	a	0,000	a
318	47,625	c	8,875	d	0,000	c	0,000	c	0,000	b	0,000	a	0,000	a
322	54,875	b	0,000	e	0,000	c	0,000	c	0,000	b	0,000	a	0,000	a
323	61,125	a	34,125	a	28,625	a	16,125	a	20,625	a	1,125	a	0,000	a
CV%	18,25													

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.5. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de *C. cassiicola* a doses crescentes de difeconazol.

Isolado	0		0,005		0,01		0,05		0,1		0,5		1,0	
312	61,000*	a	1,375	a	1,125	a	1,000	a	0,125	a	0,000	a	0,125	a
313	45,250	c	0,250	a	0,500	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
316	39,125	d	1,250	a	0,750	a	0,375	a	0,500	a	0,750	a	0,750	a
317	49,750	c	1,875	a	0,875	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
318	50,375	c	0,875	a	1,125	a	0,250	a	0,250	a	2,125	a	1,375	a
322	53,125	b	2,000	a	0,500	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
323	47,250	c	1,750	a	2,375	a	2,250	a	0,750	a	0,000	a	0,000	a
CV%	40,80													

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.6. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de *C. cassiicola* a doses crescentes de tebuconazol

Isolado	0		0,005		0,01		0,05		0,1		0,5		1,0	
312	49,500*	b	4,875	b	3,125	c	1,125	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a
313	48,250	b	0,500	c	0,000	d	0,000	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a
316	46,375	b	9,25	a	10,500	a	3,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
317	52,625	a	4,00	b	2,375	c	0,000	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a
318	50,750	a	0,75	c	0,000	d	0,000	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a
322	53,750	a	0,00	c	0,000	d	0,000	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a
323	50,750	a	5,50	b	7,250	b	5,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
CV%	25,70													

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.7. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de *C. cassiicola* a doses crescentes de trifloxistrobina + tebuconazol.

Isolado	0		0,005		0,01		0,05		0,1		0,5		1,0	
312	41,875*	d	16,625	b	16,125	a	3,000	b	0,000	b	0,000	a	0,000	a
313	54,125	b	0,500	c	0,000	b	0,000	b	0,000	b	0,000	a	0,000	a
316	45,500	d	15,375	b	13,125	a	1,000	b	3,375	a	0,000	a	0,000	a
317	53,625	b	12,125	b	0,000	b	0,000	b	0,000	b	1,000	a	2,625	a
318	49,375	c	21,250	a	18,125	a	7,375	a	5,125	a	4,625	a	0,750	a
322	57,500	a	0,000	c	0,000	b	0,000	b	0,000	b	0,000	a	0,000	a
323	61,500	a	0,000	c	1,375	b	0,125	b	0,000	b	1,000	a	0,125	a
CV%	28,22													

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.8. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de *C. cassiicola* a doses crescentes de trifloxistrobina + protioconazol.

Isolado	0		0,005		0,01		0,05		0,1		0,5		1,0	
312	50,875*	d	3,000	a	0,625	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
313	50,625	d	0,000	b	0,000	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
316	52,500	d	0,250	b	0,000	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
317	56,250	c	0,875	b	1,625	a	0,250	a	0,375	a	1,250	a	0,000	a
318	58,750	b	3,625	a	2,750	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
322	64,000	a	0,000	b	0,000	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
323	59,500	b	1,500	b	3,250	a	1,000	a	1,250	a	1,375	a	2,000	a
CV%	18,97													

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.9. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de *C. cassiicola* a doses crescentes de epoxiconazol + piraclostrobina

Isolado	0		0,005		0,01		0,05		0,1		0,5		1,0	
312	64,750*	a	30,250	b	22,125	a	11,875	b	8,250	a	0,000	a	0,000	a
313	59,750	b	6,750	c	0,000	c	0,000	c	0,000	b	0,000	a	0,000	a
316	56,500	b	30,375	b	13,250	b	6,625	c	3,125	b	0,250	a	0,000	a
317	60,625	b	37,000	a	24,000	a	9,875	b	5,750	a	0,625	a	0,000	a
318	50,375	c	35,125	a	23,125	a	18,625	a	13,875	a	0,750	a	0,125	a
322	43,250	d	9,500	c	0,000	c	0,000	c	0,000	b	0,000	a	0,000	a
323	70,250	a	40,625	a	26,625	a	11,500	b	7,750	a	1,000	a	0,000	a
CV%	29,41													

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.10. Avaliação da sensibilidade dos isolados “selvagens” de *C. cassicola* a doses crescentes de epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina.

Isolado	0		0,005		0,01		0,05		0,1		0,5		1,0	
312	51,500*	c	2,875	a	0,625	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
313	50,750	c	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
316	57,625	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
317	50,250	c	2,000	a	0,250	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
318	58,500	b	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
322	40,875	d	4,250	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
323	68,250	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a	0,000	a
CV%	39,71													

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.15. Avaliação de sensibilidade a fungicidas em populações de *C. cassicola* usando as EC₅₀ para cyproconazol, difenoconazol e tebuconazol.

Isolado	Safr	DMI									
		Cyproconazol				Difenoconazol				Tebuconazol	
		EC ₅₀ (%cresc.)	Sensibilidade		EC ₅₀ (%cresc.)	Sensibilidade		EC ₅₀ (%cresc.)	Sensibilidade		
CC-3	2012/2013	10,495*	f	MS	21,225	b	MS	15,819	c	MS	
CC-4	2012/2013	17,069	e	MS	23,471	b	MS	20,253	b	MS	
CC-9	2012/2013	0,000	g	S	27,553	a	MS	2,087	e	S	
CC-17	2012/2013	16,022	e	MS	12,756	c	MS	20,965	b	MS	
CC-19	2012/2013	16,400	e	MS	26,923	a	MS	18,654	b	MS	
CC-20	2012/2013	19,376	d	MS	11,217	c	MS	13,538	d	MS	
CC-21	2012/2013	11,775	f	MS	25,735	a	MS	10,702	d	MS	
CC-44	2012/2013	14,311	e	MS	28,016	a	MS	17,034	c	MS	
CC-99	2011/2012	13,585	f	MS	28,506	a	MS	17,181	c	MS	
CC-101	2011/2012	23,540	c	MS	0,000	d	S	18,336	b	MS	

CC-102	2011/2012	16,052	e	MS	25,152	a	MS	13,989	d	MS
CC-103	2011/2012	27,930	b	MS	30,871	a	MS	18,704	b	MS
CC-104	2011/2012	14,829	e	MS	25,314	a	MS	18,800	b	MS
CC-132	2011/2012	12,524	f	MS	21,529	b	MS	14,156	d	MS
CC-135	2011/2012	11,176	f	MS	24,153	b	MS	18,504	b	MS
CC-137	2012/2013	14,465	e	MS	29,887	a	MS	11,845	d	MS
CC-141	2012/2013	21,273	c	MS	10,788	c	MS	23,735	a	MS
CC-144	2011/2012	16,464	e	MS	0,000	d	S	24,874	a	MS
CC-147	2011/2012	15,385	e	MS	25,255	a	MS	13,611	d	MS
CC-148	2011/2012	16,800	e	MS	18,444	b	MS	13,465	d	MS
CC-149	2011/2012	16,222	e	MS	6,790	c	S	16,702	c	MS
CC-151	2011/2012	31,780	a	MS	10,136	c	MS	24,535	a	MS
CC-152	2011/2012	17,083	e	MS	24,945	a	MS	17,255	c	MS
CC-161	2011/2012	18,200	d	MS	28,511	a	MS	18,182	b	MS
CC-163	2011/2012	18,548	d	MS	22,785	b	MS	20,083	b	MS
CC-180	2011/2012	19,337	d	MS	12,984	c	MS	20,833	b	MS
CC-186	2012/2013	19,756	d	MS	31,776	a	MS	15,726	c	MS
CC-187	2012/2013	13,832	f	MS	31,590	a	MS	16,257	c	MS
CC-190	2012/2013	17,113	e	MS	22,777	b	MS	20,751	b	MS
CC-191	2012/2013	14,653	e	MS	28,000	a	MS	17,613	c	MS
CC-193	2012/2013	13,740	f	MS	29,249	a	MS	16,105	c	MS
CC-195	2012/2013	11,475	f	MS	32,143	a	MS	15,589	c	MS
CC-213	2012/2013	19,512	d	MS	29,936	a	MS	16,667	c	MS
CC-216	2012/2013	13,124	f	MS	28,056	a	MS	15,625	c	MS
CC-240	2012/2013	16,418	e	MS	28,976	a	MS	15,730	c	MS
CC-241	2012/2013	14,885	e	MS	26,087	a	MS	16,728	c	MS
CC-242	2012/2013	23,596	c	MS	17,980	b	MS	21,536	b	MS
CC-243	2012/2013	13,936	f	MS	29,047	a	MS	14,844	c	MS
CC-244	2012/2013	21,616	c	MS	26,503	a	MS	13,592	d	MS
CC-245	2012/2013	15,613	e	MS	28,330	a	MS	16,914	c	MS
CC-246	2012/2013	13,840	f	MS	21,398	b	MS	19,305	b	MS

CC-247	2012/2013	12,046	f	MS	26,518	a	MS	16,000	c	MS
CC-248	2012/2013	17,568	d	MS	26,243	a	MS	16,176	c	MS
CC-249	2012/2013	16,371	e	MS	27,451	a	MS	17,454	c	MS
CC-253	2012/2013	14,808	e	MS	25,904	a	MS	12,291	d	MS
CC-254	2011/2012	14,315	e	MS	22,561	b	MS	14,400	d	MS
CC-257	2011/2012	14,674	e	MS	24,046	b	MS	19,170	b	MS
CC-258	2011/2012	12,648	f	MS	26,482	a	MS	16,926	c	MS
CC-259	2011/2012	17,751	d	MS	25,397	a	MS	19,222	b	MS
CC-261	2011/2012	18,887	d	MS	26,070	a	MS	15,704	c	MS
CC-262	2016/2017	18,939	d	MS	21,353	b	MS	24,211	a	MS
CC-264	2016/2017	16,901	e	MS	19,508	b	MS	23,058	a	MS
CC-272	2016/2017	19,248	d	MS	25,210	a	MS	21,099	b	MS
CC-274	2016/2017	22,222	c	MS	22,222	b	MS	18,381	b	MS
CC-282	2016/2017	20,690	c	MS	27,921	a	MS	19,778	b	MS
CC-284	2016/2017	18,087	d	MS	25,591	a	MS	16,200	c	MS
CC-294	2016/2017	13,196	f	MS	21,336	b	MS	17,363	c	MS
CC-302	2016/2017	18,540	d	MS	29,605	a	MS	19,361	b	MS
CC-304	2016/2017	18,022	d	MS	17,485	b	MS	14,989	c	MS
CC-312	2016/2017	18,083	d	MS	21,042	b	MS	15,354	c	MS
CC-314	2016/2017	18,722	d	MS	23,503	b	MS	23,165	a	MS
CC-315	2016/2017	14,831	e	MS	24,652	a	MS	19,089	b	MS
C.V.%		15,99			18,72			12,64		

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.16. Avaliação de sensibilidade á fungicidas em populações de *C. cassicola* usando as EC₅₀ para as misturas entre trifloxistrobina + tebuconazol e trifloxistrobina + protioconazol.

Isolado	Safr	Qol + DMI					
		Trifloxistrobina + Tebuconazol			Trifloxistrobina + Protiocnazol		
		EC ₅₀ (%cresc.)		Sensibilidade	EC ₅₀ (%cresc.)		Sensibilidade
CC-3	2012/2013	10,714*	d	MS	18,182	b	MS
CC-4	2012/2013	14,695	c	MS	27,092	b	MS
CC-9	2012/2013	0,000	e	S	7,629	d	S
CC-17	2012/2013	12,637	d	MS	24,944	b	MS
CC-19	2012/2013	14,433	c	MS	24,775	b	MS
CC-20	2012/2013	13,603	c	MS	8,592	d	S
CC-21	2012/2013	16,029	c	MS	32,990	a	MS
CC-44	2012/2013	13,404	c	MS	25,054	b	MS
CC-99	2011/2012	11,623	d	MS	12,354	c	MS
CC-101	2011/2012	14,314	c	MS	40,000	a	MS
CC-102	2011/2012	14,538	c	MS	15,862	c	MS
CC-103	011/2012	12,452	d	MS	21,084	b	MS
CC-104	2011/2012	12,928	d	MS	14,624	c	MS
CC-132	2011/2012	15,947	c	MS	37,300	a	MS
CC-135	2011/2012	10,678	d	MS	30,088	a	MS
CC-137	2012/2013	11,887	d	MS	7,219	d	S
CC-141	2012/2013	28,571	a	MS	20,469	b	MS
CC-144	2011/2012	6,043	e	S	22,305	b	MS
CC-147	2011/2012	10,721	d	MS	9,152	d	S
CC-148	2011/2012	11,434	d	MS	24,691	b	MS
CC-149	2011/2012	2,429	e	S	14,063	c	MS
CC-151	2011/2012	17,248	c	MS	27,706	b	MS
CC-152	2011/2012	13,690	c	MS	5,906	d	S
CC-161	2011/2012	14,398	c	MS	23,282	b	MS
CC-163	2011/2012	14,418	c	MS	27,447	b	MS
CC-180	2011/2012	8,897	d	S	7,071	d	S

CC-186	2012/2013	11,810	d	MS	14,192	c	MS
CC-187	2012/2013	7,573	d	S	12,661	c	MS
CC-190	2012/2013	9,020	d	S	19,952	b	MS
CC-191	2012/2013	10,183	d	MS	10,024	d	MS
CC-193	2012/2013	10,626	d	MS	13,696	c	MS
CC-195	2012/2013	14,179	c	MS	16,352	c	MS
CC-213	2012/2013	9,761	d	S	5,791	d	S
CC-216	2012/2013	10,991	d	MS	5,310	d	S
CC-240	2012/2013	12,739	d	MS	23,653	b	MS
CC-241	2012/2013	13,556	c	MS	16,667	c	MS
CC-242	2012/2013	16,917	c	MS	12,009	c	MS
CC-243	2012/2013	9,979	d	S	13,843	c	MS
CC-244	2012/2013	12,743	d	MS	12,099	c	MS
CC-245	2012/2013	13,690	c	MS	12,557	c	MS
CC-246	2012/2013	10,549	d	MS	15,842	c	MS
CC-247	2012/2013	11,492	d	MS	10,482	c	MS
CC-248	2012/2013	16,952	c	MS	16,667	c	MS
CC-249	2012/2013	9,595	d	S	20,814	b	MS
CC-253	2012/2013	12,371	d	MS	18,802	b	MS
CC-254	2011/2012	10,828	d	MS	7,470	d	S
CC-257	2011/2012	8,679	d	S	15,756	c	MS
CC-258	2011/2012	12,963	d	MS	10,412	c	MS
CC-259	2011/2012	14,176	c	MS	12,121	c	MS
CC-261	2011/2012	9,980	d	S	23,232	b	MS
CC-262	2016/2017	14,440	c	MS	15,704	c	MS
CC-264	2016/2017	18,619	c	MS	18,519	b	MS
CC-272	2016/2017	15,275	c	MS	0,573	d	S
CC-274	2016/2017	17,634	c	MS	21,130	b	MS
CC-282	2016/2017	23,391	b	MS	11,027	c	MS
CC-284	2016/2017	16,162	c	MS	14,484	c	MS
CC-294	2016/2017	18,075	c	MS	13,836	c	MS

CC-302	2016/2017	15,800	c	MS	13,619	c	MS
CC-304	2016/2017	11,752	d	MS	9,779	d	S
CC-312	2016/2017	11,837	d	MS	0,000	d	S
CC-314	2016/2017	21,322	b	MS	6,004	d	S
CC-315	2016/2017	16,844	c	MS	7,371	d	S
C.V.%		26,57			39,72		

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.17. Avaliação de sensibilidade a fungicidas em populações de *C. cassicola* usando as EC₅₀ para as misturas entre epoxiconazol + piraclostrobina e para epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina.

Isolado	Safr	DMI + Qol			DMI + SDHI + Qol		
		Epoxiconazol + Piraclostrobina			Epoxiconazol + Fluxapiroxade + Piraclostrobina		
		EC ₅₀ (%cresc.)	Sensibilidade		EC ₅₀ (%cresc.)	Sensibilidade	
CC-3	2012/2013	0,401*	f	S	0,000**		S
CC-4	2012/2013	3,755	e	S	0,000		S
CC-9	2012/2013	0,000	f	S	0,000		S
CC-17	2012/2013	4,647	e	S	0,000		S
CC-19	2012/2013	2,345	e	S	0,000		S
CC-20	2012/2013	1,796	e	S	0,000		S
CC-21	2012/2013	2,198	e	S	0,000		S
CC-44	2012/2013	5,499	d	S	0,000		S
CC-99	2011/2012	8,898	c	S	0,000		S
CC-101	2011/2012	14,463	a	MS	0,000		S
CC-102	2011/2012	8,222	c	S	0,000		S
CC-103	011/2012	8,687	c	S	0,000		S
CC-104	2011/2012	8,077	c	S	0,000		S
CC-132	2011/2012	1,656	e	S	0,000		S
CC-135	2011/2012	11,192	b	MS	0,000		S
CC-137	2012/2013	7,073	d	S	0,000		S
CC-141	2012/2013	13,654	a	MS	0,000		S

CC-144	2011/2012	0,000	f	S	0,000	S
CC-147	2011/2012	6,145	d	S	0,000	S
CC-148	2011/2012	7,129	d	S	0,000	S
CC-149	2011/2012	0,190	f	S	0,000	S
CC-151	2011/2012	3,085	e	S	0,000	S
CC-152	2011/2012	0,584	f	S	0,000	S
CC-161	2011/2012	4,274	e	S	0,000	S
CC-163	2011/2012	0,000	f	S	0,000	S
CC-180	2011/2012	0,000	f	S	0,000	S
CC-186	2012/2013	2,083	e	S	0,000	S
CC-187	2012/2013	0,839	f	S	0,000	S
CC-190	2012/2013	0,952	f	S	0,000	S
CC-191	2012/2013	2,025	e	S	0,000	S
CC-193	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-195	2012/2013	0,451	f	S	0,000	S
CC-213	2012/2013	0,212	f	S	0,000	S
CC-216	2012/2013	0,225	f	S	0,000	S
CC-240	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-241	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-242	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-243	2012/2013	5,714	d	S	0,000	S
CC-244	2012/2013	0,465	f	S	0,000	S
CC-245	2012/2013	1,667	e	S	0,000	S
CC-246	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-247	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-248	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-249	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-253	2012/2013	0,000	f	S	0,000	S
CC-254	2011/2012	0,000	f	S	0,000	S
CC-257	2011/2012	0,000	f	S	0,000	S
CC-258	2011/2012	0,215	f	S	0,000	S

CC-259	2011/2012	0,000	f	S	0,000	S
CC-261	2011/2012	0,395	f	S	0,000	S
CC-262	2016/2017	0,750	f	S	0,000	S
CC-264	2016/2017	0,798	f	S	0,000	S
CC-272	2016/2017	1,629	e	S	0,000	S
CC-274	2016/2017	0,000	f	S	0,000	S
CC-282	2016/2017	3,295	e	S	0,000	S
CC-284	2016/2017	1,326	f	S	0,000	S
CC-294	2016/2017	0,960	f	S	0,000	S
CC-302	2016/2017	2,286	e	S	0,000	S
CC-304	2016/2017	0,000	f	S	0,000	S
CC-312	2016/2017	1,000	f	S	0,000	S
CC-314	2016/2017	0,000	f	S	0,000	S
CC-315	2016/2017	1,989	e	S	0,000	S
C.V.%		69,25				

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

**As médias foram analisadas pelo teste F e não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 3.18. Avaliação de sensibilidade á fungicidas em populações de *C. cassicola* usando as EC₉₈ para cyproconazol, difeconazol e tebuconazol.

Isolado	Safr	DMI							
		Cyproconazol			Difenoconazol			Tebuconazol	
		EC ₉₈ (%cresc.)	Sensibilidade		EC ₉₈ (%cresc.)	Sensibilidade		EC ₉₈ (%cresc.)	Sensibilidade
CC-3	2012/2013	1,386*	c	S	10,722	d	HNS	0,000**	S
CC-4	2012/2013	2,041	c	MS	9,862	d	NS	1,447	S
CC-9	2012/2013	0,000	c	S	6,483	d	NS	0,000	S
CC-17	2012/2013	1,105	c	S	4,328	e	NS	1,855	S
CC-19	2012/2013	1,400	c	S	18,510	c	HNS	0,000	S
CC-20	2012/2013	0,445	c	S	4,563	e	NS	0,000	S
CC-21	2012/2013	1,630	c	S	16,728	c	HNS	0,000	S

CC-44	2012/2013	2,297	c	NS	10,838	d	HNS	0,200	S
CC-99	2011/2012	1,321	c	S	16,552	c	HNS	0,193	S
CC-101	2011/2012	1,203	c	S	0,606	e	S	0,756	S
CC-102	2011/2012	1,085	c	S	11,562	d	HNS	0,000	S
CC-103	011/2012	2,148	c	MS	21,970	b	HNS	0,000	S
CC-104	2011/2012	1,901	c	MS	16,946	c	HNS	0,400	S
CC-132	2011/2012	0,000	c	S	14,487	c	HNS	0,000	S
CC-135	2011/2012	1,961	c	MS	12,288	c	HNS	0,197	S
CC-137	2012/2013	1,887	c	S	12,970	c	HNS	0,194	S
CC-141	2012/2013	4,000	c	NS	1,712	e	S	0,389	S
CC-144	2011/2012	0,173	c	S	0,000	e	S	0,000	S
CC-147	2011/2012	2,115	c	MS	20,978	b	HNS	0,378	S
CC-148	2011/2012	1,800	c	S	8,667	d	NS	0,198	S
CC-149	2011/2012	2,669	c	NS	0,412	e	S	0,000	S
CC-151	2011/2012	3,814	c	NS	0,000	e	S	0,000	S
CC-152	2011/2012	1,152	c	S	8,830	d	NS	0,000	S
CC-161	2011/2012	5,800	b	NS	21,064	b	HNS	0,000	S
CC-163	2011/2012	8,266	a	NS	17,300	c	HNS	0,000	S
CC-180	2011/2012	0,368	c	S	5,695	d	NS	0,000	S
CC-186	2012/2013	5,499	b	NS	13,318	c	HNS	0,000	S
CC-187	2012/2013	2,056	c	MS	23,139	a	HNS	0,567	S
CC-190	2012/2013	1,856	c	MS	23,644	a	HNS	0,791	S
CC-191	2012/2013	1,980	c	MS	20,421	b	HNS	0,783	S
CC-193	2012/2013	1,718	c	S	14,032	c	HNS	5,431	NS
CC-195	2012/2013	2,131	c	MS	17,460	c	HNS	0,951	S
CC-213	2012/2013	1,016	c	S	25,265	a	HNS	0,000	S
CC-216	2012/2013	1,294	c	S	17,234	c	HNS	0,368	S
CC-240	2012/2013	7,836	a	NS	21,133	b	HNS	0,000	S
CC-241	2012/2013	1,468	c	S	17,787	c	HNS	0,368	S
CC-242	2012/2013	1,498	c	S	12,727	c	HNS	2,434	NS
CC-243	2012/2013	1,883	c	S	19,956	b	HNS	0,000	S

CC-244	2012/2013	4,148	b	NS	18,486	c	HNS	0,194	S
CC-245	2012/2013	1,976	c	MS	24,947	a	HNS	0,000	S
CC-246	2012/2013	1,365	c	S	17,161	c	HNS	0,193	S
CC-247	2012/2013	1,912	c	MS	20,040	b	HNS	0,600	S
CC-248	2012/2013	0,386	c	S	15,905	c	HNS	0,000	S
CC-249	2012/2013	1,775	c	S	19,172	b	HNS	0,411	S
CC-253	2012/2013	0,914	c	S	16,466	c	HNS	0,745	S
CC-254	2011/2012	4,564	b	NS	16,057	c	HNS	0,200	S
CC-257	2011/2012	3,080	c	NS	20,611	b	HNS	0,593	S
CC-258	2011/2012	1,976	c	MS	16,601	c	HNS	0,195	S
CC-259	2011/2012	1,183	c	S	16,270	c	HNS	1,080	S
CC-261	2011/2012	6,362	b	NS	18,872	c	HNS	1,625	S
CC-262	2016/2017	8,333	a	NS	18,816	c	HNS	0,000	S
CC-264	2016/2017	6,841	b	NS	16,667	c	HNS	1,700	S
CC-272	2016/2017	10,398	a	HNS	15,546	c	HNS	1,758	S
CC-274	2016/2017	7,256	a	NS	16,865	c	HNS	2,188	MS
CC-282	2016/2017	5,287	b	NS	17,624	c	HNS	0,000	S
CC-284	2016/2017	7,692	a	NS	21,935	b	HNS	0,000	S
CC-294	2016/2017	5,979	b	NS	20,043	b	HNS	0,000	S
CC-302	2016/2017	4,734	b	MS	27,193	a	HNS	0,000	S
CC-304	2016/2017	5,495	b	NS	14,342	c	HNS	0,000	S
CC-312	2016/2017	7,843	a	NS	18,236	c	HNS	0,000	S
CC-314	2016/2017	0,000	c	S	19,734	b	HNS	0,000	S
CC-315	2016/2017	6,144	b	NS	17,694	c	HNS	0,000	S
C.V.%		54,59			22,65				

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

** As médias foram analisadas pelo teste F, pela prevalência de médias iguais a zero não necessário/possível realizar o teste de comparação de médias.

