



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A  
FUNGICIDAS EM *Sclerotinia sclerotiorum* PROVENIENTE DE  
CULTIVO IRRIGADO DE FEIJOEIRO**

**WILLIAM ANDRÉS LÓPEZ ARBOLEDA**

**GOIÂNIA-GO**

**2015**

**WILLIAM ANDRÉS LÓPEZ ARBOLEDA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A  
FUNGICIDAS EM *Sclerotinia sclerotiorum* PROVENIENTE DE  
CULTIVO IRRIGADO DE FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em biologia. Área de concentração: biologia molecular

Orientadora: Profa. Dra.Silvana Petrofeza

**GOIÂNIA-GO**

**2015**

**WILLIAM ANDRÉS LÓPEZ ARBOLEDA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A  
FUNGICIDAS EM *Sclerotinia sclerotiorum* PROVENIENTE DE  
CULTIVO IRRIGADO DE FEJJOEIRO**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Adalberto Corrêa Café Filho  
Universidade de Brasília

---

Dr. Luiz Carlos Bhering Nasser  
Embrapa Cerrados- UniCEUB/ICPD

---

Profa. Dra. Silvana Petrofeza da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: 27/03/2015

## **Agradecimentos**

Agradeço a Universidade Federal de Goiás e principalmente à ex-coordenadora do programa de pós-graduação em ciências biológicas Dra. Profa. Kátia Flávia Fernandes pela oportunidade de realizar o meu mestrado. Agradeço aos meus pais, William López e María Yolanda Arboleda pela educação e o sacrifício constante. Agradeço a minha irmã Beatriz pelo seu carinho. Agradeço as minhas tias e tios maternos por sempre acreditar em mim. Agradeço a minha namorada Bettina Reinholz pela paciência e apoio ao longo de meu mestrado. Agradeço aos meus amigos Natália e Mathias por seu apoio e por inserir-me nas suas famílias, aos pais do Mathias por tratar-me como um dos seus filhos e ao pai da Natália por sua amizade.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de biologia molecular de fungos principalmente à Guilherme, Jacqueline, Ismail e Marília pela companhia e ajuda ao longo do meu mestrado. Agradeço ao meu amigo Daniel Andrés Osorio por suas palavras de apoio nos momentos difíceis. Agradeço à Dra. Profa. Silvana Petrofeza pela orientação. Agradeço aos doutores Marcos Freitas e Luiz Carlos Bhering Nasser pelo auxílio durante as coletas de campo. Agradeço a Dra. Profa. Mariana Pires de Campos Telles pela ajuda na obtenção e análise de dados. Agradeço aos professores Alexandre Siqueira Guedes Coelho e João Batista Duarte pelo grande aprendizado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	9
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
1. Introdução .....	12
1.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary e o mofo branco.....	13
<b>1.1.1. Ciclo de vida e estruturas reprodutivas</b> .....	14
1.1.2. Locus <i>MAT</i> .....	21
<b>1.1.3. Variabilidade genética e estrutura populacional</b> .....	22
<b>1.1.4. Sensibilidade a fungicidas</b> .....	26
2. Objetivos.....	29
2.1. Objetivo geral .....	29
2.2. Objetivos específicos .....	29
<b>3. Metodologia</b> .....	30
3.1. Áreas amostradas e obtenção de isolados. ....	30
3.2. Preparação de fungicidas.....	30
3.3. Testes para avaliar a sensibilidade a fungicidas .....	31
3.3.1. Teste em placa .....	31
3.3.2. Teste do FRAC ( <i>Fungicide Resistance Action Committee</i> ).....	32
3.3.3. Teste de viabilidade celular baseado no alamarBlue® .....	32
3.4. Avaliação do crescimento em folha destacada.....	34
3.5. Estabelecimento de grupos de compatibilidade micelial .....	34
3.6. Extração de DNA .....	34
3.7. Genotipagem baseada em marcadores microsatélites .....	35
3.8. Análise de variabilidade genética.....	35
3.9. Detecção dos alelos <i>Inv+</i> e <i>Inv-</i> do locus <i>MAT</i> .....	36
4. Resultados e Discussão.....	37
4.1. Capítulo 1: A reproducible and fast microplate method for monitoring fungicide sensitivity in <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	37
4.1.1. Abstract.....	37
4.2. Capítulo 2: Genetic variability and fungicide sensitivity of <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> isolates from common bean irrigated by central-pivot. ....	38
4.2.1. Abstract.....	38

<b>5. Conclusões</b> .....	39
<b>6. Perspectivas</b> .....	40
Referências bibliográficas .....	41
ANEXOS .....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mofa branco no feijoeiro. (A) Apotécio. (B) Esclerócio. (C) e (D) Vagens afetadas pela doença.....	3
<b>Capítulo 1</b>		
Figure 1.	Concentration effect of benomyl (A), procymidone (B) and fluazinam (C) on cell viability, measured by percent reduction of alamarBlue®, of a <i>S. sclerotiorum</i> isolate (top three graphs). Columns are the mean and error bars are the standard error of four replicates for eight representative concentrations of each fungicide. The colorimetric reaction of alamarBlue® dye for each fungicide contains the eight concentration and the four replicates (R1-R4) (bottom three graphs)...	28
Figure 2.	Representative dose-response curves of benomyl (A), procymindone (B) and fluazinam (C) for an isolate of <i>S. sclerotiorum</i> , using three methodologies: alamarBlue® assay (AB), the 24-well tissue culture plate method (FRAC) and the mycelial growth inhibition on PDA medium (PDA). The bar graphs of each dose-response curve contain the 50% inhibitory concentration estimated by each methodology.....	31
Figure 3.	Variation of percent cell viability of 10 <i>S. sclerotiorum</i> isolates, with three fungicides in three concentrations: (A) benomyl (0.05 ppm, 0.5 ppm and 3 ppm), (B) fluazinam (0.001 ppm, 0.02 ppm and 3 ppm) and procymidone (0.015 ppm, 0.15 ppm and 4 ppm). Each point is the mean of four measurements and vertical bars represent one standard error of the mean.....	32
<b>Capítulo 2</b>		
Figure 1.	Variation of the percentage of cell viability of <i>S. sclerotiorum</i> isolates from four sampling locations with common bean plants: (A) procymidone (0.015 ppm, 0.15 ppm and 4 ppm), (B) fluazinam (0.001 ppm, 0.02 ppm and 3 ppm) and (C) benomyl (0.05 ppm, 0.5 ppm and 3 ppm). Each point represents the mean of three measurements and vertical lines represent one standard error of the mean.....	45
Figure 2.	Principal component analysis (PCA) with twelve variables and cluster dendrogram with K solution obtained by K-clustering via PCA. (A) Graphic representation of the PCA. (B) Groups detected by K-clustering via PCA. (C) Dendrogram showing the distribution of the 79 isolates into the five groups.....	46
Figure 3.	(A) The membership probability using the five clusters inferred by the Discriminant Analysis of Principal components (DAPC). (B) Minimum spanning tree based on Thirteen microsatellite markers showing the relationship among 79 isolates of <i>S. sclerotiorum</i> from four sampling location. The color of each isolate in the minimum spanning tree corresponds with the groups detected in the DAPC.....	52
Figure 4.	Minimum spanning network (msn) of multilocus haplotypes based on thirteen microsatellite markers. Node sizes and colors correspond to	

the number of individuals and population membership, respectively. Edge thickness and color are proportional to Bruvo's distance. Edge lengths are arbitrary.....

53

Figure 5.

Detection of the 3.6 kb inversion in the mating type locus in nine *S. sclerotiorum* isolates using two pairs of primers: MAT-1-1-F/MAT-1-1-R and Type-IIF/Type-IIR (specific primers to the Inv+). The lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 and 17 contain PCR product amplified with the primer par MAT-1-1-F/MAT-1-1-R and the lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18 contain PCR product amplified with the primer par Type-IIF/Type-IIR. The first lane contains the DNA size standard 100 pb. The presence of two bands indicates presumed heterokaryons.....

54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Quantidade de formulação comercial necessária para obter concentrações finais de 1000 ppm de principio ativo.....	20
<b>Capítulo 1</b>		
Tabela 1.	Reproducibility of alamarBlue® assays for benomyl and fluazinam. The significance of the trial (random variable) and the concentration (fixed variable) was estimated by using a linear mixed model (a). Analysis of variance (ANOVA) of the effect of concentration of each fungicide on the percent cell viability inhibition, estimated by using alamarBlue® assay (b). Comparison of the percentage of cell viability inhibition between concentrations for each fungicide (c).....	29
<b>Capítulo 2</b>		
Table 1.	Effect of three fungicides in three different concentrations on cell viability of 79 isolates of <i>S. sclerotiorum</i> from common bean fields distributed in four sampling locations (A). (B) Comparison of aggressiveness mean between the four sampling locations.....	43
Table 2.	<i>S. sclerotiorum</i> isolates from four sampling locations and their SSR haplotype, mycelial compatibility group, inversion type, clustering according DAPC and K-clustering via principal component analysis....	47
Table 3.	Allele number per locus, allelic frequency and expected heterozygosity to the four sampling locations of <i>S. sclerotiorum</i> .....	49
Table 4.	Gene diversity, genotypic diversity and recombination test to the four sampling locations of <i>S. sclerotiorum</i> .....	50
Table 5.	Analysis of molecular variance of <i>S. sclerotiorum</i> at four sampling locations.....	51
Table 6.	Pairwise comparison phi between four sampling locations of <i>S. sclerotiorum</i> . Values above the diagonal represent the P-value and below the diagonal represent the pairwise phi values.....	51

## RESUMO

*Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo fitopatogênico capaz de colonizar mais de 400 hospedeiras, sendo o agente causal do mofo branco no feijoeiro. Estudos de variabilidade genética associados a características fenotípicas de interesse agrônomo, como a sensibilidade a fungicidas, oferecem informações importantes para direcionar estratégias de controle sobre este patógeno. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a variabilidade genética, sensibilidade a fungicidas e agressividade de 79 isolados de *S. sclerotiorum* distribuídos em quatro populações procedentes de culturas de feijoeiro em pivô central. Duas destas populações representaram um único local de coleta em duas épocas diferentes (2000 e 2013). Para avaliar a sensibilidade a fungicidas foi padronizado um teste de viabilidade celular baseado no corante alamarBlue® sobre o crescimento micelial em microplaca de 96 poços. Curvas de dose-resposta para os fungicidas fluazinam, procimidona e benomyl, usando um isolado de *S. sclerotiorum*, foram estimadas com este método, e comparadas com curvas de dose-resposta obtidas com os métodos de inibição do crescimento em placa e o proposto pelo *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC). Apesar das diferentes abordagens as curvas dose-resposta mostraram tendências semelhantes para os três fungicidas. A avaliação da sensibilidade a fungicidas nas quatro populações indicou uma alta insensibilidade ao benomyl na população de Planaltina. Por outro lado, a estrutura populacional foi principalmente clonal com um haplótipo representado por 18 dos 20 isolados desta população. Diferenciação populacional significativa foi detectada em todas as comparações par a par do phi, com a exceção da comparação EV-2013-NH. A análise DAPC identificou cinco grupos geneticamente homogêneos. Nenhum dos grupos esteve constituído por isolados das quatro populações. Só dois haplótipos foram compartilhados pelas populações EV\_2000 e EV\_2013. A hipótese de acasalamento aleatório foi rejeitada nas quatro populações, no entanto não foi rejeitada nas duas maiores populações sugeridas pelo DAPC. O screening do Mating type locus (*MAT*) mostrou uma prevalência de isolados *Inv+* e uma alta proporção de isolados *Inv+/Inv-*

**Palavras-Chave:** Locus *MAT*, *Sclerotinia sclerotiorum*, sensibilidade a fungicidas, variabilidade genética, virulência.