Tabela 3.19. Avaliação de sensibilidade á fungicidas em populações de *C. cassiicola* usando as EC₉₈ para as misturas entre trifloxistrobina + tebuconazol e trifloxistrobina + protioconazol.

Isolado	Safr	Qol + DMI					
		Trifloxistrobina + Tebuconazol			Trifloxistrobina + Protiocnazol		
		EC ₉₈ (%cresc.)		Sensibilidade	EC ₉₈ (%cresc.)		Sensibilidade
CC-3	2012/2013	0,992*	e	S	7,095	b	NS
CC-4	2012/2013	6,631	c	NS	9,562	a	NS
CC-9	2012/2013	0,000	e	S	0,166	b	S
CC-17	2012/2013	9,707	c	NS	11,804	a	HNS
CC-19	2012/2013	2,887	d	S	10,135	a	HNS
CC-20	2012/2013	12,316	b	HNS	10,263	a	HNS
CC-21	2012/2013	8,197	c	NS	6,598	b	NS
CC-44	2012/2013	4,938	d	MS	3,640	b	NS
CC-99	2011/2012	6,814	c	NS	9,091	a	NS
CC-101	2011/2012	9,344	c	NS	21,818	a	HNS
CC-102	2011/2012	8,055	c	NS	4,368	b	NS
CC-103	011/2012	1,533	e	S	10,843	a	HNS
CC-104	2011/2012	3,042	d	NS	7,957	b	NS
CC-132	2011/2012	2,814	d	NS	12,128	a	HNS
CC-135	2011/2012	4,312	d	NS	7,743	b	NS
CC-137	2012/2013	7,170	c	NS	7,219	b	NS
CC-141	2012/2013	10,000	c	NS	14,286	a	HNS
CC-144	2011/2012	0,195	e	S	16,543	a	HNS
CC-147	2011/2012	4,873	d	NS	11,161	a	HNS
CC-148	2011/2012	6,202	c	NS	6,996	b	NS
CC-149	2011/2012	1,215	e	S	6,696	b	NS
CC-151	2011/2012	6,160	c	NS	16,234	a	HNS
CC-152	2011/2012	3,571	d	NS	4,277	b	NS
CC-161	2011/2012	6,312	c	NS	13,747	a	HNS
CC-163	2011/2012	13,678	b	HNS	11,489	a	HNS
CC-180	2011/2012	0,193	e	S	12,121	a	HNS

CC-186	2012/2013	0,571	e	S	8,952	a	NS
CC-187	2012/2013	0,971	e	S	10,730	a	HNS
CC-190	2012/2013	1,569	e	S	8,413	b	NS
CC-191	2012/2013	7,128	c	NS	8,115	b	NS
CC-193	2012/2013	10,436	c	HNS	11,087	a	HNS
CC-195	2012/2013	4,664	d	NS	7,128	b	NS
CC-213	2012/2013	0,398	e	S	6,904	a	NS
CC-216	2012/2013	8,108	c	NS	11,062	a	HNS
CC-240	2012/2013	6,157	c	NS	5,386	b	NS
CC-241	2012/2013	0,393	e	S	15,401	a	HNS
CC-242	2012/2013	4,699	d	NS	11,790	a	HNS
CC-243	2012/2013	10,403	c	HNS	8,471	b	NS
CC-244	2012/2013	2,592	d	NS	6,420	b	NS
CC-245	2012/2013	9,524	c	NS	6,393	b	NS
CC-246	2012/2013	1,266	e	S	10,891	a	HNS
CC-247	2012/2013	10,484	c	HNS	1,468	b	S
CC-248	2012/2013	4,762	d	NS	18,089	a	HNS
CC-249	2012/2013	4,904	d	NS	7,014	b	NS
CC-253	2012/2013	5,773	c	NS	4,339	b	NS
CC-254	2011/2012	6,369	c	NS	4,337	b	NS
CC-257	2011/2012	8,284	c	NS	7,563	b	NS
CC-258	2011/2012	3,909	d	NS	5,206	b	NS
CC-259	2011/2012	6,705	c	NS	10,390	a	HNS
CC-261	2011/2012	0,399	e	S	13,939	a	HNS
CC-262	2016/2017	7,759	c	NS	6,467	b	NS
CC-264	2016/2017	10,669	c	HNS	13,508	a	HNS
CC-272	2016/2017	8,961	c	NS	0,191	b	S
CC-274	2016/2017	12,473	b	HNS	16,192	a	HNS
CC-282	2016/2017	1,717	e	S	9,125	a	NS
CC-284	2016/2017	7,677	c	NS	5,040	b	NS
CC-294	2016/2017	7,662	c	NS	3,774	b	NS

CC-302	2016/2017	10,600	c	HNS	9,728	a	NS
CC-304	2016/2017	4,274	d	NS	4,059	b	NS
CC-312	2016/2017	0,816	e	S	0,000	b	S
CC-314	2016/2017	20,043	a	HNS	0,828	b	S
CC-315	2016/2017	8,955	c	NS	0,398	b	S
C.V.%		50,14			61,45		

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Tabela 3.20. Avaliação de sensibilidade á fungicidas em populações de *C. cassicola* usando as EC₉₈ para as misturas entre epoxiconazol + piraclostrobina e epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina.

Isolado	Safr	DMI + Qol		DMI + SDHI + Qol	
		Epoxiconazol + Piraclostrobina		Epoxiconazol + Fluxapiroxade + Piraclostrobina	
		EC ₉₈ (%cresc.)	Sensibilidade	EC ₉₈ (%cresc.)	Sensibilidade
CC-3	2012/2013	0,000**	S	0,000**	S
CC-4	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-9	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-17	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-19	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-20	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-21	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-44	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-99	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-101	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-102	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-103	011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-104	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-132	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-135	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-137	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-141	2012/2013	0,000	S	0,000	S

CC-144	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-147	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-148	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-149	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-151	2011/2012	0,181	S	0,000	S
CC-152	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-161	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-163	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-180	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-186	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-187	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-190	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-191	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-193	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-195	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-213	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-216	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-240	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-241	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-242	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-243	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-244	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-245	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-246	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-247	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-248	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-249	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-253	2012/2013	0,000	S	0,000	S
CC-254	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-257	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-258	2011/2012	0,000	S	0,000	S

CC-259	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-261	2011/2012	0,000	S	0,000	S
CC-262	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-264	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-272	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-274	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-282	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-284	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-294	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-302	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-304	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-312	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-314	2016/2017	0,000	S	0,000	S
CC-315	2016/2017	0,000	S	0,000	S

** As médias foram analisadas pelo teste F e não apresentaram diferenças significativas.

4 *Corynespora cassiicola* UMA ESPÉCIE OU UM COMPLEXO?

4.1 RESUMO

O fungo *Corynespora cassiicola* pode infectar folhas, hastes, vagens, raízes, sobreviver em restos culturais e sementes (as quais podem ser responsáveis por disseminação de inóculo a longas distâncias) de vários hospedeiros. Além disso, pode produzir estruturas de resistência, os clamidósporos, que se configuram como importante fonte de inóculo. Em soja duas patologias são atribuídas a *C. cassiicola*, mancha-alvo e podridão radicular de *Corynespora*. O conhecimento a respeito da biologia do patógeno e possíveis diferenças entre os isolados que ocasionam ambas as doenças é necessário. Esse estudo objetivou-se a caracterização morfológica (colônias e conídios) e molecular a partir de dois pares de *primers* específicos (GA4F/GA4R e CCF-1/CCR-1) e o sequenciamento das regiões do gene ribossomal ITS e β -tubulina, de isolados de *C. cassiicola* provenientes de folhas e raízes de soja. Analisar a variabilidade genética entre os isolados usando 12 marcadores moleculares ISSR. Avaliar a patogenicidade cruzada entre ambos os grupos de isolados. E por fim, a sensibilidade a fungicidas e a determinação da EC_{50} e EC_{98} para os isolados provenientes de folhas e raízes de soja. As características morfológicas das colônias e conídios demonstraram a existência de diferenças claras, relacionadas à coloração, crescimento, tamanho e produção de células de resistência entre ambos os grupos de isolados. Entre os pares de *primers* específicos para *C. cassiicola*, apenas CCF-1/CCR-1 amplificou ambos os grupos, sendo que GA4F/GA4R amplificou fragmentos apenas no grupo de isolados provenientes de folhas. O sequenciamento dos dois genes caracterizou os isolados de folha como pertencentes à espécie *C. cassiicola*, entretanto os isolados de raiz apresentaram diferenças em nível de espécie para o gene fator de alongação 1- α , e em nível de família para a β -tubulina, sendo caracterizados como *C. cassiicola* apenas para o gene ribossomal ITS. A diversidade genética foi analisada com 12 *primers* ISSR, obtendo um percentual de polimorfismo de 97,2%. Os valores de dissimilaridade genética, calculados de acordo com o complemento do índice de Dice, variaram de 0 a 0,797, refletindo uma variabilidade genética alta entre os grupos de isolados de *C. cassiicola*. O teste de Mantel apresentou correlação positiva ($r = 0,97$) entre o tecido vegetal de origem do isolado e a distância genética. Por meio da AMOVA, foi possível observar uma estruturação alta entre os dois grupos de isolados, referente ao tecido vegetal do qual são provenientes (raiz e folha). O teste de patogenicidade cruzada demonstrou a capacidade dos dois grupos de isolados infectarem ambos os tecidos vegetais (folha e raiz), porém apresentando diferenças na velocidade e intensidade e expressão dos sintomas. Na avaliação de sensibilidade dos isolados a fungicidas, foi possível observar que os isolados de raiz apresentam maior sensibilidade a fungicidas, sendo que as doses EC_{50} e EC_{98} , estimadas para esse grupo também foram menores que as determinadas para os isolados de folhas. Os resultados indicam que os isolados de folha pertencem à espécie *Corynespora cassiicola*, já os isolados de raiz tratam-se de uma nova espécie fúngica.

Palavras-chave: soja, mancha-alvo, podridão radicular de *Corynespora*, caracterização.

4.2 INTRODUÇÃO

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei (1950) é uma espécie cosmopolita, frequentemente abundante nos trópicos, com relatos de ocorrência em folhas, sementes, haste e raiz de diversos hospedeiros (Farr and Rossman, 2018, Shimomoto et al., 2011). O fungo já foi relatado infectando 402 hospedeiros (Farr and Rossman, 2018), dentre eles, muitas espécies de importância econômica.

Quanto à classificação, este fungo vem sofrendo algumas modificações ao longo dos anos. Atualmente *C. cassiicola* é uma espécie classificada como pertencente ao super-reino Eukaryota, reino Fungi, Sub-reino Dikarya, ao filo Ascomycota, Sub-filo Pezizomycotina, a classe Dothideomycetes, sub-classe Pleosporomycetidae, a ordem Pleosporales, subordem Massarineae, família: Corynesporascaceae e gênero *Corynespora* (Agrios, 2005, Kirk et al., 2008, Mycobank, 2018, Schoch et al., 2009, Voglmayr and Jaklitsch, 2017).

Corynespora cassiicola é comumente isolado de tecidos vegetais apresentando sintomas típicos da mancha-alvo. A espécie também pode ser saprófita (encontrado em restos de materiais orgânicos) ou endofítica (presente em tecidos vivos não sintomáticos) (Déon et al., 2014). Essa característica combinada ao grande número de hospedeiros conhecidos de *C. cassiicola* e a produção de estruturas de resistência (clamidósporos), contribuem para a sobrevivência do patógeno no campo por longos períodos (Déon et al., 2012, Oliveira et al., 2012, Pernezny and Simone, 1993).

No Brasil, na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), *C. cassiicola* tem aumentado sua relevância em função dos danos que pode ocasionar à planta (Ribeiro et al., 2017). A doença foi relatada pela primeira vez no país no ano de 1976 no Paraná e em São Paulo (Almeida et al., 1976). Os sintomas mais comuns da mancha-alvo são lesões nas folhas, com halo amarelado e pontuação escura no centro, que podem causar desfolha severa. Verificam-se também manchas nas hastes e nas vagens (Henning et al., 2014).

O fungo *C. cassiicola* também pode causar podridão radicular, sendo comum em plantios de soja com sistema de semeadura direta (Embrapa, 2010), onde as plantas infectadas ocorrem ao acaso na plantação, apresentando amarelecimento das folhas e maturação desuniforme. As raízes infectadas por *C. cassiicola* apresentam coloração castanho-claro e, após a morte da planta, podem ser cobertas por uma camada negra de

conidióforos e conídios do fungo. A ocorrência da podridão de raiz está aumentando com a expansão das áreas em semeadura direta (Almeida et al., 2005, Henning et al., 2014).

A mancha-alvo da soja e a podridão radicular de *Corynespora* são doenças atribuídas à mesma espécie, *Corynespora cassiicola*. Porém em estudos realizados por Spencer and Walters (1969), determinaram através da inoculação em soja e feijão, a existência de duas raças distintas de *C. cassiicola*. Segundo os autores, as diferenças morfológicas, patogênicas e culturais entre esses isolados sugeriram a existência de variação em nível de espécie. Estes relataram ainda, que isolados obtidos de raiz e haste, não infectam folhas, enquanto os provenientes de folhas não infectam raízes de soja. Da mesma forma, Sinclair and Shurtleff (1975) descrevem que, devido às diferenças morfológicas, o isolado que infecta hipocótilo, raízes e hastes, provavelmente trata-se de uma espécie diferente daquela que infecta as folhas, vagens e sementes.

De acordo com Almeida et al. (2005), apesar de apresentar características morfológicas semelhantes ao *C. cassiicola* isolado de folhas, o fungo causador da podridão radicular não evolui para a mancha-alvo quando inoculado em folhas, causando apenas pequenas lesões necróticas. Por outro lado, Yorinori (1989) descreve que isolados de *C. cassiicola* obtidos de infecções radiculares podem causar manchas foliares, porém, estudos mais detalhados são necessários para confirmar que se tratam do mesmo patógeno.

Por se tratar de um patógeno com uma ampla gama de hospedeiros, *C. cassiicola* foi alvo de vários estudos que se concentraram principalmente em entender as relações existentes entre o patógeno e seus hospedeiros, no que diz respeito à origem, morfologia, diversidade genética, filogenia e também com a possível especialização da espécie (Dixon et al., 2009, Macedo and Pereira, 2013, Qi et al., 2011, Shimomoto et al., 2011). Estes estudos conseguiram consolidar a hipótese de que *C. cassiicola* é uma espécie complexa.

Com relação ao estudo da variabilidade genética de *Corynespora cassiicola*, há trabalhos que buscaram relacionar origem do hospedeiro com a sua virulência (Silva et al., 2003), a especialização de hospedabilidade com a diversidade filogenética (Dixon et al., 2009), a morfologia com as características moleculares dos isolados (Qi et al., 2011), a patogenicidade com a variação genética dos isolados (Shimomoto et al., 2011), e a associação entre as isoformas do gene que codifica a enzima cassicolina e os clados filogenéticos formados pelos isolados de diferentes hospedeiros (Dal'Sasso, 2017). Porém trabalhos relacionados à podridão radicular de *Corynespora* são escassos, sendo que

características morfológicas e moleculares do patógeno, a diversidade genética, estratégias de controle, comparações/associações com o patógeno que causa mancha-alvo e possível especiação entre ambos os grupos ainda não estão bem definidos.

O conhecimento a respeito da biologia de um patógeno/doença é essencial para controle/manejo do mesmo. Com relação à mancha-alvo, várias estratégias são recomendadas para o controle da doença tais como: o uso de cultivares resistentes, o tratamento de sementes, a rotação/sucessão de culturas com milho e espécies de gramíneas e pulverizações com fungicidas (Almeida et al., 2005, Henning et al., 2014). Já com relação à podridão radicular de *Corynespora*, existem poucas informações sobre a eficiência de fungicidas para seu controle, e não se tem conhecimento de programas de melhoramento de soja frente a essa patologia. Entretanto há relatos de aumento na ocorrência em áreas em semeadura direta (Almeida et al., 2005, Henning et al., 2014), que pode estar relacionado a continuidade/aumento de inóculo na área.

Baseando-se na hipótese de que os isolados de *Corynespora cassiicola* coletados em folhas sintomáticas causando mancha-alvo e isolados de raiz causando podridão radicular de *Corynespora* em soja pertencem a espécies fúngicas diferentes, os objetivos deste estudo foram: i) Caracterização morfomolecular dos isolados de *C. cassiicola*; ii) Analisar a diversidade genética entre os isolados de *C. cassiicola* obtidos de diferentes partes de plantas de soja (folhas e raízes) por meio de marcadores moleculares ISSR; iii) Avaliar a estrutura genética entre os isolados de folhas e raízes; iv) Avaliar a patogenicidade cruzada entre os isolados; v) Analisar a sensibilidade a fungicidas pelos dois grupos de isolados de *C. cassiicola*, com o propósito de, responder a seguinte questão: *Corynespora cassiicola* em soja é uma espécie ou um complexo?

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Local de execução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Pesquisa em Fitopatologia (NPF) da Universidade Federal de Goiás (UFG), localizada em Goiânia, GO, entre setembro de 2016 e julho de 2018.

4.3.2 Obtenção dos isolados de *Corynespora cassiicola*

Isolados de *C. cassiicola* provenientes de múltiplas regiões do Brasil coletados entre os anos de 1992 a 2001 foram cedidos da coleção micológica da Embrapa Soja. Os isolados foram coletados de folhas e raízes de soja (Tabelas 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1. Isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de folhas de soja.

Isolado	Data de Coleta	País	UF	Cidade
312	13/11/1997	Brasil	MT	Itiquira
313	02/03/1998	Brasil	MT	Nova Mutum
316	20/01/1999	Equador	EC	Equador
317	18/02/1999	Brasil	PR	Palotina
318	14/03/1999	Brasil	MT	Campo Novo Parecis
322	04/04/2001	Brasil	PR	Nova Ventura de São Roque
323	03/03/2001	Brasil	MT	Sapezal

Tabela 4.2. Isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de raiz de soja.

Isolado	Data de Coleta	País	UF	Cidade
305	26/04/1992	Brasil	PR	Guarapuava
306	/04/1996	Brasil	PR	—
308	/06/1997	Brasil	PR	Ponta Grossa
314	28/12/1998	Brasil	PR	Mangueirinha
315	05/01/1999	Brasil	PR	—
319	17/03/2000	Brasil	PR	Irati
320	30/03/2000	Brasil	PR	Turvo
321	30/03/2000	Brasil	PR	Guarapuava

4.3.3. Caracterização morfológica dos isolados de *Corynespora cassiicola*

4.3.3.1. Morfologia de colônias

Discos de micélio de 9 mm de diâmetro dos isolados (Tabelas 4.1 e 4.2) foram retirados dos bordos de colônias com sete dias de idade e transferidos para o centro de

placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo meio BDA. Em seguida, as placas foram vedadas e mantidas em câmaras de crescimento (tipo B.O.D), ajustadas para a temperatura de 25°C (Teramoto et al., 2013) sob regime de 12 horas/luz, durante sete dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada tratamento. Na avaliação foram observadas características como cor, forma e textura da colônia. Após sete dias as colônias foram mensuradas, com medições perpendiculares do diâmetro. Os dados do diâmetro médio das colônias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do Software Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2011).

4.3.3.2. Morfologia de conídios

Para a mensuração dos conídios foram utilizados os mesmos isolados da caracterização morfológica da colônia, exceto os isolados 313, 316 e 322 ambos provenientes de folhas de soja e que não apresentaram produção de conídios. Os conídios produzidos foram fixados em lâminas de vidro contendo lactofenol para posterior observação.

De cada isolado foi observado a coloração, aferido o tamanho dos conídios (largura e comprimento) e contados o número de pseudosseptos de 50 conídios. As estruturas foram observadas em microscopia de luz (Microscópio Olympus Cover – Bx41 com auxílio do software Dino capture 2.0) sob o aumento de 10 vezes (para isolados de raiz) e 20 vezes (para isolados de folha) para a realização da identificação morfológica dos isolados. Os dados obtidos foram comparados com a chave classificatória do fungo, estabelecida por Ellis and Holliday (1971), submetidos à análise de variância e, quando significativos, as médias foram discriminadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, com o auxílio do software Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2011).

4.3.4. Caracterização molecular dos isolados de *Corynespora cassiicola*

4.3.4.1. Extração de DNA

Quinze isolados de *Corynespora cassiicola* foram cultivados em meio BDA acrescido de 25% de ágar por 20 dias sob o fotoperíodo de 12 horas/luz a temperatura de 25°C (Teramoto et al., 2013). A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo adaptado de Dellaporta et al. (1983). Para cada amostra, fragmentos de micélio foram colocados em tubos eppendorf (1,5 mL), com 500 µl de tampão de extração Dellaporta (NaCl 0,5M, Tris 0,1M, EDTA 0,05M) e, em seguida, macerados com pistilo. Adicionou-se 33 µl de SDS 20%, seguido de agitação por 2 minutos em vórtex. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos (banho-seco). Acrescentou-se 160 µl de acetato de potássio 5M e novamente as amostras foram agitadas em vortex por 2 minutos e levadas para a centrífuga a 14.000 rpm por 10 minutos.

Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para novos tubos eppendorf (1,5 mL), onde foram adicionados 330 µl de isopropanol. As amostras foram agitadas e levadas a centrífuga a 14.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante de cada amostra, mantendo os pellets no fundo dos tubos. Adicionou-se 500 µl de etanol 70% e centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram removidos com cuidado e, após secagem por 30 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram ressuspensas em 50 µl de água Milli-Q. O DNA extraído de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific) e as concentrações ajustadas para 20 ng/µl.

4.3.4.2. PCR

Para a identificação molecular, as reações de PCR foram realizadas utilizando dois pares de *primers* (Tabela 4.3) ambos específicos para *Corynespora cassiicola* GA4-F/GA4R (Dixon et al., 2009) e CCF/CCR-1 (Qi et al., 2009). Outros dois pares de *primers* utilizados foram ITS (*internal transcribed spacer region*) (ITS1/ITS4) para amplificação parcial do gene ribossômico (regiões ITS1, 5.8S rDNA e ITS2) e para o gene β -tubulina (Bt2a/Bt2b) (Tabela 4.3). O produto da PCR destes dois pares de *primers* foi encaminhado para sequenciamento.

Para o par de *primers* GA4F/GA4R foi realizada uma PCR multiplex. O volume final das reações foi de 10 µl, sendo 1,0 µl de DNA, 8,2 µl de Master Mix (Emerald Master Mix Takara), 0,2 µl de *primer* ITS-1 e 0,2 µl de *primer* ITS-4, 0,2 µl de *primer* GA4-F e 0,2 µl de *primer* GA4-R. Para ambos os *primers* foram inseridas amostras de controle positivo, além dos controles negativos de reação e ambiente. Para os demais *primers* as reações de PCR foram preparadas para um volume final de 10ul, sendo 1,0 µl de DNA, 5,0 µl de Master Mix (Emerald Master Mix Takara), 3,6 µl de água ultra pura (dH₂O Kit Emerald Master Mix Takara), 0,2 µl de *primer* forward e 0,2 µl de *primer* reverse (para cada região amplificada).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler® Nexus. As condições para amplificação foram desnaturação inicial a 94 °C/5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C/30 segundos para desnaturação, temperatura de anelamento variou de acordo com cada *primer* (Tabela 4.3), extensão a 72°C /2 minutos e extensão final de 72°C/10 min.