## ABSTRACT

*Sclerotinia sclerotiorum* is a phytopathogenic fungus that infects more than 400 plant species, including common bean. Genetic variability studies in connection with phenotypic traits of agronomic interest are important to drive the control strategies against this pathogen. The aims of this study were: to evaluate the genetic variability, fungicide sensitivity, aggressiveness and to determine the proportion of *MAT* (Mating Type) alleles of 79 isolates of *S. sclerotiorum* distributed in four populations from common bean. Two populations represented a single sampling location in two different times (2000 and 2013 growing seasons). To evaluate the fungicide sensitivity a cell viability test based on the alamarBlue dye using mycelial growth was standardized. Dose-response curves for fluazinam, procymidone and benomyl were estimated using this test and were compared with dose-response curves estimated by the mycelial growth inhibition on PDA plate and the FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) protocol. Despite the differences to assess the fungicide sensitivity between the three methods, the dose-response curves showed similar trends for the three fungicides. The fungicide sensitivity assessment at the four populations showed low sensitivity to benomyl in the Planaltina population. Furthermore, this population presented a principally clonal population structure, with a haplotype represented by 18 out of 20 isolates. Significant population differentiation in all pairwise comparisons of  $\phi$ , except the comparison between EV\_2013-NH, was detected. Five genetically homogeneous groups were inferred by the DAPC analysis. No group was conformed by isolates from the four populations. Only two haplotypes between the two populations from the same sampling location were shared. The hypothesis of random mating was rejected at the four populations; however this hypothesis was not rejected at the two major populations inferred by the DAPC analysis. The screening of mating type locus showed a dominance of Inv+ isolates and a high proportion of Inv+/Inv- isolates (presumable heterokaryons).

Keywords: Genetic variability, fungicide sensitivity, Mating type locus, *Sclerotinia sclerotiorum*, virulence,

## 1. Introdução

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um fungo fitopatogênico cosmopolita que provoca lesões e maceração do tecido de forma irrestrita em plantas hospedeiras. Este fungo necrotrófico está amplamente distribuído e é um dos patógenos com maior gama de hospedeiros afetando mais de 400 espécies (1). Algumas das espécies suscetíveis de maior importância econômica são: soja, feijão, ervilha, algodão, girassol, canola, batata e alface (2). No feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) este fungo é responsável pela doença conhecida como mofo branco, uma das mais devastadoras desta cultura, podendo acarretar perdas na produtividade de até 90% (3). O primeiro registro desta doença afetando a cultura de feijoeiro no Brasil foi em 1954 no estado do Rio Grande do Sul, posteriormente foi detectada no Paraná na década de 70 e na região dos cerrados na década de 80 (4).

Desde esta década e com a implementação dos sistemas de irrigação por pivô central, *S. sclerotiorum* tem sido o fator limitante de maior importância na produção de feijão na região do cerrado (5). Este tipo de irrigação no cultivo de outono-inverno e a alta densidade de plantas por hectare geram um microclima favorável para à ocorrência da doença. Em vista de que não existem variedades de feijão com resistência completa a este patógeno, a utilização de fungicidas é um dos principais métodos de controle desta doença. No entanto, seu uso pode aumentar os custos de produção e pode gerar um impacto ecológico negativo.

O estudo da genética de populações de fungos fitopatogêneos é de grande importância para esclarecer a epidemiologia de uma doença e elaborar as estratégias de manejo (6). Neste sentido, *S. sclerotiorum* é um dos fitopatógenos mais amplamente estudados. Atualmente, relatos tanto de estrutura populacional clonal (7–12) como recombinante (13–18) têm sido apresentados ao redor do mundo. De acordo com McDonald e Linde (19), patógenos com sistemas de reprodução mistos e que apresentam recombinação têm maior potencial evolutivo. Portanto, o estudo da variabilidade genética e fenotípica de populações de *S. sclerotiorum* no Brasil permitiria construir uma visão mais ampla da biologia populacional do fungo e entender como as estratégias de manejo podem moldar a

estrutura populacional deste patógeno. Por conseguinte, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a variabilidade genética, a sensibilidade a fungicidas e a agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de culturas de feijoeiro em pivô central.

### **1.1. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e o mofo branco**

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence ao filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (20). Este fungo é polífago e um dos mais destrutivos, apresentando uma baixa especificidade de hospedeiros, e pode infetar mais de 400 espécies botânicas com preferência por espécies dicotiledôneas, podendo também infectar monocotiledôneas, como cebola e tulipas (1). Uma vez que este fungo necrotrófico tem uma ampla gama de hospedeiras, não existe um sintoma comum entre todas as plantas. Devido à diversidade de sintomas, existem mais de 60 nomes na literatura para caracterizar a doença (21).

Este fungo produz estruturas macroscópicas e irregulares de cor preta denominadas esclerócios. Estas estruturas podem permanecer viáveis no solo por longos períodos de tempo (22). Dependendo das condições ambientais os esclerócios podem germinar miceliogênicamente ou carpogênicamente. No entanto a germinação carpogênica que resulta na formação de apotécio, estrutura responsável pela produção dos ascósporos, é a principal forma de estabelecimento da doença (23). As perdas geradas em cultivos de leguminosas estão representadas pela redução no tamanho e na produção de sementes, devido à substituição destas por esclerócios nas vagens (24). Em frutos e vagens as perdas devem-se tanto à decomposição na lavoura como à decomposição durante o armazenamento (25).

Em culturas de feijoeiro comum as perdas potenciais geradas pelo mofo branco podem chegar até 90% (3). Os sintomas desta doença geralmente aparecem nas culturas de feijoeiro logo após a floração, em reboleiras com alta densidade de plantas. Iniciando-se com a infecção das pétalas, com o progresso da doença, observam-se manchas encharcadas em folhas, caules e vagens para posteriormente chegar numa massa de crescimento micelial que cobre os tecidos. Finalmente os esclerócios são formados dentro dos tecidos infectados tornando-os quebradiços (figura 1). O desenvolvimento e a dispersão do mofo branco são altamente afetados

pelas condições ambientais e as práticas agrônômicas (26). Desde os anos 80 com a implementação do sistema de irrigação por pivô central, o mofo branco tem sido o fator limitante mais significativo na produção de feijão no cerrado brasileiro (5).



Figura 1. Mofo branco no feijoeiro. (A) Apotécio. (B) Esclerócio. (C) e (D) Vagens afetadas pela doença. Fonte: JEM Análise Agrícola.

### 1.1.1. Ciclo de vida e estruturas reprodutivas

Dentro do gênero *Sclerotinia* existem três espécies fitopatogênicas de grande importância econômica: *S. sclerotiorum*, *S. minor* e *S. trifoliorum*. Embora muitos autores (27–29) reconhecessem as três espécies, Purdy (30) concluiu que não existiam evidências suficientes para manter a nomenclatura específica pelo que sugeriu agrupá-las numa única espécie, *S. sclerotiorum*. Em trabalhos posteriores, o reconhecimento das três espécies foi proposto usando um maior número de caracteres (31–33). Neste grupo, *S. trifoliorum* é a única espécie que apresenta reprodução sexual por heterotalismo, enquanto que as outras duas, *S. sclerotiorum* e *S. minor*, são homotáticas.

Em *S. sclerotiorum* a reprodução sexual por autofecundação é a responsável pela formação do apotécio. A formação de apotécio é característica da classe Discomicetes (34). Embora a germinação carpogênica seja a condição inicial para a formação de apotécios e ascósporos, devem-se considerar como processos diferenciados. A germinação carpogênica se refere à formação de estipes a partir do esclerócio, ao passo que a formação de apotécio se refere à diferenciação e expansão da ponta do estipe para produzir o ascocarpo, onde eventualmente se formarão os ascos e os ascósporos. Os ascósporos são os únicos esporos infecciosos e a principal fonte de inóculo em *S. sclerotiorum*, sendo assim, de grande importância na epidemiologia das doenças provocadas por este patógeno (35).

Diferentes condições ambientais podem afetar a germinação carpogênica e a formação de apotécios, entre elas estão a temperatura do solo, a umidade, a temperatura de produção do esclerócio e o tempo de “pré- condicionamento”. Phillips (36) ressaltou que os esclerócios requerem um período de condicionamento para conseguir germinar carpogênicamente ao máximo da sua capacidade. Dillard *et al.* (37) estudaram a germinação de esclerócios durante diferentes períodos de incubação e a diferentes temperaturas, encontrando uma maior proporção de germinação carpogênica ao aumentar o tempo de condicionamento (entre 4 e 8 semanas) sob temperaturas de 8 e 16°C. Além disso, também reportaram correlação positiva entre o aumento no número e proporção de germinação e o tamanho do esclerócio.

Matheron e Porchas (38) avaliaram os efeitos da temperatura, umidade e tempo no solo, além das interações entre eles, encontrando em todos os casos efeitos significativos. Em avaliações em campo encontraram diferenças no efeito tanto na umidade e na profundidade do solo em que o esclerócio foi encontrado, como na interação entre os dois fatores. Por outro lado, quando os esclerócios foram avaliados em solos irrigados mantidos a diferentes temperaturas, a germinação foi significativamente menor em temperaturas acima de 36°C. Nepal e Rio-Mendoza (39) observaram uma proporção maior de germinação carpogênica em esclerócios com um nível elevado de saturação de água, concordando com as observações de germinação em campo. Além disso, indicaram que a germinação carpogênica em

solos com baixa umidade pode ser explicada pela capacidade dos esclerócios em manter a saturação de água mesmo em condições adversas.