Tabela 4.3. *Primers* e temperaturas de anelamentos

<i>Primer</i>	Sequência 5'- 3'	C° Anelamento	Referências
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	60	White et al. (1990).
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	60	
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	58	Glass and Donaldson (1995).
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	58	
GA4-F	CCTGCTCCGACTTTGTTGAG	60	Dixon et al. (2009).
GA4-R	GTCTGGGAGCAGCAAAGACT	60	
CCF-1	CCCTTCGAGATAGCACCC	60	Qi et al. (2009).
CCR-1	ATGCCCTAAGGAATACCAAA	60	

4.3.4.3. Eletroforese

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) em buffer TBE 1X a 80 volts por uma hora. Foram utilizados 5 µl da amostra do produto da PCR e 2 µl do corante GelRed™ (Biotium). Como padrão de massa molecular foi adotado o marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, Life Technologies). O gel foi observado em um transluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia®).

4.3.4.4. Sequenciamento

Oito isolados de *C. cassiicola* foram selecionados para o sequenciamento molecular das regiões do gene ribossomal ITS (ITS1/ITS4) e β -tubulina (Bt2a/Bt2b). Sendo quatro provenientes de folhas (312, 317, 318 e 323) e quatro de raízes (306, 315, 319 e 321) de soja, com o intuito de confirmação da identificação molecular a partir da PCR com os *primers* específicos (GA4-F/GA4-R e CCF/CCR). Os produtos da PCR foram encaminhados para o sequenciamento molecular na empresa Macrogen. Os resultados do sequenciamento foram submetidos a buscas por sequências similares no GenBank, utilizando a ferramenta Blast do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

4.3.4.5. Análise das sequências

Árvores filogenéticas foram construídas a partir das sequências de nucleotídeos dos isolados de *Corynespora* de folhas e raízes de soja, obtidas para a região do gene ribossomal ITS (*internal transcribed spacer region*) e para o gene β -tubulina. Sequências *forward* e *reverse* de cada isolado foram usadas para formar suas respectivas sequências consenso. As sequências para cada gene e para a junção dos dois genes (sequências contigue) foram alinhadas com base no algoritmo CLUSTAL disponível no programa MEGA v. 6.0 (Tamura et al., 2013). As árvores filogenéticas, baseadas nas sequências, foram construídas com base no método de máxima verossimilhança com robustez de 10.000 randomizações não paramétricas por *bootstrap*, utilizando o software MEGA v.6.0.

Na construção das árvores filogenéticas foram utilizadas, além das sequências dos isolados de *C. cassiicola* em estudo (Tabelas 4.1 e 4.2), sequências de referência (Tabela 4.4), disponíveis no GenBank das regiões do gene ribossomal ITS e β -tubulina.

Tabela 4.4. Sequencias comparativas obtidas no GenBank com respectivos táxon e códigos de acesso para o gene ribossomal ITS e β -tubulina.

Taxon	Strain/ Nº cultura	ITS	β -tubulina
<i>Bipolaris maydis</i>	BM27	KX834891.1	KX835023.1
<i>Bipolaris maydis</i>	CBS 130.26	LT631306.1	
<i>Bipolaris sorghicola</i>	CBS 249.49	HF934927.1	-
<i>Corynespora cassiicola</i>	BS8	KJ954124.1	KJ954133.1
<i>Corynespora cassiicola</i>	ZM170455	MG132186.1	MG132194.1

<i>Corynespora endiandrae</i>	CBS:138902	KP004450.1	-
<i>Corynespora leucadendri</i>	CBS 135133	KF251150.1	KF252639.1
<i>Corynespora olivacea</i>	CBS 484.77	JQ044429.1	-
<i>Corynespora smithii</i>	L130	KY984298.1	-
<i>Corynespora smithii</i>	NBRC8162	-	AB539436.1
<i>Curvularia hawaiiensis</i>	CBS 173.57	MH857687.1	KT021342.1
<i>Cyclothyriella rubronotata</i>	TR	KX650541.1	-
<i>Helminthosporium solani</i>	CBS 640.85	MH861907.1	-
<i>Helminthosporium solani</i>	HSCA3171	-	AF461132.1
<i>Setosphaeria pedicellata</i>	CBS 322.64	HF934952.1	LT899382.1
<i>Setosphaeria turcica</i>	CBS 387.58	LT837483.1	LT899338.1

4.3.5. Diversidade e estrutura genética de isolados de *C. cassicola* por meio de marcadores ISSR

4.3.5.1. Reações de PCR

O estudo da variabilidade genética foi realizado com 12 *primers* ISSR, após ajustados os ciclos de amplificação por PCR (Tabela 4.5). O volume final das reações de PCR foi de 10 uL, sendo 1,0 µL de DNA, 5,0 µL de Master Mix (Emerald Master Mix Takara), 3,6 µL de água ultra pura (dH₂O Kit Emerald Master Mix Takara) e 0,4 µL de *primer*. As condições para amplificação foram desnaturação inicial a 94 °C/5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C/30 segundos, temperatura de anelamento variou de acordo com cada *primer* (Tabela 4.5) 72°C /2 minutos, e extensão final de 72 °C/10 min.

Tabela 4.5. *Primers* de marcadores ISSR e temperatura de anelamento (C°).

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	C° Anelamento	Referências
ISSR10	CTCCTCCTCCTCRC	48	Serra et al. (2007).
ISSR11	GAGGAGGAGGAGRC	50	Serra et al. (2007)
MJ3	GTGCCTGTGCCTG	53	Nghia et al. (2008)
MJ4	GCCAACGCCAACG	44	Nghia et al., (2008).
MJ5	CCGTCACCGTCAA	46	Nghia et al., (2008).
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48	Qi et al. (2011).
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	46	Qi et al., (2011).
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	44	Qi et al., (2011).
UBC826	ACACACACACACACACC	58	Nghia et al., (2008).

UBC828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	44	Nghia et al., (2008).
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	48	Nghia et al., (2008).
UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGTGTYC	55	Nghia et al., (2008).

4.3.5.2. Eletroforese ISSR

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0 % (p/v) em buffer TBE 1X por uma hora e meia a 90 volts. Utilizou-se 5 µl da amostra do produto da PCR e 2 µl do corante GelRed™ (Biotium). O tamanho relativo dos fragmentos foi avaliado com o auxílio do marcador 1Kb plus DNA “Ladder” (Invitrogen, Life Technologies). O gel foi analisado em transiluminador com luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia®).

4.3.5.3. Análise dos dados genéticos obtidos por meio dos marcadores ISSR

As bandas geradas pela amplificação com os 12 *primers* ISSR foram quantificadas por meio de contagem visual, e os fragmentos de DNA amplificados foram registrados em uma matriz de caráter binário atribuindo 1 para presença de banda e 0 para ausência. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada dividindo o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas amplificadas pelo referido *primer*. A dissimilaridade genética entre os indivíduos foi mensurada utilizando os coeficientes de Jaccard e Dice. O agrupamento dos indivíduos e a construção do dendrograma foram feitos pelo método UPGMA, usando o pacote *ape* (v. 5.1) através do software R versão 3.4.1 (R Core Team, 2018).

Para testar a correlação entre a origem do isolado (parte da planta) e a distância genética, para a obtenção do valor cofenético, foi realizado o teste de Mantel com 10.000 permutações, utilizando o R (v. 3.4.1) através do pacote *ape* (v. 5.1) (R Core Team, 2018). A análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi conduzida para evidenciar os fatores que determinam a formação dos grupos, usando o pacote *ade4* (v. 1.7-13) (R versão 3.4.1) (R Core Team, 2018). Para determinação dos índices de diferenciação genética de Φ_{ST} (F_{ST}) e a variância entre os componentes e seus níveis de significância foi feita a análise de variância molecular (AMOVA) empregando o pacote *peg* (v. 0.11) no sistema R (v 3.4.1) (R Core Team, 2018).

4.3.6. Teste de Patogenicidade Cruzada

Oito isolados de *C. cassiicola*, sendo quatro de folha (312, 317, 318 e 323) e quatro de raiz (306, 308, 315 e 319), foram empregados no teste de patogenicidade cruzada. Discos de micélio de 9 mm de diâmetro foram retirados dos bordos de colônias (com dez dias de idade) e transferidos para o centro de placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio BDA, em seguida, as placas foram vedadas e mantidas em câmaras de crescimento tipo B.O.D, a 25°C (Teramoto et al., 2013), sob regime de 12 horas/luz, durante dez dias.

4.3.6.1. Inoculação de folha destacada

A técnica de inoculação em folha destacada foi realizada para o teste de patogenicidade na parte aérea (Garcia et al., 2015, Juliatti et al., 2014). Sementes de soja (cultivar 7300 Nidera) foram previamente semeadas em vasos de polietileno de 1L preenchidos com substrato comercial (Plantmax HT®) autoclavado. Quando as plantas atingiram o estágio fenológico V4, as folhas ilesas (que não apresentavam lesões, nem sintomas doenças) foram retidas e em seguida lavadas em água corrente e secas em papel toalha.

As folhas foram dispostas aos pares em caixas gerbox, forradas com duas folhas de papel toalha umedecidas em água destilada estéril, contendo uma tampa invertida de placa de Petri (90 mm) previamente esterilizadas (para evitar o contato direto da folha e do disco de micélio com a água) e procedeu-se com a inoculação. As folhas foram inoculadas com discos de micélio retirados das bordas das colônias dos isolados de *C. cassiicola* totalizando dez folhas inoculadas. As folhas do tratamento controle foram inoculadas com discos contendo apenas meio de cultura BDA. As folhas nas caixas gerbox foram incubadas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental adotado foi blocos casualizados (DBC) com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma caixa gerbox (com duas folhas).

A evolução dos sintomas foi avaliada diariamente por dez dias. Quando as folhas se tornaram sintomáticas, as mesmas foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha sendo uma parte destinada ao reisolamento (postulado de Koch). A outra parte das amostras foi destinada a detecção molecular com os *primers* específicos para *C.*

cassiicola (GA4/F; GA4/R e CCF-1/CCR-1). Cinco discos foliares (8 cm) foram retirados das áreas de transição de sintomas das folhas e armazenados em tubos eppendorf (1,5 mL) para a posterior extração de DNA total pelo protocolo de Dellaporta et al. (1983), seguido de PCR e eletroforese em gel de agarose a 1% (etapas descritas no item 4.3.2).

4.3.6.2. Inoculação na raiz

No teste de patogenicidade cruzada no sistema radicular, sementes de soja (cultivar 7300 Nidera) foram colocadas para germinar em papel germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco (papel germitest), depositados em gerbox e colocadas em germinador a 25°C em regime de 12horas/luz. O teste foi composto por quatro repetições (gerbox) com cinco sementes em cada, totalizando 20 sementes para cada isolado, no delineamento experimental blocos casualizados (DBC) com quatro repetições.

Utilizou-se a metodologia proposta por Raffel et al. (1999) para confirmar a patogenicidade, para isso, inoculou-se as raízes das plântulas de soja cinco dias após a germinação com um disco de micélio retirado da borda das colônias de *C. cassiicola* (isolados de raiz e de folha). As gerbox foram mantidas por 14 dias a 25 °C numa câmara de crescimento, em regime de 12horas/luz. No tratamento controle as plântulas foram inoculadas com discos contendo apenas BDA.

A evolução dos sintomas foi avaliada diariamente. Após o período de avaliação as raízes foram destacadas das plântulas e lavadas em água corrente e secas com papel toalha. Uma parte das raízes de cada tratamento foi destinada ao reisolamento (postulado de Koch). A outra parte das amostras foi utilizada para a detecção molecular com os *primers* específicos para *C. cassiicola* (GA4/F; GA4/R e CCF; CCR). Fragmentos das raízes foram retirados das áreas de transição de sintomas e armazenados em tubos de plástico (Eppendorf) (1,5 mL) para a posterior extração de DNA total pelo protocolo de Dellaporta et al. (1983), a reação de PCR e eletroforese em gel de agarose a 1% (etapas descritas no item 4.3.2).

4.3.7. Sensibilidade dos isolados de *C. cassiicola* a fungicidas

4.3.7.1. Estimativa da EC₅₀ e EC₉₈

A estimativa da EC₅₀ e EC₉₈ (concentração do fungicida que reduz 50% e 98% do crescimento micelial) para os fungicidas dos grupos dos triazóis, estrobilurinas e misturas foram realizadas utilizando os 15 isolados (sete de folha e oito de raiz). Foram avaliados sete fungicidas (Tabela 4.6) recomendados para o controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) na cultura da soja (Embrapa, 2013), pois as populações de *C. cassiicola* são afetadas por esse sistema de aplicação de fungicidas nessa cultura.

Tabela 4.6. Fungicidas empregados/utilizados nos testes de sensibilidade

Nome Comercial	Ingrediente Ativo (i.a.)	Concentração de i.a.	Modo de Ação do Grupo
Alto 100	cyproconazole	10%	DMI*
Score 250 EC	difenoconazole	25%	DMI
Folicur 200 EC	tebuconazole	20%	DMI
Fox	trifloxistrobina + protioconazol	15 + 17%	Qol + DMI
Nativo	trifloxistrobina + tebuconazol	10% + 20%	Qol + DMI
Ópera	epoxiconazol + piraclostrobina	5% + 13%	DMI + Qol
Ativum	epoxiconazol + fluxapiroxade + piraclostrobina	5% + 5% + 8%	DMI + SDHI + Qol

*DMI – Inibidores da demetilação na síntese de ergosterol. Qol- Inibidores do Complexo III da cadeia respiratória, atuando na enzima ubiquinol oxidase. SDHI – Inibidores do Complexo II da cadeia respiratória, atuando na enzima Succinato Desidrogenase.

As EC₅₀ e EC₉₈ foram determinadas pelo método de diluição seriada de fungicida em meio de cultura sólido (Becher et al., 2010, Lehner et al., 2015, Machado, 2016, Spolti et al., 2014). Cada fungicida foi adicionado em meio BDA (batata dextrose ágar) a 45-50 °C. As concentrações dos fungicidas testadas foram: 0 (controle); 0,005;

0,01; 0,05; 0,1; 0,5; e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Discos de micélio (9 mm de diâmetro) foram retirados da borda de colônias de *C. cassiicola* (Tabela 4.1 e 4.2) (10 dias a 25°C) e depositados em placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo 25 ml BDA + fungicida. As placas foram seladas com filme plástico de PVC e incubadas a 25°C, em regime de 12 horas/luz. Quando o crescimento das colônias atingissem 70% da placa (10 dias para os isolados de folha e 20 dias para os isolados de raiz), os diâmetros das colônias foram medidos em duas direções perpendiculares.

O delineamento experimental adotado para o teste de cada fungicida foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. A EC_{50} e EC_{98} foram determinadas para cada grupo de fungos (provenientes de folha e raiz) por meio de ajuste de regressão linear entre a porcentagem de inibição [(diâmetro do crescimento radial no controle – diâmetro na dose com fungicida)/diâmetro no controle x100] e o logaritmo das concentrações do fungicida relativa ao crescimento micelial na dose zero (sem o fungicida). O diâmetro do disco de micélio (9 mm) foi subtraído do diâmetro da colônia (Becher et al., 2010, Lehner et al., 2015, Machado, 2016, Spolti et al., 2014).

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Caracterização morfológica dos isolados de *Corynespora cassiicola*

4.4.1.1. Morfologia de colônias

Os 15 isolados de *C. cassiicola* apresentaram grande variabilidade morfológica quanto à cor, textura e forma, bem como, velocidade de crescimento micelial da colônia (sete dias 25°C, 12 horas/luz) (Tabela 4.7). A cor das colônias, na observação de frente, variou de branco ao cinza escura, e no verso da placa, a cor variou de amarelo ao preto (Tabela 4.7 e Figura 4.1). Quanto ao formato, dois grupos bem distintos foram formados, sendo que, os isolados de folha, apresentaram colônias circulares, enquanto que, nos isolados de raiz de soja, as colônias eram poligonais. Os sete isolados de folha apresentaram colônias com textura cotonosa, enquanto que os oito isolados de raiz apresentam textura fina. De acordo com descrição feita por Ellis and Holliday (1971) e Snow and Berggren Júnior (1989), em meio de cultura o micélio de *C. cassiicola* é branco e floculento, tornando-se mais tarde cinza escuro e constituído de um emaranhado preto oliváceo.

Uma variação entre colônias de *C. cassiicola* isolados de diferentes hospedeiros foi descrita no trabalho de Aguiar (2015), onde avaliando a morfologia de colônias, observou sete cores na frente (branco ao marrom escuro) e cinco no verso das placas (cinza claro ao preto). Com relação a texturas foram encontradas cotonosa e fina e os formato circular e poligonal, com uma predominância de colônias de formato poligonal e textura fina. Qi et al. (2011) caracterizaram a morfologia de 22 isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras com sintomas de mancha-alvo na China. Eles encontraram colônias variando do branco ao verde escuro, com predominância de textura cotonosa, e formato poligonal. Entretanto nesse trabalho foram encontrados dois grupos distintos com relação ao formato e a textura, sendo que todos os isolados de folhas (mancha-alvo) apresentaram textura cotonosa e formato circular, e os isolados de raiz (podridão-radicular) apresentaram textura lisa e formato poligonal.

Com relação ao diâmetro médio das colônias aos sete dias de crescimento, observa-se que os isolados provenientes de folhas apresentaram crescimento maior que os de raízes, diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O isolado

323 (folha) apresentou o maior crescimento médio (51,875 mm). O isolado 322 foi o que apresentou o menor crescimento entre os de folha (41,375 mm), porém ainda assim, esse crescimento foi 2,27 vezes maior que o isolado 320, sendo esse o que apresentou o maior crescimento dentre os isolados de raiz (18,25 mm). Esses resultados demonstram a diferença na velocidade de crescimento entre os dois grupos de isolados (folha/raiz), mesmo submetidos a condições idênticas (meio de cultura, fotoperíodo e temperatura). Avaliando isolados de *C. cassiicola* da cultura da seringueira na Malásia, Nghia et al. (2008) encontraram diâmetros de colônias variando de 40,3 a 70,8 mm. Aguiar (2015), avaliando isolados de *C. cassiicola* causando mancha-alvo em diferentes hospedeiros do Brasil, encontrou diâmetro de colônias variando de 16,5 mm a 42,87 mm após cinco dias de incubação.

Tabela 4.7. Cor (Frente e Verso), textura, forma e diâmetro médio das colônias dos isolados de *C. cassiicola* provenientes de folhas e raízes aos sete dias de crescimento em meio BDA.

Isolados	Cor da Colônia		Textura	Forma	Diâmetro médio das Colônias	
	Frente	Verso				
312-F	Cinza	Marrom Claro	Cotonosa	Circular	49,25*	ab
313-F	Cinza	Marrom Claro	Cotonosa	Circular	45,12	c
316-F	Branca	Amarela	Cotonosa	Circular	41,50	d
317-F	Cinza	Marrom Claro	Cotonosa	Circular	46,25	bc
318-F	Cinza	Marrom Claro	Cotonosa	Circular	48,12	bc
322-F	Cinza Claro	Amarela	Cotonosa	Circular	41,37	d
323-F	Cinza	Marrom Claro	Cotonosa	Circular	51,87	a
305-R	Cinza Escuro	Preto	Fina	Poligonal	13,25	f
306-R	Cinza Claro	Cinza Escuro	Fina	Poligonal	12,62	f
308-R	Cinza Escuro	Cinza Escuro	Fina	Poligonal	11,12	f
314-R	Cinza Escuro	Preto	Fina	Poligonal	17,50	e
315-R	Cinza Escuro	Preto	Fina	Poligonal	11,12	f
319-R	Cinza Escuro	Preto	Fina	Poligonal	17,00	e
320-R	Cinza Claro	Cinza Escuro	Fina	Poligonal	18,25	e
321-R	Cinza Escuro	Cinza Escuro	Fina	Poligonal	13,00	f
CV%					4,45	

*Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

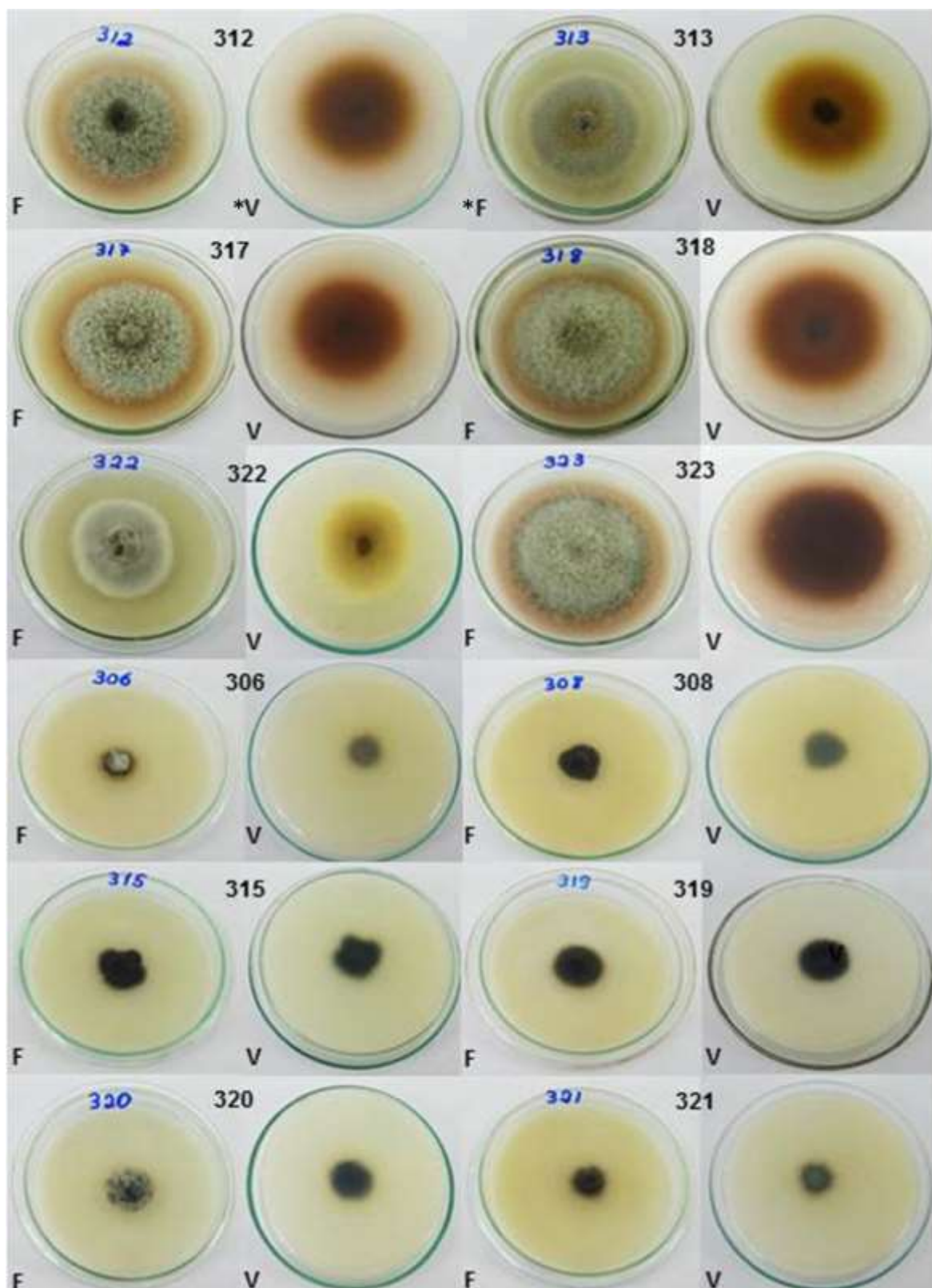


Figura 4.1. Variabilidade morfológica de colônias de isolados *Corynespora cassicola* aos sete dias de incubação em meio de cultura BDA, temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. (*F) Frente da placa e (*V) Verso da placa. 312-323 – Isolados de folha. 306-321 – Isolados de raiz.

4.4.1.2. Morfologia de conídios

A morfologia dos conídios dos 15 isolados de *C. cassiicola* também apresentou variação quando ao tamanho (comprimento e largura), cor e número de pseudosseptos (Tabela 4.8). Os conídios dos isolados de raiz tiveram as dimensões variando de 49,10 µm a 219,88 µm de comprimento x 5,84 µm a 19,45 µm de largura. Já os isolados de folha apresentaram comprimento variando de 22,41 µm a 133,33 µm x 3,50 µm a 14,43 µm de largura. Os conídios dos isolados de raiz foram, em geral, maiores que os conídios dos isolados de folhas. O número de pseudosseptos nos conídios dos isolados de folhas variou de um a onze, já para os conídios dos isolados de raiz variaram de um a treze. Essa variação nas características morfológicas assemelha-se com a descrição da espécie *C. cassiicola* proposta por Ellis and Holliday (1971), na qual o comprimento dos conídios situou-se entre 40 µm a 220 µm a largura entre 9 µm a 22 µm, e o número de pseudosseptos de quatro a vinte.

A morfologia dos conídios também foi muito variável entre os isolados de *C. cassiicola* provenientes de plantas de tomate e pepino avaliados por Aguiar (2015), as dimensões variaram de 7,39 a 386,05 µm de comprimento, 4,48 a 14,08 µm de largura e 0 a 24 pseudosseptos. Duarte et al. (1983) também verificaram conídios do patógeno, isolados de cacaueiro, foram mais estreitos variando de 4 µm a 8 µm de largura, assim como Kwon et al. (2003), em conídios de um isolado do pepino (5 µm a 10 µm). Teramoto (2008) comparando a morfologia de conídios entre isolados de *C. cassiicola* provenientes de plantas de pepino, algodão, café, hortênsia, soja, tomate, melão, e acerola, relatou dimensões de conídios que variaram de 46,1 µm a 110,9 µm de comprimento x 5,3 µm a 8,2 µm de largura e o número de pseudosseptos por conídio variou de um a quinze. Os conídios de isolados *C. cassiicola* de soja variaram de 77,3 µm a 88,6 µm de comprimento x 5,9 µm a 6,3 µm de largura, com um a treze pseudosseptos. A partir desses resultados é possível observar grande variação nas características morfológicas dos conídios de *C. cassiicola* para diferentes hospedeiros.

Quanto à coloração, os conídios variaram de hialinos a escuros, sendo que todos os conídios dos isolados provenientes de raiz apresentaram coloração escura (Tabela 4.8). A coloração encontrada neste trabalho vai de encontro ao disponível na literatura, onde os conídios de *C. cassiicola* são descritos com coloração variando de hialina, sub-

hialina ou marrom-clara (Ellis and Holliday, 1971, Snow and Berggren Júnior, 1989, Veiga, 1978).

Os clamidósporos apresentaram coloração hialina com formação terminal, intercalar ou em cadeia (Figura 4.2). A formação de clamidósporos foi observada apenas nas colônias dos isolados provenientes de folhas de soja (Tabela 4.8 e Figura 4.2). As características dos clamidósporos vão ao encontro as descritas por Oliveira et al. (2012), onde os clamidósporos de *C. cassiicola* apresentam coloração hialina, com comprimento de 13-15 µm e largura de 13 - 14 µm. Os fungos produzem esporos tanto para sobrevivência em condições ambientais adversas (clamidósporos) como para dispersão (conídios). Os clamidósporos são conídios de parede espessa que se formam quando as células das hifas tornam-se arredondadas e se separam. É uma estrutura especializada de resistência, atuando como esporos de repouso, dando ao fungo a capacidade de sobreviver por um longo período no solo (Gould, 2010).

Neste trabalho apesar de todos os isolados serem provenientes do mesmo hospedeiro (soja), estes foram retirados de partes diferentes da planta, causando sintomas/doenças distintos (Mancha-alvo e podridão radicular de *Corynespora*). Foi observada uma grande variação nas características morfológicas entre os conídios produzidos pelos grupos de isolados. Os conídios de isolados de raiz apresentaram comprimento e largura maiores que os conídios de isolados de folha, (diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de significância). O número de pseudosseptos também foi superior na maioria dos conídios dos isolados de raiz. A coloração dos conídios dos isolados de raiz foi predominantemente escura, enquanto que os conídios de isolados de folha apresentaram coloração variando de hialino a escuro. Devido às diferenças morfológicas, Sinclair and Shurtleff (1975) descrevem que o isolado que infecta hipocótilo, raízes e hastes, provavelmente é de uma espécie diferente daquela que infecta as folhas, vagens e sementes. De acordo com Snow and Berggren Júnior (1989) existem no mínimo duas raças de *C. cassiicola*. O fungo que infecta o hipocótilo, raízes e haste de soja (causador da podridão radicular) é patogênico e morfológicamente diferente daquele que infecta as folhas, vagens e sementes (causadores da mancha-alvo), sendo esse de outra raça. Spencer and Walters (1969), em um trabalho sobre variação de isolados de *C. cassiicola*, comprovaram a existência de duas raças desse fungo por comparação de isolados de feijão-caupi e de soja.

Tabela 4.8. Dimensões (largura e comprimento), número de pseudosseptos (mínimo e máximo) e cor dos conídios de *Corynespora cassiicola* isolados de folhas e raízes de soja.

Isolado	Comprimento (µm)				Largura (µm)				Nº Pseudosseptos				Cor	Clamidósporos
	Mín.	Máx.	Méd.		Mín.	Máx.	Méd.		Mín.	Máx.	Méd.			
312-F	27,06	109,89	69,4*	ef	4,72	8,25	6,27	f	1	11	4,96	a	escuros	presente
313-F	a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	ausente
316-F	a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	ausente
317-F	23,5	133,33	69,68	ef	4,03	7,53	5,61	f	1	10	4,26	ab	hialinos	presente
318-F	30,75	108,84	54,26	f	5,02	14,43	7,97	e	1	7	2,84	cd	hialinos	presente
322-F	a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	a.c.	a.c.		a.c.	ausente
323-F	22,41	103,48	57,97	f	3,50	8,84	6,30	f	1	6	2,6	d	escuros	presente
305-R	49,10	136,45	82,69	de	6,32	14,06	10,26	d	2	9	3,42	bcd	escuros	ausente
306-R	54,67	131,62	96,76	cd	9,87	19,13	19,06	a	1	5	2,62	d	escuros	ausente
308-R	49,24	179,03	93,37	cd	8,82	18,05	13,17	ab	2	10	3,92	abc	escuros	ausente
314-R	73,53	199,81	123,82	ab	8,06	19,45	14,04	a	2	8	4,26	ab	escuros	ausente
315-R	50,18	212,14	112,28	bc	6,00	15,83	12,21	bc	2	13	4,64	ab	escuros	ausente
319-R	71,5	228,7	135,12	a	8,54	17,14	11,73	c	2	8	5,06	a	escuros	ausente
320-R	68,1	151,05	113,15	bc	10,01	18,05	12,92	abc	2	9	4,8	a	escuros	ausente
321-R	53,39	219,88	110,26	bc	5,84	16,31	10,19	d	2	11	4,88	a	escuros	ausente
C.V.%			30,08				17,42				41,72			

a.c. = ausência de conídios. *Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

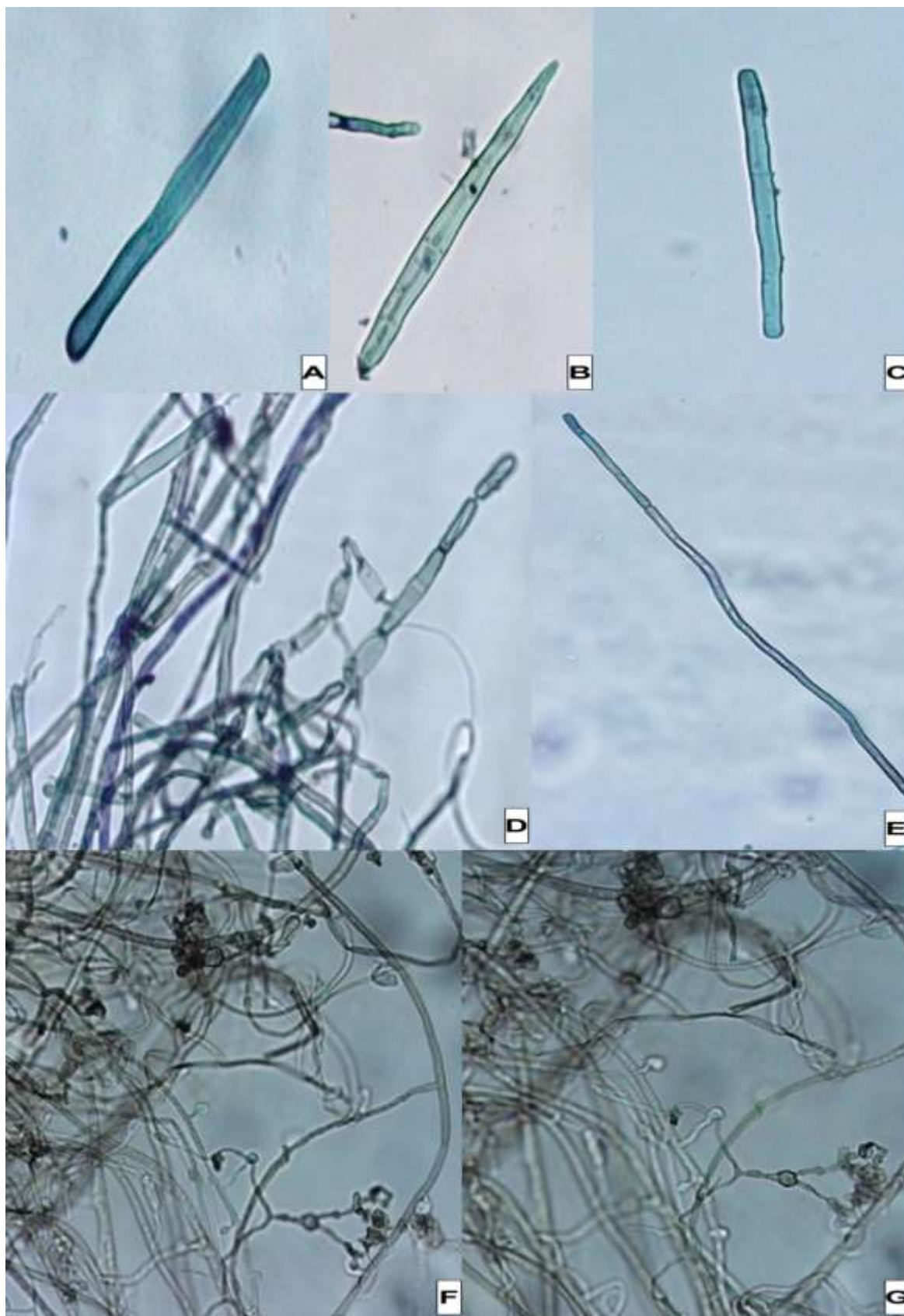


Figura 4.2. Estruturas de *Corynespora cassicola* isolados de folhas de soja: A-C: Conídios. D- E- Conidióforo com conídio em formação. F-G- Clamidósporos. Observação em microscopia aumento 20x (Microscópio Olympus Cover – Bx41).



Figura 4.3: Estruturas de *Corynespora cassiicola* isolados de raízes de soja: A-E: Conídios. F- Conídio em formato de Y. G- Conidióforo com conídio em formação. H- Vários conidióforos e conídios. Observação em microscopia aumento 10x (Microscópio Olympus Cover – Bx41).

4.4.2. Caracterização molecular dos isolados de *Corynespora cassiicola*

A caracterização molecular dos grupos de isolados de *C. cassiicola* (folha e raiz) foi dividida em duas partes sendo a primeira a identificação da espécie com *primers* específicos (GA4F/GA4-R e CCF-1/CCR-1). Em função da diversidade detectada na identificação da espécie fez-se a segunda caracterização molecular usando *primers* de regiões comuns e conservadas do genoma dos fungos: sendo gene ribossomal ITS (ITS1/ITS4) e β -tubulina (Bt2a/Bt2b) que foram amplificadas por PCR e sequenciadas.

Fragmentos com o tamanho esperado 272 pb foram amplificados de todos os isolados de ambos os grupos (folha e raiz) (Figura 4.4) a partir do par de *primers* CCF-1/CCR-1 (Qi et al., 2009). Por essa técnica todos os isolados podem ser classificados como pertencentes à espécie *C. cassiicola*. Este par de *primers* foi desenvolvido para amplificar uma parte da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene ribossomal específica de *C. cassiicola*.

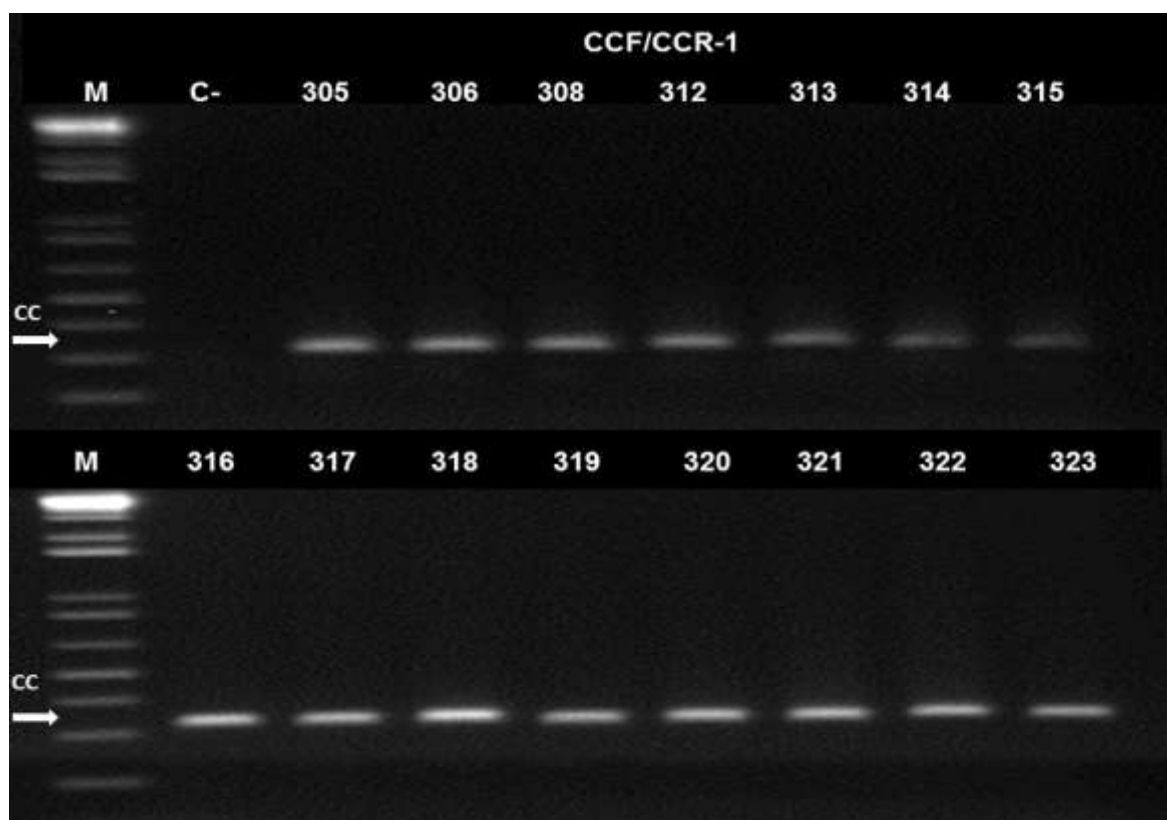


Figura 4.4. Fragmentos de DNA de *C. cassiicola* isolados de folhas (312, 313, 316, 317, 318, 322 e 323) ou raízes (305, 306, 308, 314, 315, 319, 320 e 321) de soja, amplificados pelo primer CCF/CCR-1 (272 pb). C-: Controle negativo. M - Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen).

Para o segundo par de *primers* específicos para *C. cassiicola*, a PCR multiplex foi realizada com dois pares de *primers*: ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990), para amplificação parcial do gene ribossômico (regiões ITS1, 5.8S rDNA e ITS2) gene que se encontra em qualquer espécie fúngica e também os *primers* GA4-F (5'- CCTGCTCCGACTTTGTTGAG-3') e GA4-R (5'- GTCTGGGAGCAGCAAAGACT-3') (Dixon et al., 2009) que são específicos para amplificação do *locus* hipervariável *ga4* presente apenas em *C. cassiicola*. A utilização do par de *primers* ITS é relevante para evitar resultados de falso-negativo, pois se a região ITS não for amplificada, evidencia que há erros no processo de extração ou na reação de PCR.

Fragmentos de DNA das regiões ITS (ribossomal) e *ga4* foram amplificados para todos os isolados provenientes de folhas sendo confirmada a classificação como *C. cassiicola* (Figura 4.5). Entretanto, o DNA dos isolados provenientes de raiz, amplificaram fragmentos apenas da região do gene ribossomal ITS, e não apresentaram amplificação da região específica para *C. cassiicola* (Figura 4.5). De acordo com esse resultado, estes isolados não pertenceriam à espécie *C. cassiicola*, divergindo do obtido a partir do par de *primers* (também específicos para *C. cassiicola*) CCF-1/CCR-1.



Figura 4.5. Fragmentos de DNA ribossomal e da região *ga4* do genoma de *C. cassiicola* isolados de folhas (312, 313, 316, 317, 318, 322 e 323) ou raízes (305, 306, 308, 314, 315, 319, 320 e 321) de soja, amplificados usando os *primers* ITS1 / ITS4 (550 pb) e GA4-F/GA4-R (415 pb). C-: Controle negativo. M - Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen).

Para diminuir a divergência das PCRs com *primers* espécie específicos, na segunda etapa da caracterização molecular, procedeu-se a amplificação e sequenciamento das regiões de DNA ribossomal (região ITS1, 5.8S rDNA e ITS2) e do gene β -tubulina. Todos os isolados de *Corynespora* avaliados, apresentaram fragmentos de DNA de aproximadamente 550 pares de bases (pb) quando amplificado pelos *primers* ITS1 e ITS4. Entretanto para o *primers* Bt2a/Bt2b, correspondes à região do gene da beta-tubulina os isolados provenientes de folha, amplificaram fragmentos no tamanho esperado de aproximadamente 450 pb, o que não ocorreu para os isolados provenientes de raiz. Quando submetidos às mesmas condições no ciclo de PCR que o grupo de isolados provenientes de folha (temperatura de anelamento de 60 °C), os isolados de raiz produziam dois fragmentos para o par de *primers* Bt2a/Bt2b, um fragmento de aproximadamente 450 pb (como esperado), mais fraco, e outro de aproximadamente 350 pb mais forte e intenso.

Diante disso foi realizada uma reação de PCR com gradiente de temperatura para comparar as amplificações para esse par de *primers* (Bt2a/Bt2b), entre dois isolados, sendo um do grupo das raízes (315) e outro do grupo dos isolados de folhas (318). As temperaturas de anelamento avaliadas variaram de 46 a 64°C (Figura 4.6).

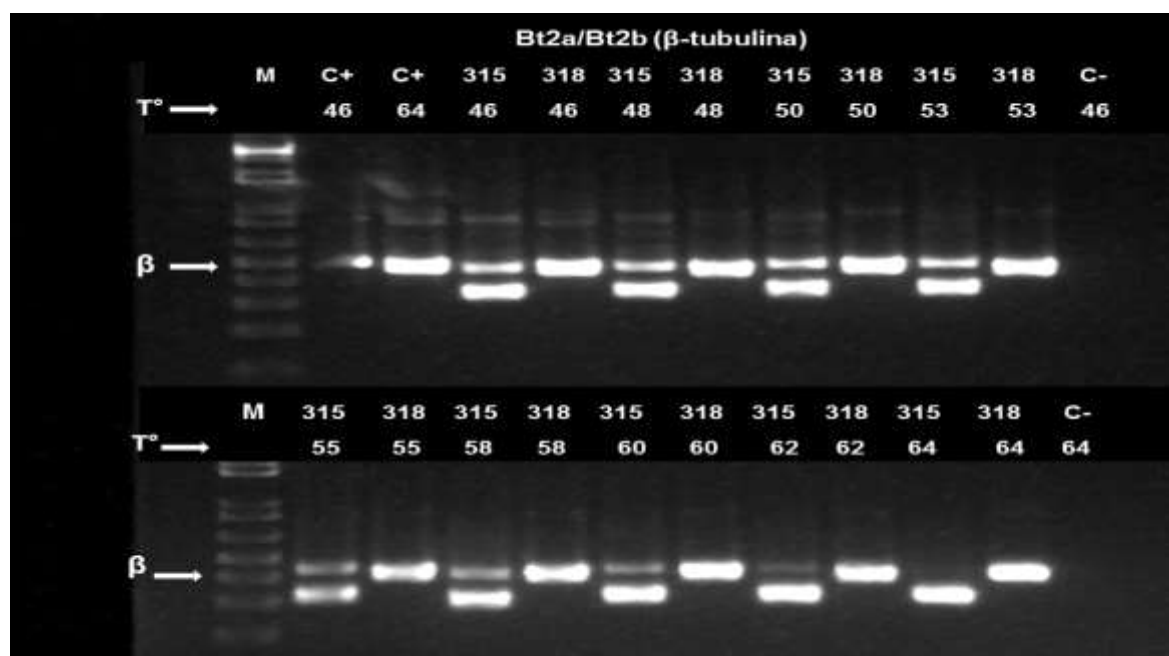


Figura 4.6. Fragmentos de DNA de *C. cassiicola* isolado de folha (318) ou de raiz (315) de soja. Amplificados em PCR com gradiente de temperatura de anelamento dos *primers* Bt2a/Bt2b, referentes ao gene β -tubulina. C-: Controle negativo. C+: Controle positivo. M - Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). T° - temperatura de anelamento utilizada.

Os isolados do grupo das folhas apresentam uma banda padrão no tamanho esperado (450 pb), em todas as temperaturas avaliadas (46 a 64°C). Já os isolados do grupo das raízes apresentaram duas bandas quando submetidos a temperaturas de anelamento entre 46 a 62°C, sendo que somente ao utilizar-se 64°C como temperatura de anelamento, pode-se observar apenas um fragmento amplificado, porém, o fragmento foi de 350 pb (Figura 4.6). A partir de um *primer* de uma região “comum” entre os fungos foi possível diferenciar os isolados de ambos os grupos, tendo em vista que os isolados de folha produzem uma banda de 450 pb, e os isolados de raiz podem produzir entre uma (350 pb) e duas bandas (350 pb e 450 pb) dependendo da temperatura de anelamento.

As sequências dos fragmentos dos genes dois grupos de isolados de *Corynespora* (folha e raiz), quando comparadas com sequências depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando-se a ferramenta BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*), demonstraram comportamento diferenciado. Para as duas regiões sequenciadas (gene ribossomal ITS e β -tubulina), os isolados de folha foram caracterizados como *C. cassiicola*, porém entre os isolados provenientes de raiz, houve uma variação na caracterização entre as duas regiões sequenciadas (Tabela 4.9).

Para a região do gene ribossomal ITS (que separa os genes 18S e 28S do rDNA) todos os isolados de ambos os grupos apresentaram identidade de nucleotídeos com isolados de *C. cassiicola*. Sendo que para os isolados provenientes de folhas variou entre 99 e 100%. Já os isolados de raiz, todos apresentaram 100% de identidade (Tabela 4.9).

Para o gene da β -tubulina, todos os isolados de folha foram identificados como *C. cassiicola*, com a taxa variando entre 99 e 100%. Entretanto, os isolados de raiz não apresentaram identidade com *C. cassiicola*, mas com *Setosphaeria pedicellata*, com taxa de identidade variando entre 91 a 93% (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Caracterização molecular dos isolados de *C. cassiicola*, espécie “relacionada”, taxa de similaridade e número de acesso no GenBank.

Isolado	Região	Espécie	Similaridade (%)	Número de Acesso no GenBank
Cc 306	ITS	<i>C. cassiicola</i>	100	*
Cc 312	ITS	<i>C. cassiicola</i>	99	MK212949
Cc 315	ITS	<i>C. cassiicola</i>	100	*
Cc 316	ITS	<i>C. cassiicola</i>	99	MK212950
Cc 317	ITS	<i>C. cassiicola</i>	100	MK212951
Cc 318	ITS	<i>C. cassiicola</i>	99	MK212952

Cc 319	ITS	<i>C. cassiicola</i>	100	*
Cc 321	ITS	<i>C. cassiicola</i>	100	*
Cc 306	β -tubulina	<i>Setosphaeria pedicellata</i>	92	*
Cc 312	β -tubulina	<i>C. cassiicola</i>	99	
Cc 315	β -tubulina	<i>Setosphaeria pedicellata</i>	91	*
Cc 316	β -tubulina	<i>C. cassiicola</i>	99	
Cc 317	β -tubulina	<i>C. cassiicola</i>	100	
Cc 318	β -tubulina	<i>C. cassiicola</i>	99	
Cc 319	β -tubulina	<i>Setosphaeria pedicellata</i>	92	*
Cc 321	β -tubulina	<i>Setosphaeria pedicellata</i>	93	*

* Sequências aguardando a confirmação da espécie para depósito no GenBank.