Schwartz e Steadman (40) reportaram a liberação contínua de ascósporos num intervalo de 2-17 dias, com uma faixa de produção máxima de três dias entre os dias 4 e 9 após o início da liberação dos ascósporos pelos apotécios. Em termos de inóculo, observaram que um único apotécio poderia liberar em média  $2,32 \times 10^6$  ascósporos durante nove dias, estimando um potencial de produção de  $2,3 \times 10^8$  por esclerócio. A liberação de ascósporos ocorre quando um asco maduro é submetido a uma leve diminuição de umidade, descarregando-os no ar a mais de 1 cm de distância do apotécio. Com isto, os ascósporos conseguem escapar à capa superficial de ar perto do solo alcançando porções aéreas mais turbulentas que facilitam sua dispersão (41).

Em relação à sobrevivência dos ascósporos após a liberação, tem-se sugerido que acima de 20°C a mortalidade aumenta significativamente com o aumento da umidade relativa. Além disso, uma exposição a temperaturas maiores que 25°C mascara qualquer efeito da umidade relativa, dado que estas temperaturas promovem rapidamente a mortalidade dos ascósporos (42). Clarkson *et al.* (43) observaram uma liberação contínua de ascósporos em condições de luz ou escuridão contínuas, confirmando que a liberação de ascósporos não está limitada ao foto-período. Além disso, estes autores enfatizaram que durante as horas de luz podem-se encontrar condições de baixa umidade que estimula a liberação de ascósporos. Somado a isso, eles observaram que embora ao longo das etapas iniciais de liberação de ascósporos a umidade não foi um fator influente, após 3 dias de liberação os apotécios em condições de baixa umidade experimentaram uma redução na média de liberação de ascósporos.

No momento que o ascósporo chega à planta, sua capacidade infecciosa depende de uma fonte externa de nutrientes que pode estar representada por tecido vegetal em senescência ou por flores, a partir dos quais o fungo consegue colonizar regiões sadias na planta. Além disso, também é necessária uma alta umidade no tecido colonizado por um período não inferior a 16 horas. Por conseguinte, o aparecimento de sintomas na lavoura ocorre principalmente após a floração, no entanto ocasionalmente podem-se encontrar plantas com sintomas antes da floração. A

partir da colonização completa de flores maduras, o crescimento micelial ao longo da planta facilita a infecção de outras plantas por contato direto com folhas, caules ou vagens (44).

Há vários mecanismos de entrada do fungo na planta: por degradação da cutícula e da epiderme mediante enzimas, pela penetração direta por pressão mecânica, pelo crescimento de hifas através dos estômatos, ou uma combinação dos mesmos (35). O primeiro modo de penetração tem sido descrito amplamente, e os resultados demonstram que é o mecanismo de entrada mais comum. Com isso, para conseguir infectar tecido sadio o fungo precisa da formação de apressórios, que são estruturas de complexidade variável produzidas em resposta a um estímulo por contato, que permitem a penetração por forças hidrodinâmicas (45). A atividade de enzimas que degradam a parede vegetal e de metabólitos que atuam como toxinas é um dos focos de estudo para entender os mecanismos de infecção. As pectinases, glucanases, glicosidases, celulases, xilanases, cutinases, além do ácido oxálico têm sido relatados como os fatores de maior contribuição da infecção (46,47).

De forma geral, durante o processo de invasão, o fungo secreta ácido oxálico que se acumula no tecido infectado, diminuindo o pH extracelular (entre 4 -5), fenômeno que potencializa a atividade das enzimas degradadoras de parede celular. Por outro lado, o ácido oxálico também atua como quelante de íons  $\text{Ca}^{2+}$  facilitando a atividade hidrolítica das poligalactorunases. Desta maneira o fungo consegue destruir a barreira mecânica imposta pela planta, além de obter substratos para seu metabolismo oxidativo (48). Portanto este ácido dicarboxílico tem um caráter multifuncional no processo de infecção, contribuindo em numerosos processos fisiológicos que facilitam a colonização do fungo na planta hospedeira (49). Recentemente, Liang *et al.* (50) comparando cepas selvagens, mutantes deficientes na produção de ácido oxálico e mutantes  $\Delta ss-oah1$  (o gene *SS-oah1* está envolvido na biosíntese de ácido oxálico) concluíram que, embora a falta de acumulação de ácido oxálico durante o processo de infecção não impeça a formação de lesões primárias, impede a expansão da lesão e a subsequente colonização da hospedeira. Este relato reafirma a visão de que a interação entre *S. sclerotiorum* e a hospedeira envolve uma regulação dinâmica da acumulação de ácido oxálico, no entanto

também sugere a ação de outros fatores de virulência independentes do ácido oxálico que podem contribuir na patogenicidade deste fungo.

Hegedus e Rimer (48) propuseram que os processos acima referidos poderiam ser separados em duas fases distintas: a primeira denominada de saprofítico-oportunista, que enquadra a germinação dos ascósporos no tecido senescente e a penetração do hospedeiro por forças mecânicas e ação enzimática. E a segunda, fase patogênica, que envolve a produção de ácido oxálico, poligalacturonases e proteases que permitem a degradação da parede celular e a necrose do tecido vegetal. Continuando com esta proposta, após estas duas fases, há uma fase saprofítico-necrotrófica na qual os esclerócios são produzidos tanto na superfície da planta, quanto no interior de caules e vagens. Subsequentemente, é com a formação destas estruturas que o ciclo da doença se completa. Entretanto, a crescente disponibilidade de dados genômicos, juntamente com evidência experimental sugere que para algumas espécies de fungos fitopatogêneos a atual classificação de estilos de vida não descreve com precisão as interações fungo-hospedeira ao longo do processo de infecção (51). Recentemente, Kabbage *et al.* (49) sugeriram que o comportamento biotrófico e necrotrófico não são eventos espacialmente e temporariamente discretos. Esta visão considera a possibilidade de que diferentes setores do fungo ao longo do processo de infecção exibam tanto padrões de estilo de vida biotrófico como padrões de estilo de vida necrotrófico. Esta nova abordagem propõe padronizar uma análise de curva dano-resposta para estudar a interação patógeno-hospedeira para espécies com uma combinação ou com diferentes estilos de vida, como é o caso de *S. sclerotiorum*.

Dentro do ciclo de vida do patógeno, os esclerócios funcionam como estruturas de resistência capazes de se manterem viáveis em condições ambientais adversas, e ao longo do tempo por até 5 anos ou por até 10 anos em condições favoráveis (52). O esclerócio é um agregado de hifas composto por uma capa externa constituída de várias células melanizadas; e uma porção interna, denominada medula, embebida numa matriz fibrilar formada por carboidratos e proteínas (53). Durante o desenvolvimento dos esclerócios podem-se distinguir três etapas: a inicial, que envolve a formação de esclerócios primordiais sobre o micélio; a de crescimento, onde o esclerócio primordial rapidamente se converte numa massa compacta de

hifas e alcança seu tamanho máximo; e a maturação, onde o crescimento do esclerócio em formação se detém e dá início a uma série de alterações internas entre as que destacam a desidratação e a melanização (54). A principal característica da fase de crescimento é um movimento rápido e constante de nutrientes, especialmente a glicose, em direção ao esclerócio primordial. Este movimento está contra um gradiente, pelo que a polaridade do movimento deve ser mantida por uma alta taxa metabólica (55).

O desenvolvimento dos esclerócios é influenciado por múltiplos fatores ambientais e nutricionais. Testes em meio de cultura têm mostrado que o pH afeta significativamente a formação de esclerócios, sendo inibida em pH alcalino, além disso, o acúmulo progressivo de ácido oxálico pelo fungo propicia um ambiente favorável para a produção dos esclerócios. Conseqüentemente, tem sido verificado que isolados mutantes incapazes de produzir ácido oxálico não conseguiram produzir esclerócios (20). Rollins e Dickman (56) encontraram que o AMPc desempenha um papel importante na transição inicial entre o crescimento micelial e a formação de esclerócios, demonstrando que o aumento nos níveis de AMPc endógeno e exógeno inibe a esclerogênese.

Uma vez que o esclerócio primordial se forma, a etapa de crescimento até alcançar o tamanho máximo ocorre num período de tempo curto. Os materiais acumulados para o desenvolvimento do esclerócio são principalmente compostos de carbono. Somado a isso, a alanina, a serina, e os ácidos aspártico e glutâmico, têm sido reportadas como as fontes de nitrogênio mais favoráveis para a produção dos esclerócios (57). Ao longo do crescimento pequenas gotas, que incrementam seu tamanho gradualmente, são exudadas na superfície do esclerócio em desenvolvimento. Estas gotas, comumente chamadas de exsudados, estão constituídas por sais, carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas solúveis; além de algumas enzimas como fenoloxidasas, peroxidases, catalases e glicosidasas (35). No esclerócio maduro as principais substâncias estruturais e de armazenamento são os glicanos, no entanto também destaca a presença de outros polissacarídeos como a quitina e glicogênio. Os polissacarídeos de baixo peso presentes em maior proporção são a trealose e o manitol, sendo a glicose e a

frutose os monossacarídeos mais frequentes. A formação de outros tipos de sacarídeos geralmente é dependente das fontes de carbono no meio (58).

Múltiplos fatores podem afetar a formação de esclerócios tanto em condições *in vitro* como *in vivo*. Em meio de cultura os esclerócios podem-se desenvolver num amplo espectro de temperaturas, tendo uma tendência para a formação de esclerócios maiores e menores, a baixas e altas temperaturas respectivamente. Importante notar que a temperatura ótima para a produção de esclerócios difere da temperatura ótima para o crescimento micelial, o que reafirma a ideia de que estas estruturas são formadas em resposta a condições desfavoráveis para o crescimento micelial. Por outro lado, diversos estudos têm relatado que a produção de esclerócios independe da luz ou do escuro, entretanto aqueles desenvolvidos sob ausência de luz frequentemente são maiores. No entanto, a incidência de luz tende a aumentar o número de esclerócios, só que este incremento em número reflete numa diminuição no tamanho individual (59).

Há evidência de que a formação de esclerócios em *S. sclerotiorum* é afetada pela disponibilidade de compostos orgânicos que possam ser usados como fontes de carbono, além disso, a presença de fontes de nitrogênio tanto orgânicas como inorgânicas e a relação carbono/nitrogênio também são fatores influentes neste processo. Somado a isto, a disponibilidade dos macronutrientes fósforo, potássio, magnésio e enxofre é indispensável para o crescimento e a formação dos esclerócios (60).

Em termos de sobrevivência no solo, as relações de micoparasitismo e antagonismo são as mais importantes (35). Existem relatos de um grande número de espécies estabelecendo este tipo de relações com esclerócios de *S. sclerotiorum*, destacando-se *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum* e *Trichoderma* spp (52,61,62).

A supressão da patogênese pode ocorrer de várias formas: parasitismo, predação, competição por nutrientes e espaço, obstrução mecânica e produção de metabólitos tóxicos e/ou inibitórios (35). Trabalhos indicam que *C. minitans* é o antagonista mais eficaz, parasitando de forma mais efetiva os esclerócios produzidos sobre ou no interior da raiz, em relação àqueles formados no caule (63,64).

Adams (65) observou uma elevada atividade antagonista das espécies *S. sclerotivorum* e *Trichoderma oligocladum*, as quais conseguiram colonizar os esclerócios através da produção de macroconídios. Neste caso os esclerócios infectados serviram como fonte alimentícia, protegida do efeito de outros microrganismos, facilitando a colonização em massa do solo. Por outro lado, Whipps e Budge (61) observaram uma maior taxa de infecção das espécies *Gliocladium virens* e *C. minitans*, em um estudo que comparou o efeito antagonista de 9 espécies de fungos. Teo *et al.* (66) encontraram inibição completa da germinação de esclerócios em solos inoculados com *C. minitans*, no entanto, os testes feitos usando *S. sclerotivorum* indicaram uma atividade antagônica menor à referida em outros estudos.

Finalmente, pode-se concluir que o ciclo de vida de *S. sclerotivorum* ocorre ao longo de três etapas: dormência, saprofitismo e parasitismo. A maior parte do ciclo de vida deste patógeno se dá na etapa de dormência na forma de esclerócio, sendo o momento de mais fácil acesso para as estratégias de controle mais comuns. No entanto o período de maior vulnerabilidade acontece durante a fase saprofítica, na germinação carpogênica ou miceliogênica, dada a alta dependência de fatores ambientais e condições do hospedeiro. Posterior a esta etapa, o fungo consegue estabelecer uma relação de parasitismo com a planta hospedeira. O sucesso desta interação pode ser explicado com base em duas estratégias-chave: primeiro, pela habilidade do fungo para continuar a produção de esclerócios em tecido vegetal morto, o que aumenta o inóculo no solo; e, segundo, pela sincronia do fungo com a fenologia do hospedeiro, o que lhe permite desenvolver apotécios e ascósporos na etapa de maior vulnerabilidade do hospedeiro (58).

### **1.1.2. Lócus *MAT***

A reprodução sexual em ascomicetos está controlada principalmente por dois idiomorfos *MAT1-1* e *MAT1-2* do lócus *MAT*, e o sistema de acasalamento pode ser homotático ou heterotático (67). Em espécies heterotáticas cada isolado carrega um dos isomorfos do lócus *MAT*, portanto isolados carregando o mesmo idiomorfo serão sexualmente incompatíveis enquanto que isolados carregando idiomorfos diferentes (um deles carregando o idiomorfo *MAT1-1* e outro carregando o idiomorfo *MAT1-2*) serão sexualmente compatíveis. Em espécies homotáticas existe uma única versão

do locus *MAT* que geralmente carrega ambos os idiomorfos (68). Este é o caso da espécie *S. sclerotiorum*, em que ambos os idiomorfos estão fusionados em um único locus apresentando quatro genes: *MAT1-1-1*, *MAT1-1-5*, *MAT1-2-1* e *MAT1-2-4* (69).

Chitrampalam *et al.* (70) detectaram uma inversão de 3,6 Kb no locus *MAT* estudando 283 isolados de diferentes hospederias. Esta inversão afetou três dos quatro genes *MAT*: os genes *MAT1-2-1* e *MAT1-2-4* foram invertidos e o gene *MAT1-1-1* foi truncado na extremidade 3'. Os isolados *Inv-* (inversão ausente) e *Inv+* (inversão presente) foram autocompatíveis e a inversão segregou em uma proporção 1:1 a cada segregação meiótica. Recentemente, Chitrampalam e Pryor (71) detectaram esta inversão na espécie estreitamente relacionada *S. minor*. Os isolados *Inv+* em esta espécie apresentaram a inversão de 3,6 Kb no mesmo lugar que os isolados *Inv+* de *S. sclerotiorum* afetando os mesmo três genes.

### 1.1.3. Variabilidade genética e estrutura populacional

A estrutura genética de uma população refere-se à quantidade e distribuição da diversidade genética dentro e entre populações. Existem dois níveis de diversidade genética que contribuem no grau de estruturação de uma população: a diversidade gênica e a genotípica. A primeira faz referência ao número e frequência de alelos para cada locus, e a segunda indica o número e frequência de genótipos multilocus numa população. A história evolutiva das populações determina a sua estrutura genética, sendo que o conhecimento dessa estrutura genética oferece uma visão dentro dos processos evolutivos que moldaram aquela população no passado, e também permite inferir o potencial evolutivo futuro da mesma (19).

Várias técnicas moleculares têm sido usadas para estudar a variabilidade genética de *S. sclerotiorum*. Kohn *et al.* (7) estudaram a variabilidade genética de isolados monospóricos usando três critérios moleculares: o polimorfismo no tamanho da subunidade menor do rRNA mitocondrial, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) em hibridizações por *Southern blot* usando uma sonda do gene da subunidade maior do rRNA mitocondrial e usando uma sonda de DNA nuclear. Este estudo revelou a heterogeneidade entre populações de *S. sclerotiorum* e destacou a importância da combinação de dados fenotípicos com dados moleculares para correlacionar características relacionadas à patogênese com genótipos clonais.

Estudos iniciais da genética de populações de *S. sclerotiorum* revelaram um tipo de estruturação principalmente clonal, com grandes populações compostas por um número pequeno de clones amostrados em uma alta frequência (9,10,72).

Estudos subsequentes, baseados em filogenias de clones inferidas a partir de sequências de DNA de quatro regiões (o espaçador intergênico do DNA ribossomal, um fragmento do gene que codifica o fator de alongação 1 $\alpha$ , um fragmento de DNA nuclear desconhecido de 700 pb e um fragmento do gene da calmodulina), sugeriram um tipo de evolução predominantemente clonal sem evidência de troca genética ou recombinação entre genótipos atuais. Adicionalmente, o alto nível de homoplasia obtido nas filogenias baseadas em DNA *fingerprinting*, evidência de intercâmbio e/ou recombinação, foi atribuído à transposição ou excisão de fragmentos de DNA em vez a eventos de recombinação no passado nestes clones, descartando a opção de recombinação na história recente dos clones amostrados (73). No entanto, Carbone e Kohn (74) demonstraram a ocorrência de recombinação em populações agrícolas subtropicais, diferente de populações de regiões temperadas onde não foi detectada. Este fenômeno pode ser explicado por uma taxa de recombinação governada pelo número de gerações meióticas por estação, o qual é menor em áreas temperadas, uma geração por estação, quando comparado com as duas ou três gerações em zonas subtropicais.

Sirjusingh e Konh (75) caracterizaram 23 regiões microssatélites em *S. sclerotiorum* usando bibliotecas genômicas enriquecidas com 6 motivos (TC)<sub>10</sub>, (TG)<sub>10</sub>, (TGTA)<sub>6</sub>TG, CT(ATCT)<sub>6</sub>, CT(CCT)<sub>5</sub> e (CAC)<sub>5</sub>CA. Estes 23 marcadores microssatélites permitiram diferenciar isolados que apresentaram o mesmo haplótipo baseado em DNA *fingerprinting* ou em sequenciamento de DNA. Neste sentido, este tipo de marcador é de extensa utilização em estudos de estruturação genética das populações, principalmente por sua ampla distribuição no genoma de organismos eucariotos. Algumas das vantagens dos marcadores microssatélites em relação a outros tipos de marcadores são: alto grau de polimorfismo, alta especificidade, reprodutibilidade e codominância (76).

Apesar da relatada estrutura clonal e da natureza homotática da espécie, estudos de associação aleatória de marcadores independentes têm apontado a existência de cruzamentos, já que tal associação não poderia ser explicada exclusivamente pela

migração e a mutação. Atallah *et al.* (13) sugeriram que o potencial cruzamento poderia ser explicado pela possibilidade dos microconídios atuarem como espermátides, como têm sido reportado em outros gêneros estreitamente relacionados. Por outro lado, eles propuseram que as condições de cultura poderiam dificultar a detecção de baixos níveis de cruzamento, além de um provável mascaramento pela natureza epidêmica do patógeno, onde a existência de poucos genótipos bem sucedidos numa ampla distribuição geográfica levaria ao desequilíbrio de ligação mesmo na presença de cruzamento. Sexton e Howlett (14), também reportaram populações (três de quatro localidades estudadas) em equilíbrio gamético depois de fazer a correção clonal, apoiando a possível existência de cruzamentos em populações de *S. sclerotiorum*.

Sexton *et al.* (15) também encontraram evidências de cruzamento em populações de *S. sclerotiorum* na Austrália, e demonstraram a co-infecção de uma única planta de canola por múltiplos genótipos de *S. sclerotiorum*, indicando uma possível formação de ascósporos recombinantes a partir de esclerócios formados por diferentes genótipos. Embora Malvaréz *et al.* (77) tenham comprovado a presença dos dois idiomorfos *MAT1-1* e *MAT1-2* do locus *MAT* em isolados de *S. sclerotiorum*, confirmando o homotalismo da espécie, não descartaram a provável recombinação sustentada nos índices de associação esperados para panmixia obtidos em populações da Califórnia.