Diante dos resultados obtidos é possível observar que os isolados provenientes de folhas de soja, apresentaram identidade compatível com *C. cassiicola* para as duas regiões sequenciadas. Por outro lado, os isolados de raiz apresentaram grande divergência entre as regiões sequenciadas, cada uma resultou em uma espécie diferente, sendo que o gene ribossomal ITS identificou os isolados com pertencentes à espécie *C. cassiicola*. Entretanto o gene β -tubulina, estes fungos apresentaram identidade molecular com *Setosphaeria pedicellata*. Essa espécie assemelha-se a *C. cassiicola* ao nível de ordem (diferindo a partir de família), sendo ambas pertencentes à Pleosporales.

Uma árvore filogenética gerada com 20 sequências do gene ribossomal ITS, baseada no método de máxima verossimilhança, agrupou os isolados provenientes de folhas em um grande clado, juntamente com o isolado de referência de *C. cassiicola*. Em outro clado foi agrupado *C. smithii*. Os isolados de raiz de soja foram agrupados em outro clado separado (Figura 4.7).

Apesar do sequenciamento da região rDNA ITS ter indicado que ambos os grupos de isolados (folha e raiz) pertencessem à mesma espécie (*C. cassiicola*), a partir do dendrograma gerada é possível observar uma diferenciação entre os grupos que foram estruturados separadamente. A espécie *C. smithii* é utilizada de maneira geral como *outgroup* para análises filogenéticas entre sequências de *C. cassiicola*. Entretanto observa-se que os isolados provenientes de raiz apresentaram-se mais distantes filogeneticamente de *C. cassiicola* do que o próprio *outgroup* (*C. smithii*). A espécie *Cyclothyriella rubronotata* é utilizada na literatura como *outgroup* para a subordem Massarineae da ordem Pleosporales (Voglmayr and Jaklitsch, 2017), que abrange dentre outras, as espécies dos gêneros *Corynespora* e *Helminthosporium*. Nesse caso, *Cyclothyriella rubronotata* foi eficiente como *outgroup* para os isolados dos dois grupos (folha e raiz) e demais sequências do gênero *Corynespora* utilizados na composição do dendrograma.

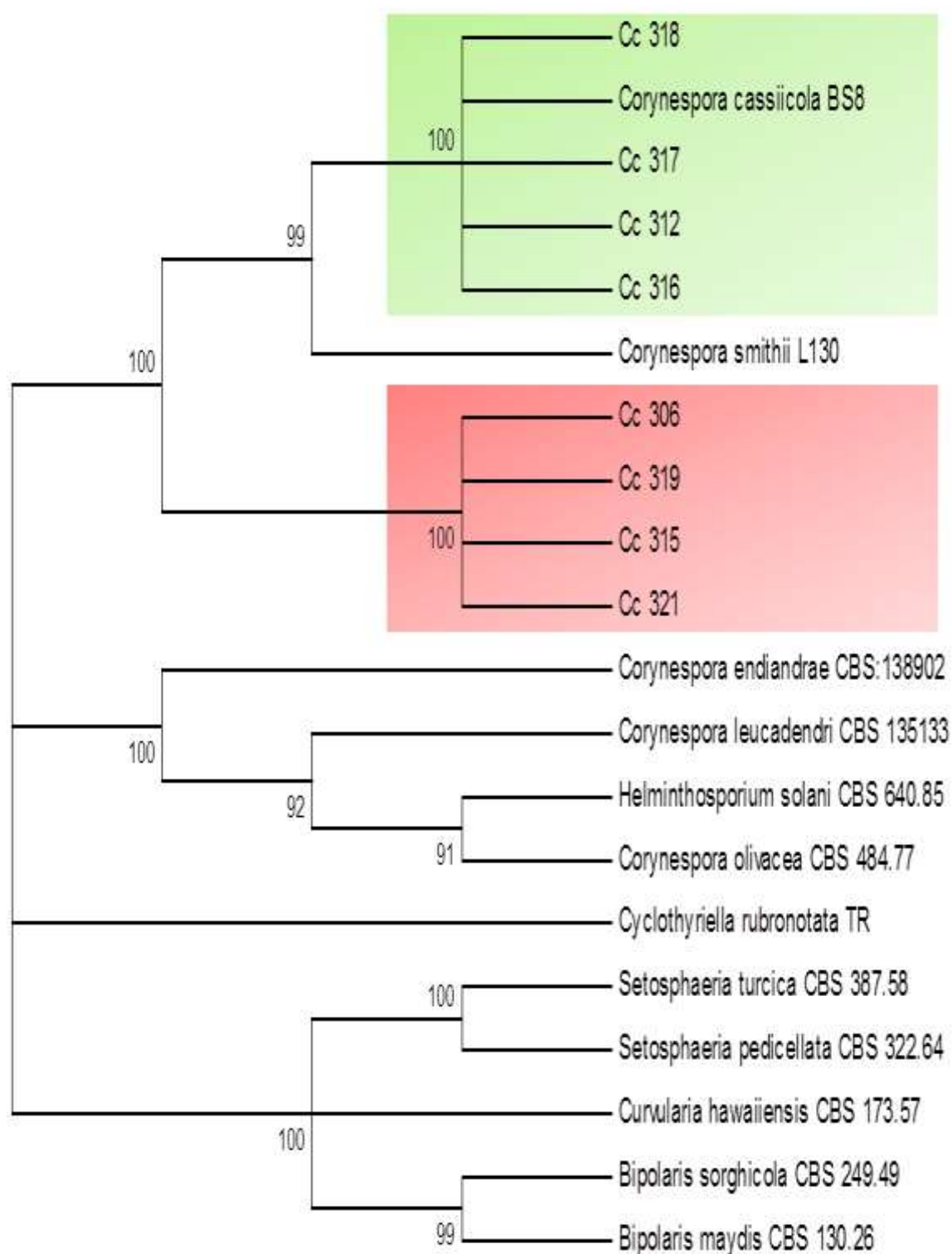


Figura 4.7. Dendrograma gerado com as sequências do gene ribossomal ITS por meio da análise pelo método de máxima verossimilhança, reconstruída com robustez de 10.000 randomizações não paramétricas *bootstrap*.

A árvore filogenética baseada no UPGMA gerada com as sequências do gene β -tubulina, obtidas de isolados de *C. cassiicola* dos dois grupos de isolados (folha e raiz) (Figura 4.8), dispõe os dois grupos de isolados em clados diferentes, sendo que o isolado de referência de *C. cassiicola* (ZM170455) agrupou-se com os isolados provenientes de folhas.

Os isolados de raiz, apresentaram similaridade de nucleotídeos com a espécie *Setosphaeria pedicellata*. No dendrograma quando comparados com *C. cassiicola* e *Setosphaeria pedicellata* os isolados de raiz apresentaram distância semelhante entre o agrupamento para ambas as espécies, porém se mantendo fora do clado de ambas (Figura 4.8).

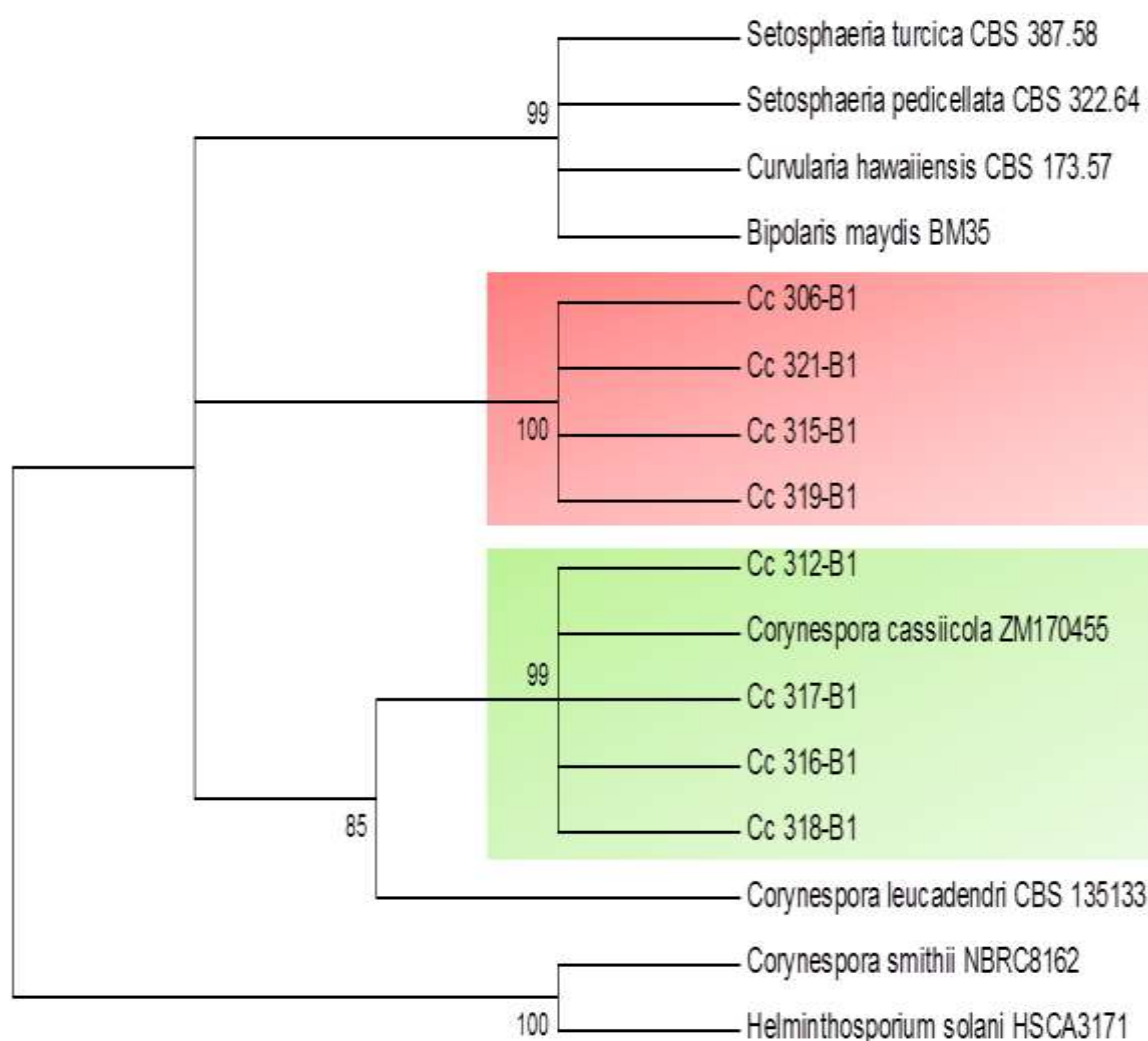


Figura 4.8. Dendrograma gerado com as sequências do gene β -tubulina por meio da análise pelo método de máxima verossimilhança, reconstruída por *bootstrap* com robustez de 10.000 randomizações não paramétricas.

A árvore filogenética baseada no conjunto das sequências dos dois genes estudados (rDNA ITS e β -tubulina) a partir da análise de UPGMA (10.000 randomizações), foi construída para visualização geral do posicionamento dos dois grupos de isolados (folha e raiz) (Figura 4.9). O padrão dos resultados dos agrupamentos se mantém. Observa-se que os isolados de folhas estão posicionados no mesmo clado que as sequências de referência de *C. cassiicola*, já os isolados provenientes estão posicionados em um clado distinto dos demais grupos.

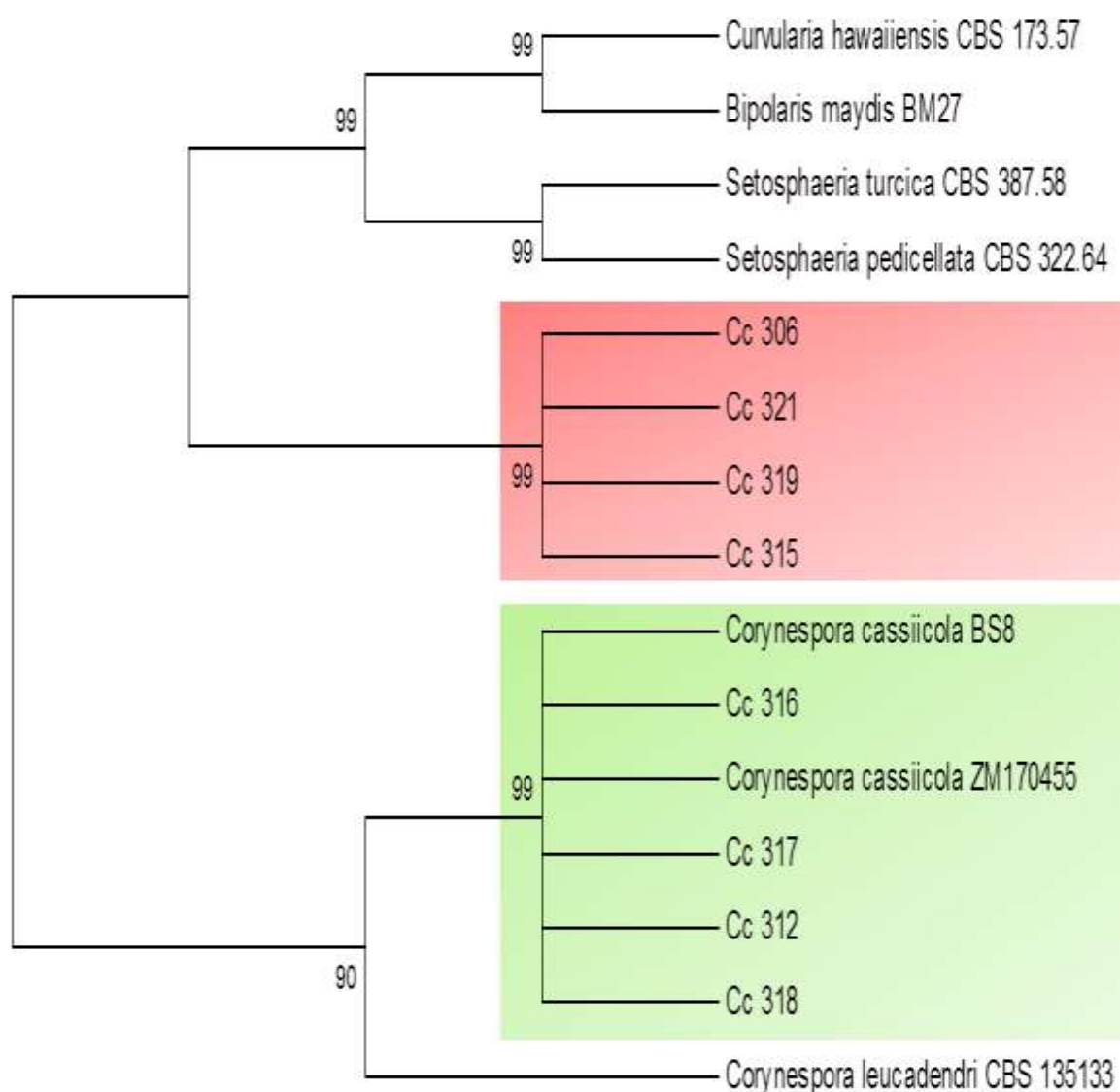


Figura 4.9. Dendrograma gerado a partir das sequências concatenadas para os genes ribossomal ITS e β -tubulina por meio da análise pelo método de máxima verossimilhança, reconstruída com robustez de 10.000 randomizações não paramétricas de *bootstrap*.

Os isolados de folha foram confirmados como pertencentes à espécie *C. cassiicola* em todos os testes realizados com os cinco pares de *primers*. Com os dois pares de *primers* específicos para espécie (GA4F/GA4-R e CCF-1/CCR-1) houve a amplificação para todos os isolados desse grupo. Com relação às duas regiões sequenciadas (rDNA ITS e β -tubulina) os isolados de folha também apresentaram identidade de nucleotídeos com isolados de *C. cassiicola*.

Os isolados provenientes de raízes de soja não apresentaram o mesmo comportamento. Para os *primers* específicos, a amplificação ocorreu apenas para o e CCF-1/CCR-1, não ocorrendo para o par de *primers* referente ao *locus* hipervariável *ga4*, que segundo Dixon et al. (2009) é presente apenas em *C. cassiicola*.

Além dessa diferença de resultados entre os *primers* para espécie, ocorreu grande variação entre as regiões sequenciadas. No sequenciamento do gene ribossomal ITS, os isolados de raiz foram caracterizados como pertenceres à espécie *C. cassiicola*, o que não ocorreu para o gene β -tubulina (*Setosphaeria pedicellata*).

O par de *primers* CCF-1/CCR-1 foi desenvolvido para amplificar parte da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene ribossomal específica de *C. cassiicola* (Qi et al., 2009). Os resultados obtidos a partir dos fragmentos amplificados por esse par de *primers* foram corroborados pelo sequenciamento da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2). Das quatro regiões avaliadas apenas as duas baseados na região ITS confirmaram os isolados provenientes de raízes como pertencentes à espécie *C. cassiicola*.

Quando avaliados os posicionamentos dos dois grupos de isolados nos dendrogramas (Figuras 4.7 a 4.9) é possível observar que os isolados provenientes de folhas se agrupam no mesmo clado que as sequências de referência de *C. cassiicola*, porém em clados diferentes ao isolados provenientes de raízes.

A região do gene β -tubulina apresentou a maior diferenciação entre os dois grupos de isolados. Ao se observar o gel de agarose em eletroforese, foi possível uma diferenciação entre os dois grupos através do padrão e altura dos fragmentos amplificados (Figura 4.6). Os resultados do sequenciamento dessa região indicaram os isolados de folha como *C. cassiicola* e os de raiz como *Setosphaeria pedicellata*, diferenciando assim, os dois grupos de isolados até o nível de família, sendo similares a partir de ordem, ambas pertencentes a Pleosporales. Porém ao se observar os dendrogramas referente à região do gene β -tubulina (Figura 4.8) e o formado pelo conjunto das sequências (Figura 4.9) é possível observar que os isolados provenientes de raízes de soja, posicionam-se em um

clado a parte, ou seja, apresentam a mesma distância entre o clado com sequência de referência de *C. cassicola*, quanto do clado com sequência de referência de *Setosphaeria pedicellata*. É possível observar também que apesar de *Setosphaeria pedicellata* ter sido a mais similar ao grupo dos isolados provenientes de raiz para o gene da β -tubulina, a porcentagem de similaridade não foi tão alta (variando entre 91 e 93%) (Tabela 4.9). Esses resultados sugerem que os isolados provenientes de raízes de soja, se tratam de outra espécie filogeneticamente desconhecida.

Aguiar (2015), ao estudar a variabilidade genética de 112 isolados de *C. cassicola* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas do Brasil e do estado da Flórida, nos Estados Unidos, observou que as regiões genômicas ITS, fator de alongação 1- α e β -tubulina apresentaram comportamentos diferentes quanto à distribuição e a resolução intraespecífica dos isolados avaliados. As árvores filogenéticas das regiões ITS e fator de alongação apresentaram limitada resolução intraespecífica dos isolados quanto à hospedeira de origem e região geográfica de coleta. Sendo que a árvore filogenética construída utilizando-se somente as sequências da região β -tubulina apresentou melhor distribuição dos isolados quanto à hospedeira de origem, com formação de dois cladogramas distintos, cada um deles representado em sua maioria por isolados provenientes da cultura do tomate e do pepino. Os resultados desse estudo corroboram com os obtidos neste trabalho, onde a região β -tubulina apresentou maior capacidade de diferenciação entre os isolados de *C. cassicola* provenientes de folha e raízes de soja.

Nos últimos anos, devido, em grande parte aos avanços na biologia molecular e estudos filogenéticos, o gênero *Corynespora* vem sofrendo constantes reclassificações. Em estudos iniciais, *C. cassicola* foi classificado dentro da família Dematiaceae (Barnett and Hunter, 1972, Barnett and Hunter, 1998). Entretanto a descoberta dos fungos teleomórficos *Corynesporasca caryotae* (anamorfo *Corynespora*) (Corynesporascaceae), relatado por Sivanesan (1996) e *Pleomassaria swidae* (anamorfo *Corynespora olivacea*) (Pleomassariaceae) relatado por Tanaka et al. (2005), intensificaram o processo de reclassificação do gênero. Em estudos filogenéticos realizados por Schoch et al. (2009), envolvendo os genes nucSSU, nucLSU rDNA, TEF1, RPB1 e RPB2 dentro da classe Dothideomycetes, revelaram que espécies atualmente classificadas dentro do gênero *Corynespora*, incluindo *C. cassicola*, não são monofiléticas, sendo posicionadas em pelo menos duas famílias: Massariaceae (composta pelos isolados com fase teleomórfica) e

Clado K . Posteriormente os isolados do gênero *Corynespora* foram reclassificados como pertencentes a família Corynesporascaceae (Voglmayr and Jaklitsch, 2017).

Voglmayr and Jaklitsch (2017) realizaram análises filogenéticas moleculares de uma matriz multigênica de sequências parciais de nuSSU-ITS-LSU rDNA, rpb2 e tef1 para investigar as relações existentes entre espécies dos gêneros *Corynespora*, *Exosporium* e *Helminthosporium*. Com base nas análises filogenéticas e morfológicas, o gênero *Exosporium* foi sinonimizada com *Helminthosporium*, e o gênero *Corynespora* foi descrito como polifilético. Os autores confirmaram que *Corynespora smithii* está intimamente relacionado com o tipo genérico *C. cassiicola*, enquanto *Exosporium tiliae*, *Corynespora caespitosa*, *C. endiandrae*, *C. leucadendri* e *C. olivacea* são similares a *Helminthosporium*. Neste trabalho ao gerar o dendrograma da região rDNA ITS (Figura 4.7) é possível observar que os isolados de referência das espécies *C. endiandrae*, *C. leucadendri* e *C. olivacea* formaram o clado juntamente com o isolado de referência *Helminthosporium solani*. Já o isolado de referência de *C. cassiicola* posiciona-se em outro clado distinto juntamente com os isolados de folha, corroborando com a reclassificação proposta por Voglmayr and Jaklitsch (2017).

Originalmente *Helminthosporium* foi definido muito vagamente e ao longo dos anos tornou-se um repositório para numerosos grupos de indivíduos dos quais apenas alguns eram congêneros com as espécies-tipo. Mycobank (2018), consultado em novembro de 2018, constava uma lista mais de 791 nomes em *Helminthosporium*, mas atualmente menos de 50 são considerados como espécies verdadeiras de *Helminthosporium* (Hernández-Restrepo et al., 2018, Seifert et al., 2011, Tanaka et al., 2015, Voglmayr and Jaklitsch, 2017). Estudos mais aprofundados na taxonomia desse gênero resultaram na realocação de muitos de seus membros para gêneros como *Alternaria*, *Corynespora*, *Dendryphion*, *Septonema* e outros (Bolle, 1924, Ellis, 1976, Ellis, 1971, Hernández-Restrepo et al., 2018, Seifert et al., 2011, Simmons, 1971, Simmons, 2007, Sivanesan, 1984, Subramanian and Jain, 1966, Voglmayr and Jaklitsch, 2017, Wei, 1950).

O primeiro relato de *Corynespora cassiicola* na cultura da soja foi feito nos Estados Unidos, em 1945, por Olive et al. (1945), com o nome de *Helminthosporium vignae*. A espécie *Setosphaeria pedicellata* é a fase teleomórfica de *Exserohilum pedicellatum* (Leonard and Suggs, 1974) que foi inicialmente descrito como *Helminthosporium pedicellatum* (Henry, 1924), espécie que foi relatada de raízes de trigo nos EUA (Henry, 1924). Outros relatos ocorreram a partir de raízes apodrecidas de vários

hospedeiros, incluindo *Echinochloa*, *Oryza*, *Paspalum*, *Setaria*, sorgo, *Triticum* e *Zea* no Egito, Índia, Paquistão, África do Sul e os EUA (Gilbert, 2002, Henry, 1924, Sivanesan, 1987). Causa lesões marrons nas raízes do trigo e podridão radicular do milho (Sivanesan, 1987).