Por outro lado, apesar de Mert-Türk *et al.* (16) não terem testado o possível cruzamento em populações de canola na Turquia, indicaram que este evento é favorecido pelas condições ambientais além do cultivo de outras espécies hospedeiras na região. Somado a isto, esses autores relataram uma alta variabilidade genética com a maior parte da variação sendo explicada pelas diferenças dentro de populações. Sun *et al.* (78) utilizando RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) também observaram uma alta variabilidade genética em populações provenientes da China, Canadá, Polônia e Eslováquia, atribuindo 51% da variação total às diferenças entre populações e 49% às diferenças dentro de populações. Ekins *et al.* (79) também usaram marcadores RAPD para avaliar a estrutura populacional de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de girassol, encontrando uma menor diferença genética entre populações. Além disso,

corroboraram a ausência de estruturação populacional entre isolados coletados tanto para as lesões das partes aéreas da planta quanto para as lesões de caule, apontando à inexistência de especialização para germinação carpogênica ou miceliogênica dos genótipos amostrados.

Estudos de estrutura populacional em diferentes regiões do Irã usando marcadores microssatélites mostraram alta variabilidade genética e uma evidência indireta de cruzamento, baseada nos testes de associação aleatória de loci independentes (80). Juntamente a isto, estudos de estrutura populacional de *S. sclerotiorum* em feijão irrigado no cerrado Brasileiro, demonstrou uma alta variabilidade genética, o que sugeriu um tipo de reprodução mista. Fatores como a ausência de inverno marcado, a falta de rotação de cultivos, o grande número de culturas hospedeiras, o baixo controle de sementes e um ciclo de vida com ambas as formas de germinação podem explicar a existência destes altos níveis de diversidade genética (17). Outro estudo usando marcadores RAPD demonstrou uma alta variabilidade genética entre isolados coletados de seis regiões do Brasil, sugerindo do mesmo modo um tipo de reprodução mista. Além disso, a análise de agrupamento dos isolados mostrou uma distribuição independente da origem geográfica ou tipo de hospedeira, comprovando a ausência de populações específicas para cada tipo de cultivo e a distribuição restrita dos isolados de acordo com as regiões (81). Entretanto, a diferença dos relatos citados, Lehner *et al.* (12) recentemente reportaram uma estrutura populacional clonal com associação entre grupos de compatibilidade micelial e marcadores microssatélites ao avaliar 118 isolados distribuídos nas cinco principais regiões produtoras de feijão no Estado de Minas Gerais.

Attanayake *et al.* (18) comparando populações da China e dos Estados Unidos, demonstraram a diferenciação genética entre as populações apoiada na ausência de haplótipos e grupos de compatibilidade micelial compartilhados entre as mesmas, presença de um grande número de alelos privados, formação de dois grupos a partir de inferência Bayesiana com correspondência total em relação à origem geográfica e a alta porcentagem de variação genética, explicada pelas diferenças entre populações (37%). Além disso, estas populações foram altamente diferenciadas quando comparadas por várias características fenotípicas. No entanto, as duas apresentaram evidências de cruzamento baseada nas altas taxas de recombinação.

Por outro lado, a comparação de isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de hospedeiras agrícolas e silvestres no Reino Unido indicou uma estrutura populacional clonal, além disto a presença de haplótipos microssatélites comuns entre as duas populações, sugere que os hospedeiros silvestres podem funcionar como fontes de inóculo para as plantas cultivadas (11). Da mesma maneira, Kohn (82) demonstrou que o grau de diferenciação de populações silvestres com agrícolas amostradas na Noruega esteve relacionado com a distância das regiões de alta produção agrícola.

#### **1.1.4. Sensibilidade a fungicidas**

Os fungicidas são importantes ferramentas para o controle das principais doenças de plantas em sistemas intensivos de produção agrícola, sendo usados há mais de 200 anos (83). Eles são importantes ferramentas no esforço de manter saudáveis as culturas garantindo uma alta qualidade do produto. Até a década de 70 a maioria dos fungicidas usados para o controle de fitopatógenos tinha efeitos inibitórios em múltiplos sítios, e apesar do seu uso extensivo os relatos de resistência foram limitados (84). Estes fungicidas atuavam sobre a superfície da planta formando uma capa protetora, no entanto a sua entrada na planta é limitada, e desta forma não são eficientes para controlar infecções estabelecidas e exigem aplicações frequentes para repor o material que pode ser lavado ou para proteção de partes novas de plantas em crescimento. Posteriormente, foram desenvolvidas várias classes de fungicidas com capacidade de penetrar na planta, permitindo erradicar infecções estabelecidas, resistindo os possíveis efeitos de lavagem e conseguindo-se transloucar na planta. Atualmente, são usados para a proteção agrícola em nível mundial, cerca de 150 compostos. Embora o uso de outros tipos de estratégias, como o uso de rotação de culturas ou variedades resistentes, tenham diminuído as perdas geradas por doenças fúngicas, a aplicação de fungicidas continua sendo o tipo predominante de controle nos sistemas agrícolas do mundo inteiro (85).

Com a chegada dos fungicidas sistêmicos, diversos relatos de ineficácia no controle de doenças foram conhecidos, mesmo pouco tempo após serem liberados no mercado. Muito têm sido discutido em relação à definição de resistência, pois é importante introduzir além deste termo outras definições relacionadas à este fenômeno. Quando um potencial composto antifúngico é testado em laboratório,

casa de vegetação e ensaio de campo em diversas regiões e países e verifica-se um controle estável sobre vários tipos de doenças, se reconhece que aqueles patógenos são sensíveis ao composto. No entanto podem-se encontrar patógenos sobre os quais o composto tem um baixo, ou nenhum, efeito, sendo denominados como resistentes naturais ou inerentes. Portanto, dado o uso da palavra resistência em ambos os contextos, na incapacidade do fungicida para controlar patógenos durante os testes de avaliação e na aparição de patógenos que conseguem desenvolver doenças após a liberação comercial e uso frequente do fungicida é relevante o uso do termo resistência adquirida para referir-se ao segundo evento citado. No entanto, as palavras “insensibilidade” e “tolerância” também têm sido usadas neste contexto (86).

A resistência adquirida portanto é um ajuste estável e hereditário de um fungo a um fungicida, resultado de uma única ou de múltiplas mutações gênicas. Tal resistência pode ser conferida mediante vários mecanismos, tais como: a modificação do sítio alvo, que impede a complementaridade com o fungicida; a síntese de uma nova enzima capaz de substituir a enzima alvo do fungicida, a expressão elevada do alvo do fungicida, diminuindo seu efeito inibidor; o efluxo ou redução na entrada do fungicida, ou por clivagem metabólica do fungicida (87).

A partir dos estudos de resistência aos fungicidas ao longo do tempo, têm-se identificado dois tipos de resistência: o primeiro envolve uma grande diferença de comportamento entre os isolados produzindo uma distribuição bimodal de resposta ao fungicida. Neste caso observa-se uma perda súbita e marcada da efetividade do fungicida caracterizada pela presença de patógenos altamente resistentes e sensíveis. Alguns destes casos estiveram relacionados com mutações no gene que codifica o sítio alvo do fungicida. O segundo tipo caracteriza-se por uma diminuição gradual na efetividade do fungicida no controle da doença, encontrando-se respostas intermediárias entre os isolados com uma diminuição na média de inibição do fungicida ao longo do tempo (86).

Para o controle químico do mofo branco no feijoeiro existem 18 produtos comerciais distribuídos em sete ingredientes ativos: fluazinam, iprodiona, tiofanato metílico, procimidona, mancozebe, clorotalonil e cloreto de benzalcônio. Para vários destes compostos existem propostas de mecanismos moleculares que conferem

resistência. No caso dos fungicidas MBC (metil benzimidazol carbamatos) a resistência têm sido associada com mutações pontuais no gene da  $\beta$ -tubulina as quais alteram a sequência de aminoácidos do sítio de união do fungicida. Gossen *et al.* (88) testaram isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de culturas de canola e verificaram resistência a um fungicida benzimidazol (benomyl), obtendo valores de  $EC_{50}$  superiores a 200 ppm. Attanayake *et al.* (18) detectaram isolados resistentes a benomyl na China, os quais apresentaram uma transversão não sinônima no gene da  $\beta$ -tubulina. Em adição a isto, mutações no gene *osmosensor-like histidine kinase* têm sido correlacionadas com resistência a dicarboximidas em *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* (89). Tamura (90) relatou isolados de *Botrytis cinerea* resistentes a fluazinam, no entanto pouco se conhece do mecanismo envolvido na resistência a este fungicida. Algumas pesquisas têm sugerido que mecanismos de detoxificação poderiam conferir resistência a fluazinam (91).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

- Avaliar a variabilidade genética e sensibilidade a fungicidas em isolados de *S. sclerotiorum* provenientes de culturas de feijoeiro em pivô central.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Estimar a variabilidade genética de isolados de *S. sclerotiorum* usando marcadores microssatélites.
- Determinar os grupos de compatibilidade micelial entre isolados de *S. sclerotiorum*
- Avaliar a sensibilidade a três fungicidas em isolados de *S. sclerotiorum*
- Avaliar a agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* usando o teste de folha destacada.
- Determinar a proporção de isolados Inv- e Inv+ para o locus *MAT*.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Áreas amostradas e obtenção de isolados.

Os isolados de *S. sclerotiorum* foram obtidos a partir de esclerócios coletados em plantações de feijoeiro de duas fazendas do município de Paracatú, Minas Gerais e uma fazenda do município de Planaltina, Distrito Federal (Tabela 1, Figura 1; Anexos). Além disso, foram utilizados esclerócios coletados 13 anos atrás em um pivô de uma das fazendas amostradas no município de Paracatú, Minas Gerais. Em cada pivô a amostragem consistiu de transectos de aproximadamente 500 metros com pontos de coleta a cada 30-50 metros.

A desinfestação dos esclerócios foi realizada por imersão em uma solução de etanol 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, em seguida foram lavados com água destilada estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-dextrose-agar) suplementado com tetraciclina (25 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL). As placas foram mantidas em incubadoras BOD a 20°C por 5 a 7 dias. Discos (5 mm) de micélio crescendo ativamente (pontas de hifa) foram repicados para novas placas contendo meio BDA. O micélio cultivado nestas placas foi utilizado para as análises seguintes.

#### 3.2. Preparação de fungicidas

Para os testes de sensibilidade a fungicidas utilizaram-se as formulações comerciais Sumilex®, Frowncide® e Benlate®, as quais contêm os ingredientes ativos procimidona, fluazinam, e benomyl respectivamente. Para cada um dos fungicidas calculou-se a quantidade necessária de produto comercial para obter 10 mL de uma solução estoque à concentração de 1000 ppm de ingrediente ativo, sendo que todas as soluções foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) 100% (Tabela 1). As soluções estoque foram filtradas em filtro de 0,25 µm e armazenadas em alíquotas de 1 mL em tubos de microcentrífuga a -20°C na ausência de luz.

Tabela 1. Quantidade de formulação comercial necessária para obter concentrações finais de 1000 ppm de princípio ativo.

Formulação comercial	Ingrediente ativo	Concentração do ingrediente ativo	Quantidade da formulação comercial	Volume de DMSO
Sumilex®	Procimidona	500g/Kg	20 mg	10 mL
Frowncide®	Fluazinam	500g/L	20 uL	10 mL
Benlate®	Benomyl	500g/Kg	20 mg	10 mL

### 3.3. Testes para avaliar a sensibilidade a fungicidas

#### 3.3.1. Teste em placa

Para obter as placas de BDA com a concentração de fungicida desejada, foram acrescentados os volumes requeridos das soluções estoque no meio BDA autoclavado e deixado em repouso a temperatura ambiente até atingir aproximadamente uma temperatura de 55°C. Para todos os tratamentos testados o volume de DMSO foi corrigido para manter uma concentração final de 1% incluindo o controle. Todas as placas de Petri (90 mm de diâmetro) utilizadas nos testes receberam 15 mL de meio BDA com a concentração de fungicida a ser testada. As placas foram inoculadas com um disco de 5 mm de diâmetro de micélio crescido por 3 dias em meio BDA (ponta de hifa), e posteriormente incubadas a 20°C em BOD na ausência de luz. Todas as concentrações foram avaliadas em triplicata incluindo a testemunha que contou apenas do meio BDA com uma concentração de 1% de DMSO. A porcentagem de inibição do crescimento (%I) foi calculada no momento em que a testemunha atingiu a borda da placa utilizando a seguinte fórmula:

$$\%I = \left\{ \frac{(\text{crescimento testemunha}) - (\text{crescimento tratamento})}{\text{crescimento testemunha}} \right\} \times 100$$

Os valores de crescimento foram obtidos para cada placa calculando a média de quatro medições do crescimento radial em sentidos ortogonais.

### **3.3.2. Teste do FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*)**

Para obter as concentrações de cada fungicida a serem testadas foi acrescentado o volume necessário de estoque de cada ingrediente ativo em meio YBA (extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 1% e acetato de sódio 1%). O teste foi conduzido em placa de cultura de tecido de 24 poços. Em cada poço um disco de 5 mm de diâmetro de micélio crescendo ativamente, proveniente de uma placa com meio BDA incubada por 2 dias a 20°C, foi colocado e em seguida foram vertidos 500 µL do tratamento correspondente. Todas as concentrações foram avaliadas em triplicata incluindo a testemunha. As placas foram vedadas e incubadas a 20°C na ausência de luz durante 9 dias. Após os 9 dias de incubação, o crescimento foi avaliado visualmente usando uma escala de notas: 0, sem crescimento; 1, crescimento fraco; 3, micélio cobrindo 30% do poço; 6, micélio cobrindo 60% do poço; e 10, micélio cobrindo 100% do poço.

### **3.3.3. Teste de viabilidade celular baseado no alamarBlue®.**

O teste de viabilidade celular foi conduzido em microplaca de 96 poços. Em cada um dos poços colocou-se um disco de 2 mm de diâmetro de micélio crescendo ativamente, após acrescentou-se 115 µL de meio mínimo (2g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,5 g/L extrato de levedura, 3g/L ácido D-málico e 1g/L NaOH) com a correspondente concentração de fungicida a ser testada. Todas as concentrações foram avaliadas em triplicata e para cada placa incluíram-se pelo menos 4 repetições para a testemunha (fungo crescendo na ausência de fungicida). Em seguida, as placas foram incubadas a 20°C em BOD com ausência de luz por 24 horas. Após 24 horas adicionou-se 35 µL de tampão fosfato de potássio 600 mM pH 7,4 e 15 µL de alamarBlue® a cada um dos poços. A placa foi incubada novamente a 20°C em BOD com ausência de luz por 6-8 horas. Terminado o período de incubação transferiu-se 100 µL de cada poço para uma nova placa de 96 poços e realizou-se leituras de absorvância da placa a 570 e 600 nm num espectrofotômetro para microplacas epoch®. Todas as placas incluíram leituras do alamarBlue® na forma 100% oxidada (controle negativo) que consistiu da mistura de 115 µL de meio mínimo, 35 µL de tampão fosfato de potássio 600 mM pH 7,4 e 15 µL de Alamar Blue®; sem a presença do fungo. As leituras nos dois comprimentos de onda foram

usadas para calcular a porcentagem de redução do alamarBlue® e a porcentagem de inibição dos tratamentos. Para o primeiro caso foi usada a seguinte fórmula:

$$\left[ \frac{[(\epsilon_{ox})\lambda_{2A}\lambda_1] - [(\epsilon_{ox})\lambda_1A\lambda_2]}{[(\epsilon_{red})\lambda_1A'\lambda_2] - [(\epsilon_{red})\lambda_{2A}'\lambda_1]} \right] \times 100$$

Para calcular a porcentagem de inibição dos tratamentos utilizou-se a expressão:

$$100 - \left[ \frac{[(\epsilon_{ox})\lambda_{2A}\lambda_1] - [(\epsilon_{ox})\lambda_1A\lambda_2]}{[(\epsilon_{ox})\lambda_{2A}^\circ\lambda_1] - [(\epsilon_{ox})\lambda_1A^\circ\lambda_2]} \right] \times 100$$

Tendo que:

$(\epsilon_{ox})\lambda_2$  = coeficiente de extinção molar da forma oxidada do alamarBlue® a 600nm  
= 117,216

$(\epsilon_{ox})\lambda_1$  = coeficiente de extinção molar da forma oxidada do alamarBlue® a 570nm  
= 80,586

$(\epsilon_{red})\lambda_1$  = coeficiente de extinção molar da forma reduzida do alamarBlue® a 570 nm  
= 155,677

$(\epsilon_{red})\lambda_2$  = coeficiente de extinção molar da forma reduzida do alamarBlue® a 600 nm  
= 14,652

A  $\lambda_1$  = absorbância do tratamento a 570 nm

A  $\lambda_2$  = absorbância do tratamento a 600 nm

A'  $\lambda_1$  = absorbância do controle negativo a 570 nm

A'  $\lambda_2$  = absorbância do controle negativo a 600 nm

A°  $\lambda_1$  = absorbância do controle positivo a 570 nm

A°  $\lambda_2$  = absorbância do controle positivo a 600 nm

### **3.4. Avaliação do crescimento em folha destacada**

Para o teste de folha destacada utilizaram-se folhas de plantas de feijoeiro (BRS-Pérola) de 6 a 8 semanas de idade. O teste foi conduzido em placas de Petri de 15 cm contendo papel filtro embebido em 3 mL de água destilada estéril para manter a umidade. Cada uma das folhas foi inoculada com um único disco de 5 mm de diâmetro de micélio crescendo ativamente. Posteriormente incubou-se a 20°C com um foto-período de 12 horas. As folhas foram fotografadas com 48 horas após a inoculação e a área de lesão foliar foi mensurada usando o software ImageJ (92).

### **3.5. Estabelecimento de grupos de compatibilidade micelial**

Os grupos de compatibilidade micelial entre os isolados foram determinados pelo método descrito por Schafer e Kohn (93). A formação de uma linha azul na região de encontro entre os isolados foi considerada uma reação incompatível. As comparações foram feitas em placas de Petri com meio BDA contendo quatro discos de micélio, dois representaram isolados diferentes enquanto que dois representaram um mesmo isolado (controle positivo de compatibilidade). Primeiramente, realizaram-se todas as comparações possíveis entre os isolados de cada um dos pontos de coleta (tabela 1, anexos) para estabelecer os grupos de compatibilidade micelial. Em seguida, todos os grupos de compatibilidade micelial estabelecidos por pontos de coleta foram confrontados para obter os grupos de compatibilidade micelial presentes nos 79 isolados.

### **3.6. Extração de DNA**

A biomassa fúngica para a extração de DNA genômico foi obtida por crescimento em meio mínimo (2g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g/L extrato de levedura, 3g/L ácido D-málico e 1g/L NaOH). Para cada isolado 5 discos de 5 mm de diâmetro de micélio crescendo ativamente, proveniente de placas de BDA com 3-4 dias, foram inoculados em erlenmeyers contendo 50 mL de meio mínimo suplementado com 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cloranfenicol. Para cada isolado dois inóculos independentes foram considerados. Os erlenmeyers foram incubados a 20°C sobre agitação a 120 rpm por 5 a 7 dias. Após o período de incubação o micélio foi lavado e armazenado a -80°C.

Para a obtenção do DNA genômico dos isolados foram utilizados aproximadamente 0,5 g de micélio congelado, seguindo o protocolo descrito por Zolan e Pukilla (94). A qualidade do DNA foi observada em gel de agarose a 1% (96) e a concentração e pureza foram avaliadas por espectrofotometria usando um Nanodrop®. Para cada isolado foi feita uma diluição de trabalho de 5 ng/μL.

### **3.7. Genotipagem baseada em marcadores microssatélites**

Os 79 isolados de *S. sclerotiorum* foram genotipados usando 14 loci microssatélites (Tabela 2, Anexos) descritos por Sijusingh e Kohn (75). O primer forward de cada um dos 14 pares de primers usados foram marcados com algum dos fluoróforos FAM, NED ou VIC. As reações de PCR foram conduzidas com o kit de amplificação Type-it Microsatellite PCR Kit® da Qiagen®, num volume final de 6 μL representado por: 0.5 μL de primer R (2μM), 0.5 μL de primer F (2μM), 1 μL de água mili-Q estéril, 3 μL do Type-it Multiplex PCR Master Mix (2X) e 10 ng de DNA. As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados para cada locus microssatélite foram separados por eletroforese capilar usando 4 multiplex em um analisador genético ABI 3500 Applied Biosystems® usando um marcador interno de 500 pb (ROX). Posteriormente o tamanho dos amplicons foi determinado usando o software GeneMapper®.