Inicialmente ambas as espécies dos gêneros *Corynespora* e *Exserohilum/Setosphaeria* foram classificadas como *Helminthosporium*. Juntamente com fato do órgão afetado (raiz) e o padrão dos sintomas demonstrados serem similares, essas informações podem justificar a similaridade filogenética apresentada (para o gene da β -tubulina) entre a espécie *S. pedicellata* e os isolados provenientes de raízes de soja. Entretanto, as características morfológicas de *Exserohilum pedicellatum/Setosphaeria pedicellata* apresentadas no trabalho de Hernández-Restrepo et al. (2018), diferem do observado neste trabalho nas estruturas dos isolados provenientes das raízes de soja. Além disso, a similaridade de nucleotídeos foi apenas para um gene (β -tubulina) variando entre 91 e 93%. O posicionamento em clados diferentes no dendrograma (Figura 4.8), demonstram que apesar da proximidade filogenética (esperada em partes), há indícios morfológicos e moleculares de que ambos não pertencem à mesma espécie fúngica. Esses resultados demonstram novamente a possibilidade dos isolados provenientes de raízes de soja se tratarem de uma espécie fúngica ainda não estudada a nível filogenético.

4.4.3. Diversidade e estrutura genética de isolados de *C. cassiicola* por meio de marcadores ISSR

Os marcadores ISSR foram utilizados para analisar a variabilidade e a estrutura genética dos 15 isolados de *C. cassiicola*, sendo oito de raiz e sete da parte aérea de plantas de soja (Figura 4.10). Os 12 *primers* ISSR testados amplificaram 64 fragmentos, sendo 63 polimórficos e um monomórfico. O número de fragmentos polimórficos amplificados variou de um (para o marcador MJ5) a sete (marcadores ISSR10, ISSR11 e UBC826) (Tabela 4.10). O tamanho do fragmento das bandas amplificadas variou de 500 a 5000 pb.

Tabela 4.10. *Primers* ISSR utilizados, temperatura de anelamento (C°), fragmentos amplificados, fragmentos polimórficos e porcentagem (%) de polimorfismo, utilizados na análise da diversidade e estrutura genética de isolados de *Corynespora cassiicola*.

<i>Primer</i>	C° Anelamento	Fragmentos Amplificados	Fragmentos Polimórficos	% Polimorfismo
ISSR10	48	7	7	100
ISSR11	50	7	7	100
MJ3	53	3	2	66,6
MJ4	44	5	5	100
MJ5	46	1	1	100
UBC 807	48	5	5	100
UBC 809	46	6	6	100
UBC 811	44	6	6	100
UBC826	58	7	7	100
UBC828	44	5	5	100
UBC835	48	6	6	100
UBC850	55	6	6	100

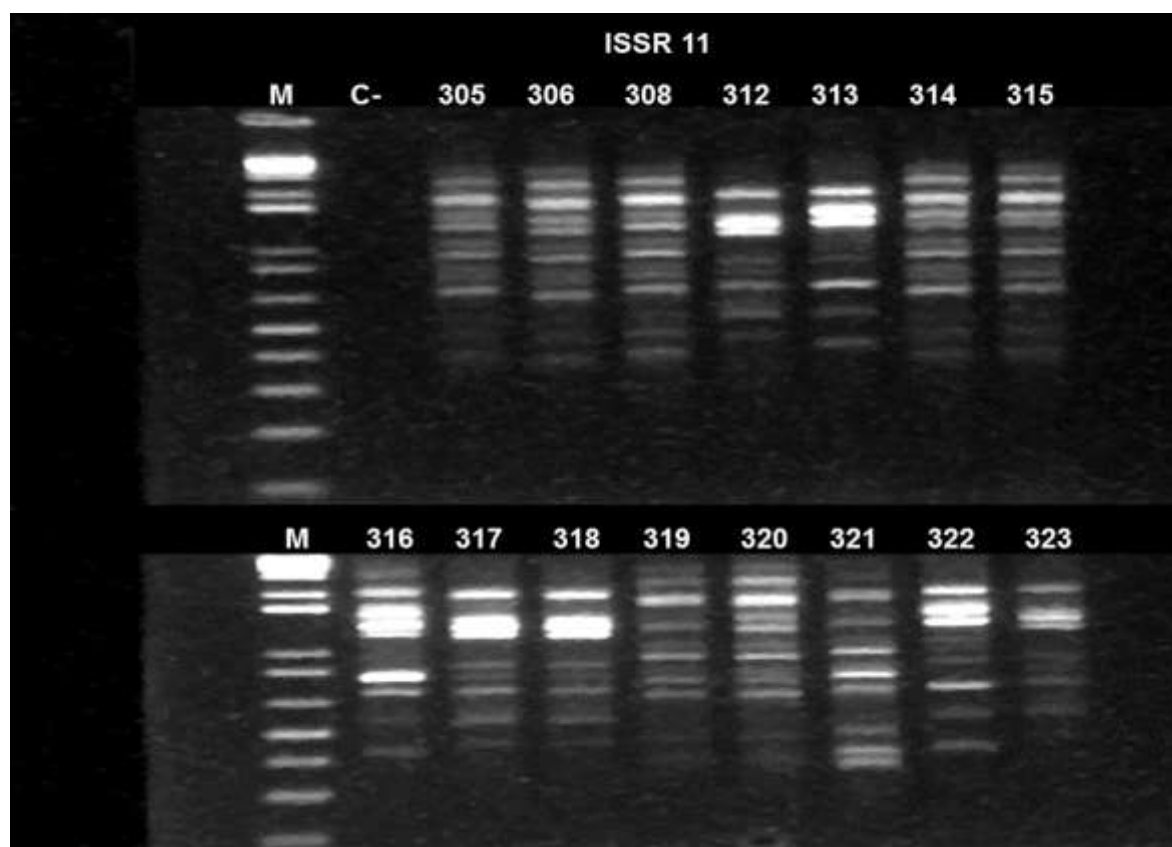


Figura 4.10. Amplificação com o marcador ISSR 11. Fragmentos amplificados de DNA de *Corynespora cassiicola* isolados de folhas (312, 313, 316, 317, 318, 322 e 323) e raízes (305, 306, 308, 314, 315, 319, 320 e 321) de soja. M: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). C-: Controle negativo.

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são fragmentos de DNA amplificados via PCR. Possuem como principais vantagens a geração de grande número de bandas informativas por reação e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção de *primers* ISSR. A principal desvantagem é a dominância dos marcadores, não diferenciando os *locus* em heterozigose dos *locus* em homozigose. As principais aplicações são *Fingerprinting* (impressão genética), diversidade genética e análise filogenética (Bornet and Branchard, 2001, Faleiro, 2007, Godwin et al., 1997, Zietkiewicz et al., 1994).

Marcadores ISSR apresentaram boa resolução e capacidade de detectar polimorfismo, sendo que das 64 bandas avaliadas, 63 foram polimórficas e apenas uma monomórfica (Tabela 4.10). Todos os 12 *primers* utilizados apresentaram resultados satisfatórios, sendo que 11 deles apresentaram 100% de polimorfismo, demonstrando assim a capacidade deste grupo de marcadores em detectar variabilidade genética. Esses resultados também demonstram a alta variabilidade genética entre os isolados de *C. cassiicola* estudados, mesmo se tratando de um grupo relativamente pequeno, 15 indivíduos.

A alta taxa de polimorfismo encontrado entre os isolados do fungo *C. cassiicola*, utilizando os *primers* ISSR corroboram com os obtidos em estudos realizados com a mesma espécie fúngica por Nghia et al. (2008) 91,5% de polimorfismo, Qi et al. (2011) 89,4 % de bandas polimórficas e Ferreira (2014) 100% de polimorfismo. Neste estudo avaliamos 64 bandas com 97,2% de polimorfismo. Na literatura, encontram-se diversos trabalhos utilizando marcadores dominantes, inclusive os ISSR, os quais consideram/utilizam a porcentagem de *locus* polimórficos como medida de diversidade/variabilidade genética (Carvalho et al., 2012, Chen et al., 2006, Jesus et al., 2001, Nguyen et al., 2013). Nesse sentido é possível concluir que há alta variabilidade genética entre os isolados de *C. cassiicola*.

As matrizes geradas após 10.000 randomizações no Teste de Mantel apresentaram os seguintes coeficientes de correlação cofenética (CCC): Dice 0,979 e Jaccard 0,988. O CCC estima o quanto o dendrograma está adequado às interações entre os acessos. O valor 1 significa que a relação entre os dados e o dendrograma é perfeita (May, 1999). Porém, na literatura, são utilizados diferentes valores de correlação cofenética. Parreira et al. (2016), Romesburg (1984) consideraram que valores maiores ou iguais a 0,80 são satisfatórios, já Lorenzoni et al. (2014) consideraram valores iguais ou superiores

a 0,79 em seus estudos. Vaz Patto et al. (2004) abordam que valores acima de 0,56 representam bom alinhamento entre as matrizes de dissimilaridade e agrupamento. Quanto maior o valor de CCC, menor será a distorção provocada ao agrupar os indivíduos, o que normalmente é obtido pelo método da ligação média (UPGMA) (Cruz and Carneiro, 2003). Neste estudo os valores da correlação cofenética para ambos os coeficientes calculados (Dice e Jaccard) foram satisfatórios, demonstrando a confiabilidade dos testes e similaridade entre os resultados, assim, foi selecionada a matriz calculada a partir do coeficiente de dissimilaridade de Dice para a geração do dendrograma pelo método UPGMA, com significância dos agrupamentos gerados por 10.000 repetições aleatórias de *bootstrap* (Figura 4.11).

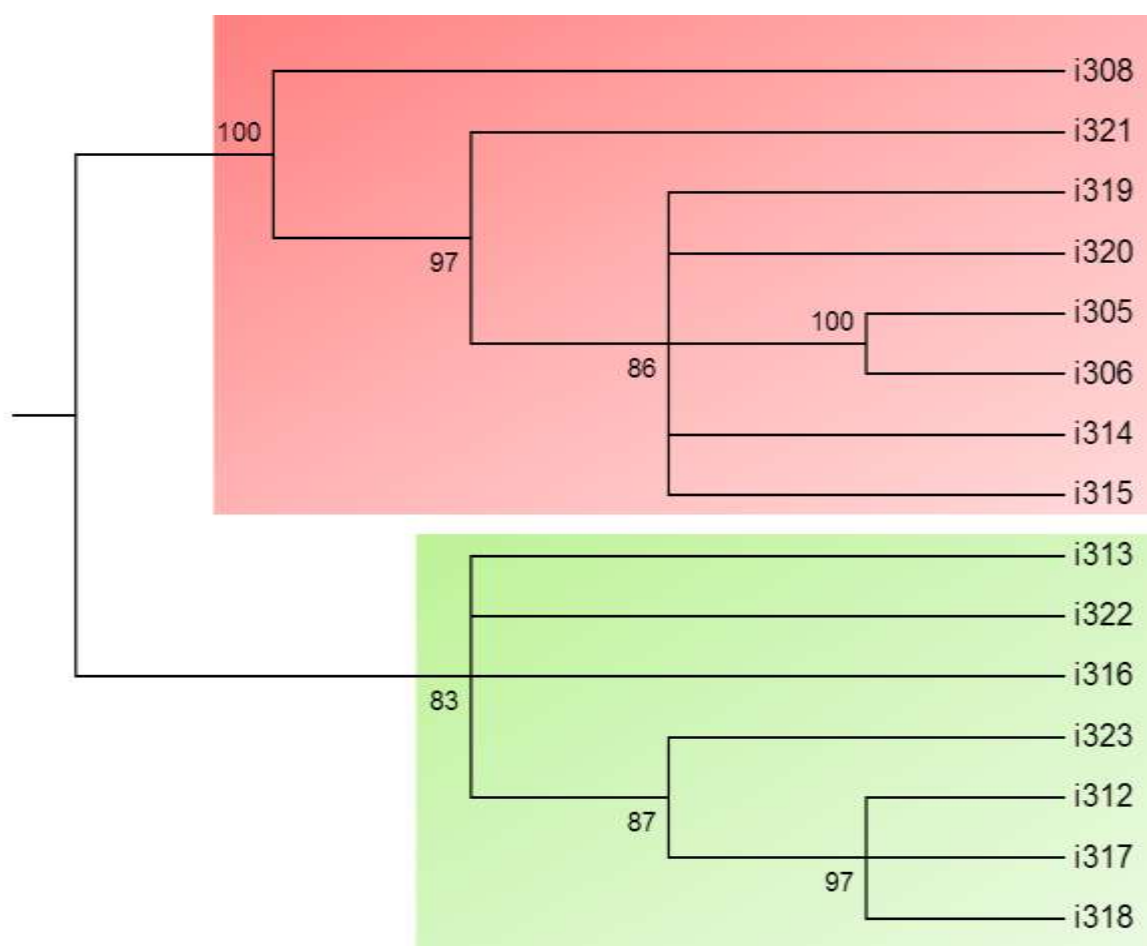


Figura 4.11. Agrupamento dos 15 isolados de *C. cassiicola* provenientes de folhas (312, 313, 316, 317, 318 e 322) e raízes (305, 306, 308, 314, 315, 319 e 321) de soja, através da matriz de dissimilaridade calculada pelo coeficiente de Dice, utilizando o método UPGMA (com 10.000 randomizações) com base em 12 marcadores ISSR. O coeficiente de correlação cofenético (r) é = 0,979.

Os valores de dissimilaridade genética (avaliada pelo coeficiente de dissimilaridade de Dice) variaram de 0 a 0,797. A menor dissimilaridade foi encontrada entre os isolados 305 e 306, 314 e 315, 319 e 320 que apresentaram dissimilaridade zero entre si, ou seja, se tratam de isolados idênticos geneticamente (clones) nos *locus* avaliados. Todos são isolados provenientes de raízes de soja.

A maior dissimilaridade (0,797) foi observada entre os isolados 321 (raiz) e 322 (folha), apresentando a maior distância genética entre os 15 isolados. Os maiores valores de dissimilaridade se encontravam entre os grupos de isolados de raiz e folha, ou seja, os isolados apresentam maior similaridade com os pertencentes ao mesmo grupo e maior dissimilaridade (diferença) genética com os pertencentes ao grupo distinto ao seu. Parreira et al. (2016), estudando a diversidade genética de 95 isolados *Colletotrichum graminicola*, provenientes dos estados de Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul a partir de nove marcadores ISSR, encontraram a maior similaridade genética entre isolados provenientes do mesmo município (Passo Fundo - RS), com distância genética de 0,019. Em estudos realizados por Oliveira et al. (2007a), estudando a diversidade genética entre acessos de açaizeiro encontraram valores de dissimilaridade variando de 0,06 a 0,67, demonstrando alta diversidade genética entre os acessos. Lorenzoni et al. (2014) avaliando a diversidade genética de 16 acessos de biribazeiro (*Rollinia mucosa*) a partir de 20 *primers* ISSR, encontraram valores de dissimilaridade genética variando de 0,0909 a 0,5147. Os autores atribuem essa alta dissimilaridade encontrada pelo fato desta ser uma frutífera ainda em processo de domesticação. Diante do exposto, é possível inferir que os resultados de dissimilaridade genética, neste trabalho, refletem uma variabilidade genética alta entre os dois grupos isolados de *C. cassiicola* (folha e raiz).

A análise de coordenadas principais (PCoA) reduziu a dimensionalidade dos dados e permitiu a observação da estrutura espacial dos isolados de *C. cassiicola* quanto a sua distribuição (Figura 4.12). Os isolados se agrupam de modo que todos os isolados de raiz permanecem próximos entre si, e ao mesmo tempo estruturalmente separados dos isolados de folha. Os isolados de folha por sua vez se dividem em dois grupos entre os que apresentaram produção de conídios (312, 317, 318 e 323), e os que não apresentaram (313 e 322) que se agruparam de maneira separada, o isolado 316 não apresentou produção de conídios, porém na distribuição espacial localizou-se de maneira interposta entre os grupos que produzem e os que não produzem conídios dentre os isolados de folha. É possível

observar a partir desses resultados que existe uma estruturação diferenciada entre os grupos de isolados provenientes de folhas e raízes de soja.

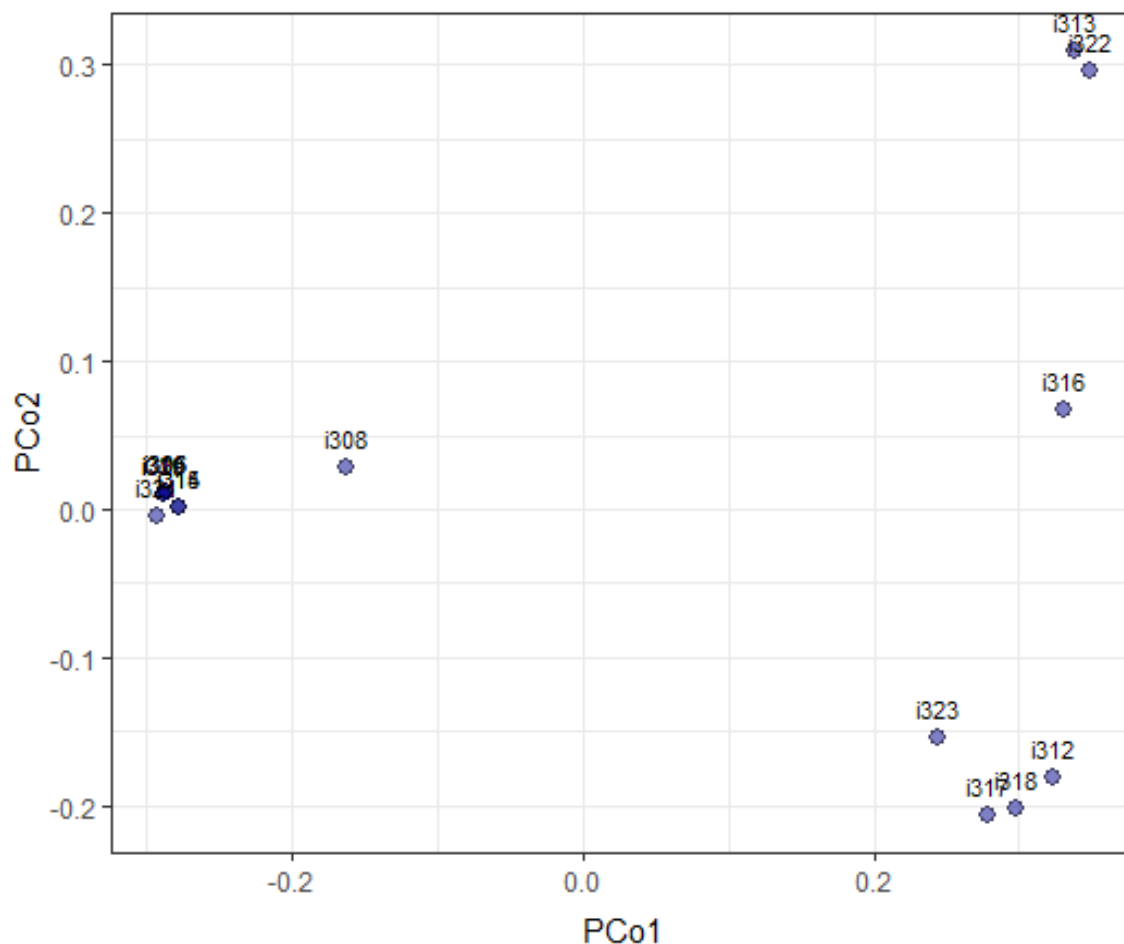


Figura 4.12. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de folhas e raízes de soja.

A análise de variância molecular (AMOVA) com os 15 isolados de *C. cassiicola* foi realizada com 10.000 randomizações, considerando a diferença entre partes das plantas de soja (folhas e raiz) de onde os isolados foram coletados e causavam sintomas (mancha-alvo e podridão radicular).

Tabela 4.11. Análise de variância molecular (AMOVA) entre os isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes órgãos da planta hospedeira (folhas e raízes).

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	FST	p -valor
Entre órgãos da Planta	8	1,2554991	0,6979602	0,00
Erro	13	0,8941255		
Total	14	2,1496246		

Os valores das diferenciações genéticas das populações de *C. cassiicola* (FST) foram todos obtidos pela AMOVA, e foram significativos ($p < 0,001$) com probabilidades calculadas por 10.000 permutações ao acaso. O valor da diferenciação genética (FST) entre os isolados de *C. cassiicola* entre o órgão da planta de onde foi coletado (raiz e folha) foi 0,6979602. Ou seja, 69,79% da variação genética encontrada entre os 15 isolados estudados advém do tecido da planta de onde foi isolado e consequentemente a doença ao qual estava associada, mancha-alvo (folhas) e podridão-radicular (raízes).

Os resultados obtidos pela diferentes análises baseadas nos marcadores ISSR, foram bastante coerentes entre si. Os agrupamentos formados nos dendrogramas gerados utilizando o critério UPGMA, demonstraram a existência de estruturação forte entre os dois grupos de *C. cassiicola* provenientes de folhas e raízes de plantas de soja, gerando dois clados distintos entre os grupos. Esse comportamento também pode ser observado nos resultados da análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Figura 4.12). Foi possível observar que os isolados se agrupam de modo que todos os isolados de raiz permanecem próximos entre si e estruturalmente separados dos isolados de folha. Confirmou-se a partir do PCoA que existe estruturação diferenciada entre os grupos de isolados.

A AMOVA apontou também estruturação populacional alta entre os isolados, corroborando com os clados gerados por UPGMA e agrupamentos demonstrados pelo PCoA. Todas as análises destacaram que os dois grupos diferem geneticamente entre si, e apresentam clara estruturação, indicando uma diferença de especiação.

No trabalho realizado por Nghia et al. (2008), avaliando as características morfológicas e o polimorfismo por meio de oito marcadores ISSR, em 21 isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes clones de *Hevea* cultivados na Malásia, agrupou os isolados em dois clusters distintos. Em ensaios de patogenicidade detectaram diferenças entre os clusters, sendo que, o cluster 1 assemelhava-se a raça 1 e o cluster 2 a raça 2 do fungo que já tinha sido previamente identificado na Malásia. Os resultados obtidos se assemelham aos deste trabalho, tendo em vista que a partir de análises com os marcadores ISSR foi possível demonstrar grande diferenciação entre grupos de isolados de *C.*

cassiicola provenientes do mesmo hospedeiro. Entretanto as diferenças estruturais observadas neste trabalho indicam uma diferenciação para além de raça fisiológica, mas formação de nova espécie.

Os estudos referentes à diferenciação entre isolados de *C. cassiicola* atribuída a diferentes hospedeiros (Aguilar, 2015, Dal’Sasso, 2017, Ferreira, 2014, Qi et al., 2011), demonstram variabilidade genética e em alguns casos, estruturação. Neste estudo, apesar de avaliar isolados provenientes do mesmo hospedeiro (soja), observar-se a estruturação entre os isolados dos dois grupos (folha e raiz), sugerindo uma diferenciação de especiação entre ambos.

4.4.4. Teste de patogenicidade Cruzada

4.4.4.1 Inoculação folha destacada

Nas inoculações da parte área (folhas), os isolados de ambos os grupos (folha e raiz) foram patogênicos (Figuras 4.13 e 4.14). As folhas inoculadas com o tratamento controle (disco de BDA) não manifestaram sintomas. Entretanto, ocorreu uma variação na velocidade e intensidade dos sintomas manifestados pelos dois grupos de isolados.

As folhas de soja inoculadas com isolados provenientes de folha (mancha-alvo) apresentaram sintomas rapidamente, sendo que, em geral, dois dias após a inoculação os sintomas iniciais já eram visíveis nas folhas, demonstrando maior agressividade, sendo mais severos os isolados 317 e 318.



Figura 4.13. Folhas de soja cinco dias após a inoculação com isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de folhas.

As folhas de soja que foram inoculadas com isolados provenientes de raiz apresentaram desenvolvimento dos sintomas, de maneira mais lenta e sutil, que se iniciaram em geral, cinco dias após a inoculação. Os sintomas gerados por esses isolados evoluíam lentamente não comprometendo as folhas por completo durante a avaliação do experimento (10 dias). Os isolados de raiz 315 e 319 foram os que apresentaram maior agressividade nas folhas.



Figura 4.14. Folhas de soja oito dias após a inoculação com isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de raízes.

Os isolados de folha em geral foram mais agressivos, sendo possível observar que os sintomas gerados, evoluíram rapidamente e no máximo em sete dias a superfície foliar havia sido comprometida (Figura 4.13). Os sintomas iniciavam com lesões cloróticas e evoluindo para necrose. Já os isolados de raiz requereram um tempo maior para o início da manifestação dos sintomas, e estes evoluíram de maneira mais gradativa. Entretanto, em nenhuma das folhas avaliadas no período do experimento (10 dias), os sintomas comprometeram toda a folha, ficando restritos a pequenas lesões amareladas que evoluíram lentamente para necrose do tecido (Figura 4.14).

4.4.4.2. Inoculação na raiz

No teste de patogenicidade para o sistema radicular, os isolados de ambos os grupos (folha e raiz) avaliados apresentaram-se patogênicos (Figuras 4.15 e 4.16), ocorrendo também, uma variação na velocidade e intensidade dos sintomas manifestados pelos dois grupos de isolados. As raízes inoculadas com o tratamento controle (disco de ágar) não manifestaram sintomas.