### **3.8. Análise de variabilidade genética**

Parâmetros para mensurar a diversidade gênica: a frequência alélica por locus, a heterozigosidade esperada e o número de loci polimórficos por população; e a diversidade genotípica: número de haplótipos por população, o índice G de Stoddart e Taylor e a riqueza haplotípica; foram estimados usando Arlequin ver 3.5 (95). O desequilíbrio de ligação foi estimado usando os índices de associação multilocus ( $I_A$ ) e de associação multilocus sem dependência do número de loci ( $r_d$ ). Para avaliar a significância destas estimativas foi gerada uma distribuição de frequências baseada na hipótese nula de cruzamentos ao acaso a partir de 10000 randomizações usando o pacote poppr do software R (96). O grau de diferenciação populacional foi estimado usando a análise molecular de variância (AMOVA), e a significância do phi

foi testada com base na hipótese nula de não diferenciação entre as quatro populações a partir de 1000 permutações utilizando o software Arlequin ver 3.5 (95). Este software também foi utilizado para avaliar o grau de diferenciação populacional par a par baseado no phi com 1000 permutações.

A distância genética de Bruvo foi usada para construir uma rede de espaçamento mínimo (MSN). A análise discriminante de componentes principais (DAPC) (97) foi usada para identificar grupos geneticamente homogêneos entre os 79 isolados. O intervalo de grupos a serem testados variou de 1 a 15 e o número de grupos mais provável foi determinado baseado no critério de informação Bayesiano (BIC). Ambas as análises foram realizadas usando o software R (98).

### **3.9. Detecção dos alelos *Inv+* e *Inv-* do locus *MAT***

Para estimar a proporção de alelos *Inv+* e *Inv-* do locus *MAT* nas populações de *S. sclerotiorum* foram utilizados dois pares de primers: o par MAT1-1/MAT1-1R (77) e o par TypellF/TypellR (70) os quais amplificam os alelos *Inv+* e *Inv-* respectivamente. As amplificações foram realizadas de acordo com Malvarez *et al.* (77) e Chitrampalam *et al.* (70). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Nos casos em que ambos os alelos foram detectados em um único isolado, amplificações com os dois pares de primers foram repetidas. O tamanho dos alelos foi estimado usando um marcador de massa molecular de 100 pb.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Capítulo 1: A reproducible and fast microplate method for monitoring fungicide sensitivity in *Sclerotinia sclerotiorum*.

#### 4.1.1. Abstract

The early detection of fungicide resistance in *S. sclerotiorum* populations is crucial to drive rational chemical strategies. We propose a microplate cell viability assay, based on alamarBlue® dye, using mycelial inoculum. In conclusion, the method is a simple, fast, and accurate tool for fungicide sensitivity assessment.

**Keywords:** *Sclerotinia sclerotiorum*, alamarBlue® assay, fungicide sensitivity, mycelial inoculum

## **4.2. Capítulo 2: Genetic variability and fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from common bean irrigated by central-pivot.**

### **4.2.1. Abstract**

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary is an ubiquitous phytopathogenic fungus which has a low specificity of host, affecting more than 400 species around the world (1). This pathogen is the causal agent of white mold in common bean (*Phaseolus vulgaris*), the most important grain legume for human consumption (2,3). Brazil is the biggest common bean producer and consumer in the world (4). About 15% of the *Phaseolus* bean crop in Brazil is produced during the irrigated winter crop in the Cerrado region (5). Since the 1980's, and with the implementation of the center-pivot irrigation system, *S. sclerotiorum* has been the most significant limiting factor in the irrigated bean yield (6).

The aim of this study was to assess the genetic variability, fungicide sensitivity, aggressiveness and to determine the proportion of *MAT* alleles of *S. sclerotiorum* isolates from 3 sampling locations from common bean irrigated by central-pivot. Besides this, the sampling of *S. sclerotiorum* isolates from the same sampling location, in two widely separated growing seasons, allowed us to compare whether there were changes in fungicide sensitivity, aggressiveness, genetic variability and genetic differentiation between isolates collected 13 years apart. To carry out these comparisons, we estimated population genetic parameters, percentage of cell viability in the presence of three fungicides in three concentrations and the average leaf lesion area.

## 5. Conclusões

Uma vez que a aplicação de fungicidas é uma das principais práticas de controle do mofo branco do feijoeiro, é de importância dispor de uma técnica confiável e rápida para avaliar a sensibilidade a fungicidas em isolados de campo com o objetivo de monitorar o surgimento de insensibilidade. Neste sentido, a adaptação da técnica de viabilidade celular baseada no alamarBlue®, para medir a sensibilidade a fungicidas sobre o crescimento micelial, apresentada neste trabalho mostrou resultados reprodutíveis entre experimentos independentes para três ingredientes ativos (procimidona, fluazinam e benomil) de três classes diferentes. Além disso, mostrou uma maior capacidade de detecção de respostas significativamente diferentes em sete concentrações dos três fungicidas quando comparada com a técnica mais amplamente utilizada, a inibição do crescimento micelial. A adaptação do ensaio do alamarBlue® apresentada neste trabalho exibe múltiplas vantagens em relação a outras técnicas: maior sensibilidade na avaliação do efeito dos fungicidas por medir taxa metabólica durante o crescimento micelial, a rápida obtenção de micélio quando comparada com a produção de apotécio para avaliar a taxa metabólica em ascósporos, a fácil implementação a larga escala por ser um teste desenvolvido em microplaca de 96 poços.

A avaliação de sensibilidade a fungicidas, teste de agressividade, estabelecimento de grupos de compatibilidade micelial, análise da variabilidade genética e a determinação da proporção de isolados *Inv+*, *Inv-* e *Inv+/Inv-* ao locus *MAT* permitiu concluir: (1) a comparação da sensibilidade a fungicidas entre populações obtidas em duas épocas diferentes mostrou uma diminuição significativa na sensibilidade aos fungicidas fluzinam e procimidona; no entanto não foram detectados isolados insensíveis a nenhum dos fungicidas testados na população de 2013. (2) A baixa sensibilidade ao benomyl detectada na população de Planaltina indica que, uma vez adquirida, a resistência a este fungicida pode se manter na população de *Sclerotinia sclerotiorum* ao longo do tempo e na ausência da aplicação do ingrediente ativo. (3) Embora a hipótese de acasalamento aleatório ter sido rejeitada nas quatro populações, sugerindo reprodução predominantemente clonal, não foi observada associação entre dois marcadores independentes, haplótipos SSR e MCG's. (4) As quatro populações apresentaram predomínio de isolados *Inv+* e a população de

Planaltina mostrou uma alta proporção de isolados *Inv+*/*Inv-*. (5) A rejeição da hipótese de distribuição 1:1 dos alelos *Inv+* e *Inv-* do locus *MAT* nas quatro populações sugere que os isolados amostrados não provêm predominantemente da germinação carpogênica.

## 6. Perspectivas

- Construir distribuições de frequência de  $IC_{50}$  de populações amostradas em épocas diferentes para verificar as possíveis mudanças na sensibilidade a fungicidas.
- Fazer comparações entre populações provenientes de diferentes plantas hospedeiras para verificar: o grau de estruturação das populações em relação à hospedeira, testar a hipótese de acasalamento aleatório entre populações dentro da mesma área, estabelecer as diferenças na proporção de isolados *Inv+* e *Inv-* para inferir a forma predominante de germinação em relação à hospedeira.
- Avaliação da variabilidade genética de populações de *S. sclerotiorum* usando marcadores SNP's com o objetivo de acessar informação de uma proporção maior do genoma e estimar a queda do desequilíbrio de ligação em relação à distância entre marcadores.

## Referências bibliográficas

1. Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1994. 93–108.
2. Rollins JA, Cuomo CA, Dickman MB, Kohn LM. Genomics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*. Springer; 2014. p. 1–17.
3. Singh SP, Schwartz HF. Breeding common bean for resistance to diseases: A review. *Crop Sci*. 2010;50(6):2199.
4. Lobo-Junior M. Manejo do mofo branco. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 10., 2011, Embrapa Arroz e Feijão.
5. Nasser LCB, Resck P V, Charchar MJD. Soil management, crop sequences and plant diseases in the Cerrado of Brazil. *Proceedings of the International Workshop on Conservation Tillage Systems*. 1990. p. 190–203.
6. Atallah ZK, Subbarao K V. *Plant Fungal Pathogens*. Bolton MD, Thomma BPHJ, editors. Totowa, NJ: Humana Press. 2012.
7. Kohn LM, Stasovski E, Carbone I, Royer J, Anderson JB. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*. 1991;81(4):480–5.
8. Kohli Y, Morrall RAA, Anderson JB, Kohn LM. Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. *Phytopathology*. 1992;82(8):875–80.
9. Cubeta MA, Cody BR, Kohli Y, Kohn LM. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. *Phytopathology*. 1997;87(10):1000–4.

10. Carpenter MA, Frampton C, Stewart A. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *New Zeal J Crop Hortic Sci.* 1999;27(1):13–21.
11. Clarkson JP, Coventry E, Kitchen J, Carter HE, Whipps JM. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in the UK. *Plant Pathol.* 2013; 62(2):309–24.
12. Lehner MS, Paula Júnior TJ, Hora Júnior BT, Teixeira H, Vieira RF, Carneiro JES, et al. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. *Plant Pathol.* 2015; DOI:10.1111/ppa.12322
13. Atallah ZK, Larget B, Chen X, Johnson DA. High genetic diversity , phenotypic uniformity , and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia basin of Washington state. *Phytopathology.* 2004;94(7):737–42.
14. Sexton AC, Howlett BJ. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. *Curr Genet.* 2004; 46(6):357–65.
15. Sexton AC, Whitten AR, Howlett BJ. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Australian canola field at flowering and stem-infection stages of the disease cycle. *Genome.* 2006; 49(11):1408–15.
16. Mert-Türk F, Ipek M, Mermer D, Nicholson P. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Anakkale province of Turkey. *J Phytopathol.* 2007;155(3):182–7.
17. Gomes EV, Do Nascimento LB, De Freitas MA, Nasser LCB, Petrofeza S. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. *J Phytopathol.* 2011; 159(2):94–9.

18. Attanayake RN, Carter PA, Jiang D, Río-Mendoza L, Chen W. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. *Phytopathology*. 2013; 103(7): 750-61.
19. McDonald B., Linde C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol*. 2002; 40:349–79.
20. Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol*. 2006;7(1):1–16.
21. Purdy LH. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*. 1979;69(8):875.
22. Adams PB. Factors affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Plant Dis Report*. 1975;59(7):599–603.
23. Steadman JR. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 1979;69:904–7.
24. Peltier AJ, Bradley CA, Chilvers MI, Malvick DK, Mueller DS, Wise KA, et al. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. *J Integr Pest Manag*. 2012;3(2):B1–B7.
25. Cook GE, Steadman JR, Boosalis MG. Survival of *Yhertzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in western Nebraska. *Phytopathology*. 1975;65:250–5.
26. Steadman JR. White mold a serious yield-limiting disease of bean. *Plant Dis*. 1983;67(4):346–50.
27. Gilbert AH, Bennett CW. *Sclerotinia trifoliorum*, the cause of stem rot of clovers and alfalfa. *Phytopathology*. 1917;7:432–42.