As raízes das plantas de soja inoculadas com isolados provenientes de folha (mancha-alvo) apresentaram sintomas lentamente e sutis (Figura 4.15). Os isolados de folha que apresentaram maior patogenicidade no sistema radicular das plântulas de soja foram 318 e 323.



Figura 4.15. Manifestação de sintomas de *Corynespora cassiicola* em raízes de soja inoculadas com isolados provenientes de folhas. A: raízes com disco de micélio visualizadas em lupa Olympus Sz40 sob aumento 10x. B e C: Raízes com sintomas sutis de infecção por *C. cassiicola*.

As raízes de soja inoculadas com isolados provenientes da própria raiz (podridão-radicar) desenvolveram sintomas mais rápidos e severos (Figura 4.16). De acordo com Avozani (2011), a podridão de raiz causada por *C. cassiicola* é caracterizada como podridão seca, iniciando por uma mancha de coloração vermelha arroxeada no tecido cortical, evoluindo para coloração negra. Em plantas mortas, em solo úmido, o fungo produz abundante esporulação, o que permite identifica-lo com facilidade, por meio dos sinais. Neste estudo, o sistema radicular das plântulas inoculadas com isolados provenientes de raiz (Figura 4.16), manifestou sintomas (que evoluíram) de maneira semelhante ao descrito na literatura (Almeida et al., 2005, Avozani, 2011, Henning et al., 2014).



Figura 4.16. Manifestação de sintomas e sinais de *Corynespora cassiicola* em raízes de soja inoculadas com isolados provenientes de raízes. A e B: raízes com disco de micélio. C: Raízes com sintomas severos de infecção por *C. cassiicola*. D: Raízes com sintomas severos de infecção por *C. cassiicola* visualizadas em lupa Olympus Sz40 sob aumento 10x.

Ambos os testes de patogenicidade foram confirmados por meio do reisolamento do patógeno, conseqüentemente completando os postulados de Koch (1881). Além disso, procedeu-se a confirmação da infecção por detecção molecular usando *primers* específicos para *C. cassiicola*, GA4-F/GA4-R (Dixon et al., 2009) e CCF/CCR-1 (Qi et al., 2009).

No teste de detecção molecular com o par de *primers* GA4-F/GA4-R para a patogenicidade cruzada, é possível observar que apenas os isolados provenientes de folhas (312, 317, 318 e 323) foram detectados (Figura 4.17) sendo que os isolados de raiz (306, 308, 319 e 320) não foram amplificados com esse par de *primers*. Esse resultado já era esperado, tendo em vista os resultados obtidos na caracterização molecular desses isolados, onde houve amplificação para os isolados de folhas, mas não para os de raízes.

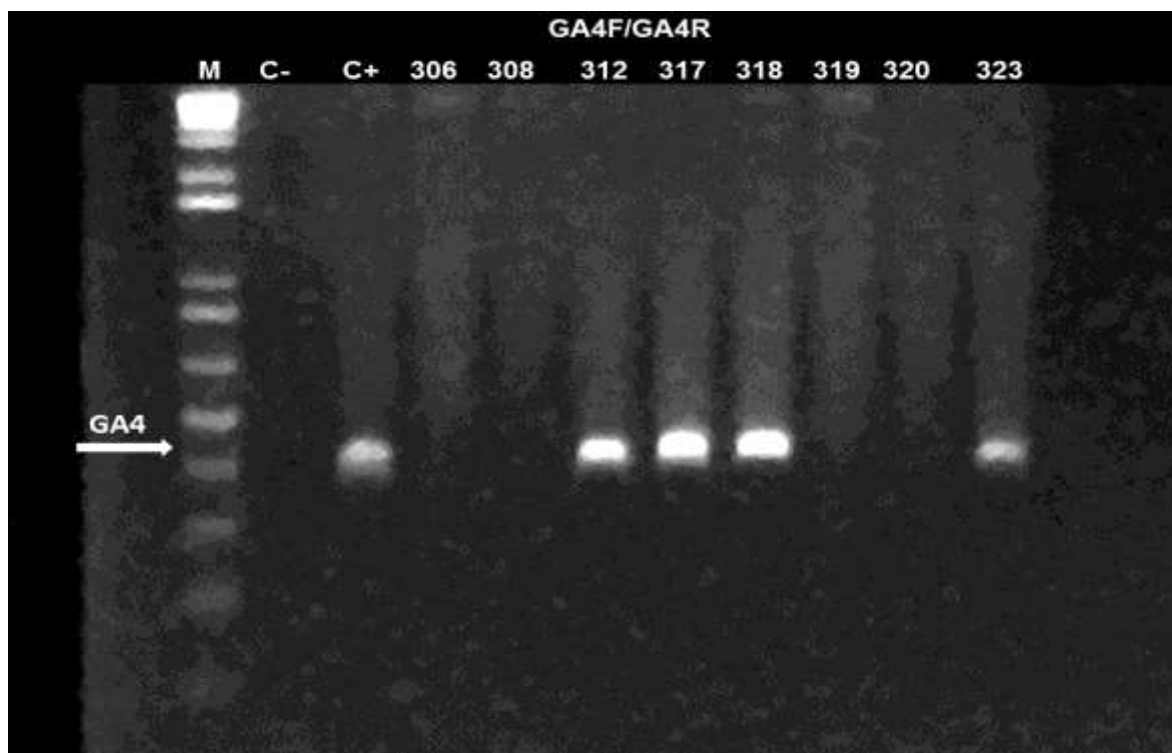


Figura 4.17. Teste de inoculação cruzada em raiz de soja. Detecção molecular por meio do par de *primers* GA4-F/GA4-R (415 pb) específicos para *C. cassicola*. C-: Controle negativo. C+: Controle positivo. M: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). Isolados de folha: 312, 317, 318 e 323. Isolados raiz 306, 308, 319 e 320.

Já para o teste de detecção molecular com o par de *primers* CCF/CCR-1 para a patogenicidade cruzada, foi possível observar a amplificação de todos os isolados de ambos os grupos (raiz e folha) (Figura 4.18). Comprovando a capacidade de ambos os grupos infectarem os tecidos das plantas. A amplificação para ambos os grupos era esperada, tendo em vista os resultados obtidos na caracterização molecular.

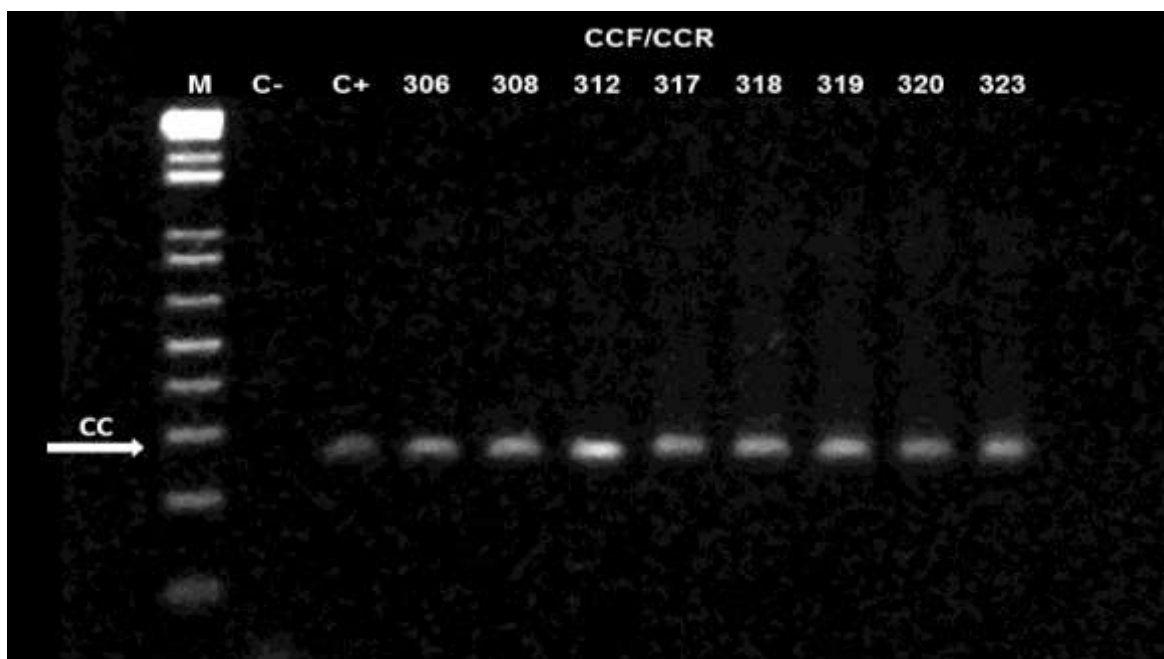


Figura 4.18. Teste de inoculação cruzada em raiz de soja. Detecção molecular por meio do par de *primers* CCF/CCR (272 pb) específicos para *C. cassiicola*. C-: Controle negativo. C+: Controle positivo. M: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen). Isolados de folha: 312, 317, 318 e 323. Isolados raiz 306, 308, 319 e 320.

Apesar da mancha-alvo e a podridão radicular de *Corynespora* em soja serem doenças atribuídas à mesma espécie fúngica, *Corynespora cassiicola*, alguns estudos divergem em relação a isto. Spencer and Walters (1969) determinaram através da inoculação em soja e feijão, a existência de duas raças distintas de *C. cassiicola*. Segundo os autores, as diferenças morfológicas, patogênicas e culturais entre esses isolados sugeriram a existência de variação em nível de espécie. Estes relataram ainda, que isolados obtidos de raiz e haste, não infectam folhas, enquanto, os isolados provenientes de folhas não infectam raízes de soja. Entretanto os resultados deste estudo divergem desses autores parcialmente, pois foi possível observar que os isolados provenientes de folhas infectavam raízes e os de raízes possuem a capacidade de infectar as folhas, porém a velocidade de colonização e a severidade dos sintomas foram diferentes, sendo mais expressivos nas inoculações de isolados sobre o tecido de origem.

De acordo com Aguiar (2015), alguns isolados de *C. cassiicola* apresentam patogenicidade para uma grande diversidade de plantas hospedeiras, enquanto outros isolados mostram-se específicos ao hospedeiro de origem. Existem também aqueles que são patogênicos somente quando associados a ferimentos. Isolados com diferentes perfis

genéticos de patogenicidade podem ser encontrados no mesmo hospedeiro (Dixon et al., 2009). Um mesmo isolado de *Corynespora* pode apresentar comportamento endofítico, saprofítico e patogênico em relação a diferentes hospedeiras, podendo apresentar patogenicidade a um grande número de hospedeiras ou somente à hospedeira de origem (Aguiar, 2015, Cutrim and Silva, 2003, Kingsland and Sitterly, 1986, Oliveira et al., 2007b, Onesirosan et al., 1974, Teramoto, 2008).

A ocorrência de raças e forma *specialis* (f.sp.) também é relatada para a espécie. Ismail and Jeyanayagi (1999) identificaram duas raças de *C. cassiicola* infectando clones de seringueira. Os autores relataram que a raça 1 infectava os clones RRM 600, GT1 e IAN 873 e a raça 2 infectava RRIM 2020. Em testes de patogenicidade realizados por Pereira et al. (2003) testando a patogenicidade de diferentes isolados, observaram especificidade e severidade de quatro isolados de *C. cassiicola* de plantas de tomate, hortênsia, trapoeraba e lantana a suas hospedeiras de origem. Os autores sugeriram a ocorrência de forma *specialis* (f.sp.), e nomearam o isolado de *C. cassiicola* proveniente de plantas de lantana de *C. cassiicola* f. sp. *lantanae*.

Neste trabalho foi possível observar que os isolados provenientes do mesmo hospedeiro (soja), porém isolados de tecidos distintos (raízes e folhas) e relacionados a patologias diferentes (mancha-alvo e podridão radicular de *Corynespora*), foram patogênicos entre si. Entretanto é importante ressaltar a diferença na velocidade e intensidade dos sintomas gerados, sendo que os isolados de folhas apresentaram maior patogenicidade às folhas (Figura 4.13) quando comparados ao isolados de raiz (Figura 4.14). Da mesma forma os isolados provenientes de raízes, causaram sintomas mais severos, além da demonstração de sinais (intensa esporulação) na superfície das plântulas infectadas (Figura 4. 16). Já os isolados provenientes de folhas, causaram sintomas brandos nas plântulas avaliadas (Figura 4.15). Esses resultados podem indicar uma diferença existente entre os isolados, tendo em vista que já foram relatadas na literatura ocorrências de raças e forma *specialis* (f.sp.) para *C. cassiicola*.

O conhecimento a respeito da variabilidade genética, existência de hospedeiros intermediários e sobre as formas de sobrevivência e dispersão dos fungos fitopatogênicos, são primordiais para se definir as práticas de manejo da doença. Neste trabalho buscaram-se entender a relação/interação entre os dois grupos patogênicos de *C. cassiicola* á soja e possíveis interferências/mecanismos de sobrevivência e patogenicidade entre eles. No trabalho realizado por Boosalis and Hamilton (1957) foi observado que *C. cassiicola*

causou podridão na raiz e no caule da soja. O patógeno infectou as raízes e caules durante o inverno e pode sobreviver em solo não esterilizado infestado por pelo menos dois anos. Segundo os autores a incidência foi maior nos campos onde soja foi plantada por dois anos consecutivos. Essas informações corroboram as relatadas por Almeida et al. (2005), Henning et al. (2014), que a ocorrência da podridão de raiz está aumentando com a expansão das áreas em semeadura direta, podendo estar relacionado à continuidade/aumento de inóculo na área. É possível observar que a ocorrência de podridão radicular é favorecida por baixas temperaturas e que as raízes após a morte da planta, podem ser cobertas por uma camada negra de conidióforos e conídios do fungo (Almeida et al., 2005, Henning et al., 2014), demonstrando assim sinais da doença. Já a ocorrência de mancha-alvo é favorecida quando as plantas são submetidas à temperatura de 20 a 30°C e umidade relativa do ar acima de 80% (Agrios, 2005). O fungo produz esporos nas duas faces das folhas, mas são mais abundantes na face adaxial (Almeida et al., 2005). Ressaltando-se a diferença nas condições ótimas de temperatura e umidade para a ocorrência de ambas as doenças. Podendo-se inferir a partir disso, que o fungo pode sobreviver a condições ambientais distintas e causar diferentes patologias as plantas de soja. Além disso, a formação de clamidósporos auxilia como estratégia de resistência/sobrevivência e manutenção de inóculo de *C. cassiicola* em diferentes condições no campo, dificultando assim o controle/manejo das doenças.

4.4.5. Sensibilidade dos isolados de *C. cassiicola* a fungicidas

Os quinze isolados de *C. cassiicola* apresentaram diferenças no crescimento micelial/sensibilidade entre as doses e os fungicidas testados, indicando assim a existência de variação na sensibilidade a fungicidas entre os isolados e principalmente entre os grupos de isolados (folha e raiz) mesmo em isolados que não sofreram um processo intenso de seleção pela aplicação frequente de fungicidas.

4.4.5.1. Determinação EC₅₀ e EC₉₈ dos isolados de *C. cassiicola*

As doses EC₅₀ e EC₉₈ foram determinadas para cada grupo de isolados e consequentemente para cada doença (mancha-alvo e podridão radicular de *Corynespora*).

Na análise da regressão entre o crescimento micelial (variável dependente y) e a concentração do fungicida (variável independente x), o modelo logarítmico foi o que mais se adequou e representou a relação entre as duas variáveis (Figura 4.19 e 4.20), o maior coeficiente de determinação (R^2) foi obtido por este modelo. A partir dos dados de sensibilidade dos sete isolados provenientes de folhas, e dos oito isolados de raiz foi possível gerar uma equação geral para a determinação das doses EC_{50} e EC_{98} para cada um dos fungicidas utilizados. A equação linear geral foi: $y = a \cdot \log(x) + b$. A partir da equação geral foi possível determinar o volume de ingrediente (s) ativo (s) de cada fungicida para as EC_{50} e EC_{98} para os isolados de folhas (Tabela 4.12) e para os de raízes (Tabela 4.13). Para fungicidas compostos por misturas (dupla ou tripla) os valores foram ajustados para o ingrediente ativo presente em menor concentração, para garantir a quantidade mínima de cada princípio ativo indicado. A quantidade calculada/utilizada de cada ingrediente ativo que compõem cada fungicida para as EC_{50} e EC_{98} para os isolados de folha são apresentados na Tabela 4.12 e para os isolados de raiz na Tabela 4.13.

Tabela 4.12. Ingrediente Ativo (i.a.), Concentração Efetiva 50% (EC₅₀) (µg.mL⁻¹), Concentração Efetiva 98% (EC₉₈) (µg.mL⁻¹), Equação da regressão e R² para cada fungicida para os isolados provenientes de folhas de soja (macha-alvo).

<i>Corynespora cassiicola</i> (L.) isolados de folha				
i.a.	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	EC ₉₈ (µg.mL ⁻¹)	Equação	R ²
Cyproconazol	0,855	6,207	y = 24,223x + 109,55	0,6972
Difeconazol	0,2058	0,8476	y = 33,913x + 150,62	0,7792
Tebuconazol	0,2725	1,125	y = 33,832x + 148,45	0,8271
Trifloxistrobina + Tebuconazol	0,601 + 1,202	3,556 + 7,112	y = 27x + 125,91	0,7391
Trifloxistrobina + Protiocanazol	0,3416 + 0,386	1,40 + 1,586	y = 34,032x + 151,11	0,8055
Epoxiconazol + Piraclostrobina	1,79 + 4,654	11,918 + 30,996	y = 25,33x + 111,11	0,7774
Epoxiconazol + Fluxapirroxade + Piraclostrobina	0,995 + 0,995 + 1,592	3,252 + 3,252 + 5,203	y = 40,524x + 171,6	0,8325

Tabela 4.13. Ingrediente Ativo (i.a.), Concentração Efetiva 50% (EC₅₀) (µg.mL⁻¹), Concentração Efetiva 98% (EC₉₈) (µg.mL⁻¹), Equação da regressão e R² para cada fungicida para os isolados provenientes de raízes de soja (podridão radicular de *Corynespora*).

<i>Corynespora cassiicola</i> (L.) isolados de raiz				
i.a.	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	EC ₉₈ (µg.mL ⁻¹)	Equação	R ²
Cyproconazol	0,02239	0,546	y = 34,598x + 141,68	0,8346
Difeconazol	0,005328	0,9777	y = 21,202x + 110,96	0,6234
Tebuconazol	0,00635	0,077	y = 40,446x + 171,29	0,7581
Trifloxistrobina + Tebuconazol	0,0128 + 0,0256	0,303 + 0,606	y = 34,302x + 150,08	0,6522
Trifloxistrobina + Protiocanazol	0,00646 + 0,00732	0,098 + 0,1110	y = 40,583x + 172,29	0,7861
Epoxiconazol + Piraclostrobina	0,0273 + 0,07098	1,73 + 4,498	y = 26,867x + 126,97	0,7697
Epoxiconazol + Fluxapirroxade + Piraclostrobina	0,02196 + 0,02196 + 0,03074	0,55 + 0,55 + 0,77	y = 34,132x + 151,03	0,7424

A determinação da fungitoxidade de uma substância é quantificada pela DE_{50} (dose efetiva), EC_{50} (concentração efetiva) ou CI_{50} (concentração inibitória), e se refere à concentração do ingrediente ativo que inibe 50% do crescimento micelial ou da germinação de esporos (Edgington et al., 1971, Lehner et al., 2015, Reis et al., 2010, Sharvelle, 1961). Sendo uma importante ferramenta para avaliar a redução da sensibilidade de populações de fungos a fungicidas ao longo do tempo. Diante dos resultados, é possível observar que os valores obtidos para as concentrações efetivas para 50 e 98% variaram para entre os grupos de isolados. Observa-se que no geral, os isolados de raiz apresentaram maior sensibilidade aos fungicidas em comparação aos isolados de folha. Os isolados de folhas estão associados à mancha-alvo uma doença de final de ciclo (DFC), e no campo, sua ocorrência coincide com o momento de uso mais intenso de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática e de outras DFC's como o crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*) e a mancha-parda/septoriose (*Septoria glycines*). A fase de ocorrência da podridão radicular de *Corynespora* em plantas de soja não é totalmente conhecida, porém sabe-se que as plantas infectadas são distribuídas ao acaso na plantação, apresentando amarelecimento das folhas e maturação desuniforme. As raízes infectadas por *C. cassicola* apresentam coloração castanho-claro e, após a morte da planta, podem ser cobertas por uma camada negra de conidióforos e conídios do fungo (Almeida et al., 2005, Embrapa, 2010, Henning et al., 2014). Encontrado também em restos culturais de em cultivos de inverno Seaman and Shoemaker (1965).

Diante dessa diferença no momento de ocorrência da doença no campo, provavelmente os fungos provenientes da raiz sofrem uma menor pressão de seleção pelo uso de fungicidas, demonstrando assim maior sensibilidade aos principais fungicidas utilizados para a cultura da soja. É importante observar que os isolados utilizados nesse experimento, foram todos coletados antes do ano de 2001, quando a ferrugem-asiática foi relatada nos cultivos de soja do Brasil, e conseqüentemente o uso de fungicidas se intensificou. Mesmo assim, foi possível observar entre os dois grupos de isolados (ambos “selvagens”) que os provenientes de folha já apresentam menor sensibilidade a fungicidas que os provenientes de raiz.

4.5. CONCLUSÕES

- 1- As colônias apresentam grandes diferenças morfológicas na velocidade de crescimento, formato e textura entre os grupos de isolados. A morfologia de conídios também demonstrou grande variação entre os isolados de ambos os grupos, sendo que conídios de isolados de raiz apresentaram tamanhos (comprimento e largura) superiores. Clamidósporos são formados apenas entre os isolados provenientes de folhas de soja.
- 2- A caracterização molecular com os dois pares de *primers* específicos não se aplica a ambos os grupos, sendo que CCF-1/CCR-1 amplificou fragmentos para os dois grupos, porém, GA4F/GA4-R somente amplifica DNA em isolados de folha.
- 3- O sequenciamento de dois genes conservados classifica os isolados de folha como pertencentes à espécie *C. cassiicola*, entretanto, a classificação dos isolados de raiz apresenta variação em nível de família para a β -tubulina, sendo caracterizados como *C. cassiicola* para o gene ribossomal ITS.
- 4- A diversidade genética analisada com marcadores ISSR demonstra por meio da AMOVA, significativa estruturação, entre os dois grupos de isolados, em função do tecido vegetal do qual são provenientes (raiz e folha).
- 5- Os dois grupos de isolados infectam ambos os órgãos vegetais (folha e raiz), porém, apresentam diferenças na velocidade e intensidade do desenvolvimento dos sintomas.
- 6- Os isolados de raiz apresentam maior sensibilidade a fungicidas. As doses EC₅₀ e EC₉₈ para os isolados de raiz são menores que as determinadas para os isolados de folhas.
- 7- Os resultados indicam que os dois grupos de isolados provenientes de soja (folha e raiz) não pertencem à mesma espécie fúngica, isto é *Corynespora cassiicola*.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant pathology*, Burlington, MA, USA, Elsevier Academic Press.
- AGUIAR, F. M. 2015. *Caracterização de isolados de Corynespora cassiicola e avaliação da sensibilidade in vitro a fungicidas*. Doctor, Universidade de Brasília.
- ALMEIDA, A. M. R., FERREIRA, L. P., YORINORI, J. T., SILVA, J. F. V., HENNING, A. A., GODOY, C. V., COSTAMILAN, L. M. & MEYER, M. C. 2005. Doenças da Soja. In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L. E. A. (eds.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4 ed.: Agronômica Ceres.
- ALMEIDA, A. M. R., MACHADO, C. C., FERREIRA, L. P., LEHMAN, P. S. & ANTONIO, H. 1976. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 1, 111-112.~
- AVOZANI, A. 2011. *Sensibilidade de Corynespora cassiicola, isolados da soja, a fungicidas in vitro*. Mestrado, Universidade de Passo Fundo.
- BARNETT, H. & HUNTER, B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*, Mineapolis, Burgess.
- BARNETT, H. & HUNTER, B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*, St Paul, Minnesota, American Phytopathological Society.
- BECHER, R., HETTWER, U., KARLOVSKY, P., DEISING, H. B. & WIRSEL, S. G. R. 2010. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. . *Phytopathology*, 100, 444–453.
- BOLLE, P. C. 1924. Die durch Schwärzepilze (Phaeodictiae) erzeugten Pflanzenkrankheiten. *Mededelingen Phytopathologisch Laboratorium "Willie Commelin Scholten"*, 7, 1–77.
- BOOSALIS, M. G. & HAMILTON, R. I. 1957. Root and stem rot of Soybean caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Plant Disease Reporter* 41, 696-698.
- BORNET, B. & BRANCHARD, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter*, 19, 209-215.
- CARVALHO, R. S., PINTO, J. F. N., REIS, E. F., SANTOS, S. C. & DIAS, L. A. S. 2012. Variabilidade genética de cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile* st. hill.) por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34, 227-233.
- CHEN, J. M., GITURU, W. R., WANG, Y. H. & WANG, Q. F. 2006. The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): comparative results for RAPD and ISSR markers. *Aquatic Botany*, 84, 301-307.

- CRUZ, C. D. & CARNEIRO, P. C. S. 2003. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas*, Viçosa, UFV.
- CUTRIM, F. A. & SILVA, G. S. 2003. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 193-194.
- DAL'SASSO, T. C. S. 2017. *Filogeografia Molecular de Corynespora cassiicola, um fungo polífago e causador da Mancha-Alvo*. Magister Scientiae em Genética e Melhoramento, UFV.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J. & HICKS, J. B. 1983. A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- DÉON, M., BOURRÉ, Y., GIMENEZ, S., BERGER, A., BIEYSSE, D., LAMOTTE, F. & AL., E. 2012. Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Science*, 185-186, 227-237.
- DÉON, M., FUMANAL, B., GIMENEZ, S., BIEYSSE, D., OLIVEIRA, R. R., SHUIB, S. S. & AL., E. 2014. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biology*, 118, 32-47.
- DIXON, L. J., SCHLUB, R. L., PERNEZNY, K. & DATNOFF, L. E. 2009. Host Specialization and Phylogenetic Diversity of *Corynespora cassiicola*. *PHYTOPATHOLOGY* 99, 1015-1027.
- DUARTE, M. L. R., ASANO, S. & ALBUQUERQUE, F. C. 1983. Estudo comparativo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassiicola*. *Fitopatologia Brasileira*, 8, 205-214.
- EDGINGTON, L. V., KNEW, K. L. & BARRON, G. L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, 61, 42-44.
- ELLIS, M. & HOLLIDAY, P. 1971. *Corynespora cassiicola* CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 303, 1-2.
- ELLIS, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. *Commonwealth Mycological Institute*.
- ELLIS, M. B. 1976. More dematiaceous Hyphomycetes. *Commonwealth Mycological Institute*.
- EMBRAPA 2010. *Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2011*, Londrina, Embrapa Soja.
- EMBRAPA 2013. *Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil 2014*. , Londrina, Embrapa Soja.
- FALEIRO, F. G. 2007. *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*, Planaltina, DF, Embrapa Cerrados.

- FARR, D. F. & ROSSMAN, A. Y. 2018. *Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA* [Online]. Available: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases> [Accessed 10 de novembro 2018].
- FERREIRA, A. F. T. A. F. 2014. *Diversidade genética e estrutura de população entre isolados de *Corynespora cassiicola* no estado do Amazonas*. Mestrado Universidade Federal do Amazonas.
- FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- GARCIA, R. Á., MEYER, M. C., ÁVILA, K. A. G. B. & CUNHA, M. G. 2015. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao mofo branco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50, 726-729.
- GILBERT, R. L. 2002. First report of *Exserohilum pedicellatum* on *Zea mays* in Australia. *New Disease Reports* 6.
- GLASS, N. L. & DONALDSON, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1323-1330.
- GODWIN, I. D., AITKEN, E. A. B. & SMITH, L. W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18, 1524-1528.
- GOULD, A. B. 2010. Fungos fitopatogênicos e oomicetos. In: TRIGIANO, R. N., WINDHAM, M. T. & WINDHAM, A. S. (eds.) *Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed.
- 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. 2014. *Manual de identificação de doenças de soja*, Londrina, Embrapa Soja.
- HENRY, A. W. 1924. Root-rots of wheat. *University of Minnesota Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, 22, 1-71.
- HERNÁNDEZ-RESTREPO, M., MADRID, H., TAN, Y. P., CUNHA, K. C., GENÉ, J., GUARRO, J. & CROUS, P. W. 2018. Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia*, 41, 71-108.
- ISMAIL, H. & JEYANAYAGI, I. 1999. Occurrence and identification of physiological races of *Corynespora cassiicola* of Hevea. In: CHEN, Q. B. & ZHOU, J. N. (eds.) *Proceedings of the IRRDB Symposium 1999*. Hainnan Publishing House.
- JESUS, F. F., SOLFERINI, V. N., SEMIR, J. & PRADO, P. I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plants Systematics and Evolution*, 226, 59-68.

- JULIATTI, F. C., SAGATA, E., JACCOUD FILHO, D. D. S. & JULIATTI, B. C. M. 2014. Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal*, 30, 958-968.
- KINGSLAND, G. & SITTERLY, W. 1986. Studies on fungicides for control of *Corynespora cassiicola* leaf spot of tomatoes in the Republic of Seychelles. *International Journal of Pest Management*, 32, 31-34.
- KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D. W. & STALPERS, J. A. 2008. *Dictionary of the fungi*, Wallingford, CABI Publishing
- KOCH, R. 1881. Methods for the study of pathogenic organisms. *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 2, 1-48.
- KWON, M. K., KANG, B. R., CHO, B. H. & KIM, Y. C. 2003. Occurrence of target leaf spot disease caused by *Corynespora cassiicola* on cucumber in Korea. . *Plant Pathology*, 52, 424.
- LEHNER, M. S., SILVA, R. A., VIEIRA, R. F., CARNEIRO, J. E. S., SCHNABEL, G. & MIZUBUTI, E. S. G. 2015. Fungicide Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: A Thorough Using Discriminatory Dose, Ec 50, High Resolution Melt Assessment Analysis and Description of New Point Mutation Associated with Resistance. *Plant Disease*, 99, 1537–1543.
- LEONARD, K. J. & SUGGS, E. G. 1974. *Setosphaeria prolata*, the ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. *Mycologia*, 66, 281-297.
- LORENZONI, R. M., SOARES, T. C. B., SANTIAGO, V. F., SILVA, J. A. & COELHO, R. I. 2014. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de Biribazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 251-257.
- MACEDO, D. M. & PEREIRA, O. L. 2013. *Corynespora cassiicola* f. sp. *schinii*, a Potential Biocontrol Agent for the Weed *Schinus terebinthifolius* in the United States. *Plant Disease*, 97, 496-500.
- MACHADO, F. J. 2016. *Giberela do Trigo: Resistência a Fungicidas e Metanálise da Eficácia do Controle Químico* Dissertação (Magister Scientiae), Universidade Federal de Viçosa.
- MAY, A. C. W. 1999. Towards more meaningful hierarchical classification of amino acid scoring matrices. *Protein Engineering*, 12, 707-712.
- MYCOBANK 2018. *Corynespora cassiicola*.
- NGHIA, N. A., KADIR, J., SUNDERASAN, E., ABDULLAH, M. P., MALIK, A. & NAPIS, S. 2008. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. *Mycopathologia*, 166, 189–201.

- NGUYEN, H. T. T., CHOI, K. S. & PARK, S. J. 2013. Genetic diversity and differentiation of a narrowly distributed and endemic species, *Aster spathulifolius* maxim (Asteraceae), revealed with inter simple sequence repeat markers. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56, 255-262.
- OLIVE, L. S., BAIN, D. C. & LEFEBVRE, C. L. 1945. A Leaf Spot Of Cowpea and Soybean Caused By an Undescribed Species Of *Helminthosporium*. *Phytopatology*, 35, 822-831.
- OLIVEIRA, M. S. P., AMORIM, E. P., SANTOS, J. B. & FERREIRA, D. F. 2007a. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, 1.645-1.653.
- OLIVEIRA, R. R., AGUIAR, B. D. M., TESSMANN, D. J., PUJADE-RENAUD, V. & VIDA, J. B. 2012. Chlamydospore formation by *Corynespora cassiicola*. *Tropical Plant Pathology*, 37, 415-418.
- OLIVEIRA, R. R., VIDA, J. B., TESSMANN, D. J., AGUIAR, B. D. M., CAIXETA, M. P. & BARBOZA, A. L. 2007b. Patogenicidade de isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Summa Phytopathologica*, 33, 297-299.
- ONESIROSAN, P. T., ARNY, D. C. & DURBIN, R. D. 1974. Host specificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 64, 1364-1367.
- PARREIRA, D. F., ZAMBOLIM, L., GOMES, E. A., COSTA, R. V., SILVA, D. D., LANA, U. G. D. P., NEVES, W. D. S., FIGUEIREDO, J. E. F. & COTA, L. V. 2016. Diversidade genética estimada através de Marcadores ISSR de *Colletotrichum graminicola* no Brasil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 15, 186-194.
- PEREIRA, J. M., BARRETO, R. W., ELLISON, C. A. & MAFFIA, L. A. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control*, 26, 21-31.
- PERNEZNY, K. & SIMONE, G. W. 1993. Target spot of several vegetable crops. *Florida Cooperative Extension Services. Institute of Food and Agricultural Sciences*, 39.
- QI, Y.-X., ZHANG, X., PU, J.-J., LIU, X.-M., LU, Y., ZHANG, H., ZHANG, H.-Q., LV, Y.-C. & XIE, Y.-X. 2011. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 130, 83-95.
- QI, Y., XIE, Y., ZHANG, X., PU, J., ZHANG, H., HUANG, S. & ZHANG, H. 2009. Molecular and Pathogenic Variation Identified Among Isolates of *Corynespora cassiicola*. *Molecular Biotechnology*, 41, 145-151.
- R, C. T. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. In: COMPUTING, R. F. F. S. (ed.) 3.4.1 ed. Vienna.

- RAFFEL, S. J., KAZMAR, E. R., WINBERG, R., OPLINGER, E. S., HANDELSMAN, J., GOODMAN, R. M. & GRAU, C. R. 1999. First Report of Root Rot of Soybeans Caused by *Corynespora cassiicola* in Wisconsin. *Disease Notes*, 83.
- REIS, E. M., REIS, A. C. & CARMONA, M. A. 2010. *Manual De Fungicidas – Guia Para o Controle Químico de Doenças de Plantas*, Passo Fundo, UPF.
- RIBEIRO, F. D. C., COLOMBO, G. A., CARVALHO, E. V. D., PELÚZIO, J. M. & ERASMO, E. A. L. 2017. Controle Químico Da Mancha-Alvo da Soja (*Corynespora cassiicola*) no Cerrado Tocantinense-Brasil. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 4, 26-36.
- ROMESBURG, H. C. 1984. *Cluster analysis for researchers*, Belmont, Lifetime Learning Publishers.
- SCHOCH, C., CROUS, P. W., GROENEWALD, J. Z., BOEHM, E. W. A., BURGESS, T. I., DE GRUYTER, J. & AL., E. 2009. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology*, 64, 1-15.
- SEAMAN, W. L. & SHOEMAKER, R. A. 1965. *Corynespora cassiicola* on Soybean in Ont *Plant Disease Reporter*, 48, 69.
- SEIFERT, K., MORGAN-JONES, G., GAMS, W. & AL., E. 2011. The genera of hyphomycetes. *CBS Biodiversity*. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- SERRA, I. S., PROCACCINI, G., INTRIERI, M. C., MIGLIACCIO, M., MAZZUCA, S. & INNOCENTI, A. M. 2007. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, 338, 71–79.
- SHARVELLE, E. G. 1961. *The Nature Uses of Modern Fungicides*, Minneapolis, Burgess Publishing Company.
- SHIMOMOTO, Y., SATO, T., HOJO, H., MORITA, Y., TAKEUCHI, S., MIZUMOTO, H. & AL., E. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathology*, 60, 253-260.
- SILVA, W. P. K., KARUNANAYAKE, E. H., WIJESUNDERA, R. L. C. & PRIYANKA, U. M. S. 2003. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. *Mycological research*, 107, 567-571.
- SIMMONS, E. G. 1971. *Helminthosporium allii* as type of a new genus. *Mycologia*, 63, 380-386.
- SIMMONS, E. G. 2007. *Alternaria: an identification manual*, Utrecht, The Netherlands.
- SINCLAIR, L. B. & SHURTLEFF, M. C. 1975. A compendium of soybean diseases. . *American Phytopathological Society*.

- SIVANESAN, A. 1984. New species of *Exserohilum*. *Transactions of the British Mycological Society* 83, 319-329.
- SIVANESAN, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. . *Mycological Papers*, 158, 1–261.
- SIVANESAN, A. 1996. *Corynesporasca caryotae* gen. et sp. nov. with a *Corynespora* anamorph, and the family Corynesporascaceae. *Mycological Research* 100, 783-788.
- SNOW, J. & BERGGREN JÚNIOR, G. 1989. Target spot. In: SINCLAIR, J. & BACKMAN, P. (eds.) *Compendium of Soy bean Diseases*. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- SPENCER, J. A. & WALTERS, H. J. 1969. Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 59, 58-60.
- SPOLTI, P., DEL PONTE, E. M., DONG, Y., CUMMINGS, J. A. & BERGSTROM, G. C. 2014. Triazole Sensitivity in a Contemporary Population of *Fusarium graminearum* From New York Wheat And Competitiveness of a Tebuconazole-Resistant Isolate. *Plant Disease*, 98, 607–613.
- SUBRAMANIAN, C. V. & JAIN, B. L. 1966. A revision of some graminicolous Helminthosporia. *Current Science*, 35, 352-355.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D. & AL., E. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- TANAKA, K., HIRAYAMA, K., YONEZAWA, H. & AL., E. 2015. Revision of the Massarineae (Pleosporales, Dothideomycetes). *Studies in Mycology*, 82, 75-136.
- TANAKA, K., OOKI, Y., HATAKEYAMA, S., HARADA, Y. & BARR, M. E. 2005. Pleosporales in Japan (5): Pleomassaria, Asteromassaria, and Splanchnonema. *Mycoscience*, 46, 248-260.
- TERAMOTO, A. 2008. *Caracterização morfológica, fisiológica, isoenzimática e controle de isolados de Corynespora cassiicola (Berky & Curt) Wei, agente causal da mancha-alvo*. Doutorado, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás.
- TERAMOTO, A., PARISI, M. C. M. & CUNHA, M. G. D. 2013. Caracterização fisiológica de isolados de *Corynespora cassiicola*. *Tropical Plant Pathology*, 38, 313-322.
- VAZ PATTO, M. C., SATOVIC, Z., PÊGO, S. & FEVEREIRO, P. 2004. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, 137, 63-72.

- VEIGA, P. 1978. Mancha-alvo: uma nova doença no Rio Grande do Sul. *Revista Centro Ciências Rurais*, 8, 79-82.
- VOGLMAYR, H. & JAKLITSCH, W. M. 2017. *Corynespora*, *Exserohilum* and *Helminthosporium* revisited – New species and generic reclassification. *Studies in Mycology*, 87, 43-76.
- WEI, C. T. 1950. Notes on *Corynespora*. *Mycological Papers*, 30, 10.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SHINSKY, J. J. & WHITE, T. J. (eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic.
- YORINORI, J. T. 1989. Levantamento e avaliação da situação de doenças da soja na safra 1987/88. In: EMBRAPA (ed.) *Resultados de Pesquisa de Soja 1987/88*. Londrina: Embrapa - CNPSo.
- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. & LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.

4.7. APÊNDICES

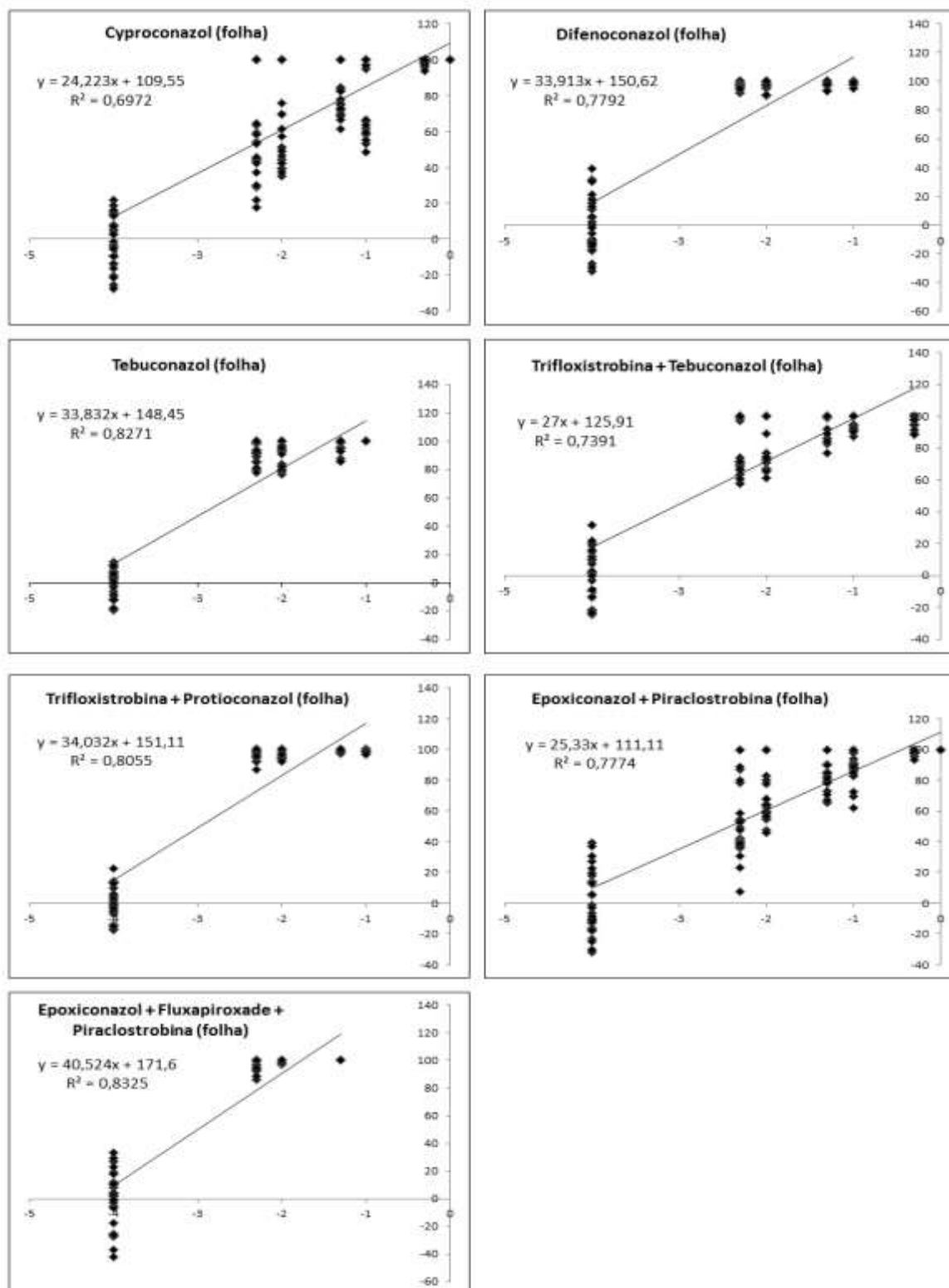


Figura 4.19. Sensibilidade dos isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de folhas de soja em função da concentração de diferentes princípios ativos de fungicidas.

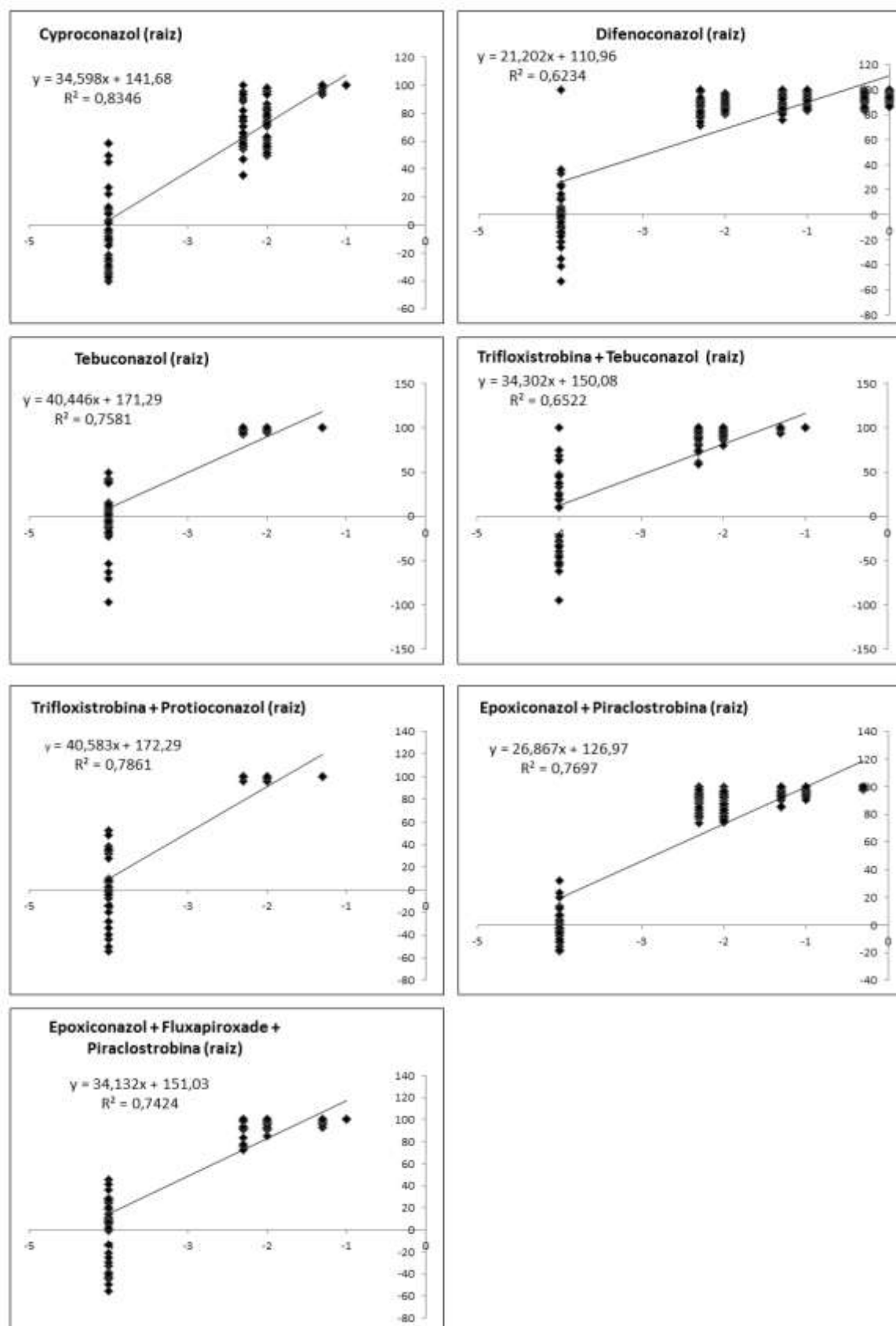


Figura 4.20. Sensibilidade dos isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de raízes de soja em função da concentração de diferentes princípios ativos de fungicidas.

5- CONCLUSÕES GERAIS

A espécie *Corynespora cassiicola* apresenta grande variabilidade genética com indícios de ocorrência de intenso fluxo gênico.

Os isolados “selvagens” de *C. cassiicola* apresentam variação na sensibilidade a fungicidas, ressaltando a variabilidade genética pré-existente nessa espécie.

Os valores das EC₅₀ e EC₉₈ para o crescimento micelial, gerados a partir de isolados “selvagens” de *C. cassiicola*, podem ser utilizados como fator de referência para a realização de trabalhos futuros, *in vitro*, de monitoramento da sensibilidade de *Corynespora cassiicola* a fungicidas, empregados na cultura da soja.

Os isolados apresentam variação na sensibilidade a fungicidas dos grupos triazóis (DMI) e estrobilurinas (QoI), o que denota um alto risco de seleção por resistência e sugere que a resistência múltipla a fungicidas pode estar ocorrendo em *C. cassiicola*.

As características morfológicas (colônias e conídios) e moleculares (regiões específicas, conservadas e polimórficas amplificadas por marcadores ISSR) indicam que os dois grupos de isolados provenientes de soja (folha e raiz) não pertencem à mesma espécie fúngica. Os isolados de folha pertencem à espécie *Corynespora cassiicola*, já os isolados de raiz tratam-se de uma nova espécie fúngica.