28. Held VM, Haenseler CM. Cross inoculation with New Jersey isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* and *S. trifoliorum*. Plant Dis Rep. 1953;37:515–7.
29. Smith RE. The life history of *Sclerotinia sclerotiorum* with reference to the green rot of apricot. Phytopathology. 1931;21:407–23.
30. Purdy LH. A Broader concept of the species *Sclerotinia sclerotiorum* based on variability. Phytopathology. 1955;45(8):421–7.
31. Willetts HJ, Wong AL. Ontogenetic diversity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. Trans Br Mycol Soc. 1971;57(3):515-24.
32. Wong AL, Willetts HJ. A taxonomic study of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species: mycelial interactions. J Gen Microbiol. 1975;88(2):339–44.
33. Kohn LM. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. Phytopathology. 1979;69(8):881–6.
34. Worrall JJ. Structure and dynamics of fungal populations. Springer Science & Business Media; 1999.
35. Willetts HJ, Wong AL. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. The Botanical Review. 1980;46:101–65.
36. Phillips AJL. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* after periods of conditioning in soil. J Phytopathol. 1986;116(3):247–58.
37. Dillard HR, Ludwig JW, Hunter JE. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. Plant Dis. 1995;79(4):411–5.
38. Matheron ME, Porchas M. Influence of soil temperature and moisture on eruptive germination and viability of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. Plant Dis. 2005;89(1):50–4.

39. Nepal A, del Río-Mendoza LE. Effect of sclerotial water content on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.*; 2012;96(9):1315–22.
40. Schwartz HF, Steadman JR. Factors affecting sclerotium populations of , and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*. 1977;68:383–8.
41. Abawi GS, Grogan RG. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 1979;69(8):899–904.
42. Caesar AJ, Pearson RC. Environmental factors affecting survival of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. Cornell University, Jan.; 1982.
43. Clarkson JP, Staveley J, Phelps K, Young CS, Whipps JM. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycol Res*. 2003;107(02):213–22.
44. Abawi GS, Polach FJ, Molin WT. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*. 1975;65(6):673–8.
45. Tariq VN, Jeffries P. Appressorium formation by *Sclerotinia sclerotiorum*: scanning electron microscopy. *Trans Br Mycol Soc*. 1984;82(4):645–51.
46. Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 1990;37(3):179–91.
47. Riou C, Freyssinet G, Fevre M. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57(5):1478–84.
48. Hegedus DD, Rimmer SR. *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiol Lett*. 2005;251(2):177–84.
49. Kabbage M, Yarden O, Dickman MB. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. *Plant Sci*. 2015;233:53–60.

50. Liang X, Moomaw EW, Rollins J a. Fungal oxalate decarboxylase activity contributes to *Sclerotinia sclerotiorum* early infection by affecting both compound appressoria development and function. *Mol Plant Pathol*. 2015;1–40.
51. Andrew M, Barua R, Short SM, Kohn LM. Evidence for a common toolbox based on necrotrophy in a fungal lineage spanning necrotrophs, biotrophs, endophytes, host generalists and specialists. *PLoS One*. 2012;7(1):e29943.
52. Ayers WA, Adams PB. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* species by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Can J Microbiol*. 1979;25(1):17–23.
53. Le Tourneau D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*. 1979;69(8):887–90.
54. Willetts HJ, Bullock S. Developmental biology of sclerotia. *Mycol Res*. 1992;96(10):801–16.
55. Cooke RC. Physiology of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* during growth and maturation. *Trans Br Mycol Soc*. 1971;56(1):51–9.
56. Rollins JA, Dickman MB. Increase in endogenous and exogenous cyclic AMP levels inhibits sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* . *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(7), 2539-44
57. Wang S-YC, Le Tourneau D. Amino acids as nitrogen sources for growth and sclerotium formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans Br Mycol Soc*. 1972;59(3):509–12.
58. Saharan GS, Mehta N. *Sclerotinia* diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. India: Springer; 2008.
59. Humpherson-Jones FM, Cooke RC. Morphogenesis in sclerotium-forming fungi. II. Rhythmic production of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *New Phytol*. 1977;181–7.

60. Purdy LH, Grogan RG. Physiological studies fo *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and culture agar. *Phytopathology*. 1954;44(1):36–8.
61. Whipps JM, Budge SP. Screening for sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycol Res*. 1990;94(5):607–12.
62. Tu JC. Mycoparasitism by *Coniothyrium minttans* on *Sclerotinia sclerotiorum* and its Effect on Sclerotial Germination. *J Phytopathol*. 1984;268:261–9.
63. Turner GJ, Tribe HT. On *Coniothyrium minitans* and its parasitism of *Sclerotinia species*. *Trans Br Mycol Soc*. 1976;66(1):97–105.
64. Whipps JM, Gerlagh M. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycol Res*. 1992;96(11):897–907.
65. Adams PB. Comparison of antagonists of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 1989;79(12):1345–7.
66. Teo BK, Verma PR, Morrall R a. a. The effects of herbicides and mycoparasites at different moisture levels on carpogenic germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Soil*. 1992;139(1):99–107.
67. Yun SH, Berbee ML, Yoder OC, Turgeon BG. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(10):5592–7.
68. Debuchy R, Berteaux-Lecellier V, Silar P. Mating systems and sexual morphogenesis in Ascomycetes. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. 2010. p. 501–35.
69. Amselem J, Cuomo C a, van Kan J a L, Viaud M, Benito EP, Couloux A, et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet*. 2011;7(8):e1002230.
70. Chitrampalam P, Inderbitzin P, Maruthachalam K, Wu B-M, Subbarao K V. The *Sclerotinia sclerotiorum* mating type locus (MAT) contains a 3.6-kb region that is inverted in every meiotic generation. *PLoS One*. 2013;8(2):e56895.

71. Chitrampalam P, Pryor BM. Characterization of mating type ( MAT ) alleles differentiated by a natural inversion in *Sclerotinia minor*. Plant Pathol. 2014. DOI: 10.1111/ppa.12305.
72. Anderson JB, Kohn LM. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. Annu Rev Phytopathol. 1995;33(1):369–91.
73. Carbone I, Anderson JB, Kohn LM. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. Evolution. 1999;11–21.
74. Carbone I, Kohn LM. Multilocus nested haplotype networks extended with DNA fingerprints show common origin and fine-scale, ongoing genetic divergence in a wild microbial metapopulation. Mol Ecol. 2001;10(10):2409–22.
75. Sirjusingh C, Kohn LM. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. Mol Ecol Notes. 2001;1(4):267–9.
76. Tenzer I, degli Ivanissevich S, Morgante M, Gessler C. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. Phytopathology. 1999;89(9):748–53.
77. Malvárez G, Carbone I, Grünwald NJ, Subbarao K V, Schafer M, Kohn LM. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. Phytopathology. 2007;97(4):470–83.
78. Sun J, Irzykowski W, Jedryczka M, Han F. Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified polymorphic DNA markers. J Integr Plant Biol. 2005;47(4):385–95.
79. Ekins MG, Hayden HL, Aitken E a. B, Goulter KC. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower in Australia. Australas Plant Pathol. 2011;40(2):99–108.

80. Hemmati R, Javan-Nikkhah M, Linde CC. Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. *Eur J Plant Pathol*. 2009 J;125(4):617–28.
81. Litholdo Júnior CG, Gomes EV, Lobo Júnior M, Nasser LCB, Petrofeza S. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. *Genet Mol Res*. 2011;10(2):868–77.
82. Kohn LM. The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations. *Can J Bot*. 1995;73(S1):1231–40.
83. McCallan SEA. History of fungicides. In 'Fungicides: an advanced treatise 1,.(Ed. DC Torgeson) pp. 1--37. Academic Press, New York, NY, USA; 1967.
84. Morton V, Staub T. A short history of fungicides. Online, APSnet Featur. 2008;
85. Brent K, Thind TS. Historical perspectives of fungicide resistance. *Fungic Resist Crop Prot Risk Manag*. 2012;3–18.
86. Brent K, Hollomon D. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? Belgium. 2007.
87. Ma Z, Michailides TJ. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot*. 2005;24(10):853–63.
88. Gossen BD, Rimmer SR, Holley JD. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis*. 2001;85(11):1206.
89. Dry IB, Yuan KH, Hutton DG. Dicarboximide resistance in field isolates of *Alternaria alternata* is mediated by a mutation in a two-component histidine kinase gene. *Fungal Genet Biol*. 2004;41(1):102–8.
90. Tamura O. Resistance development of grey mould on beans towards fluazinam and relevant countermeasures. 10th symposium of research committee of fungicide resistance. 2000.

91. Leroux P. Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer; 2007. p. 195–222.
92. Rasband WS. ImageJ. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>. National Institute of Health; 2008;
93. Schafer MR, Kohn LM. An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*. 2006;98(4):593–7.
94. Zolan ME, Pukkila PJ. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol Cell Biol*. 1986;6(1):195–200.
95. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564–7.
96. Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*. 2014;2:e281.
97. Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet*. 2010;11(1):94.
98. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. ISBN 3-900051-07-0; 2012.

## ANEXOS

Tabela 1. Catalogação dos isolados e coordenadas geográficas.

	Isolado	Local	Fazenda	Coordenadas		Ano safra
1	S14-11-1	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
2	S14-11-2	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
3	S14-11-3	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
4	S14-11-4	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
5	S14-11-5	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
6	S14-12-1	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
7	S14-12-2	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
8	S14-12-3	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
9	S14-13-1	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
10	S14-15-1	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
11	S14-15-2	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
12	S14-15-3	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
13	S14-15-4	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2'14.10"O	2000
14	S14-4-1	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2' 14.10"O	2000
15	S14-7-1	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2' 14.10"O	2000
16	S14-7-2	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2' 14.10"O	2000
17	S14-7-3	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2' 14.10"O	2000
18	S14-8-1	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2' 14.10"O	2000
19	S14-9-1	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2' 14.10"O	2000
20	S14-9-2	Paracatú	Nova holanda	17°1'4.33"S	47°2' 14.10"O	2000
21	EV-1	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 50.2	W46 37 30.2	2013
22	EV-10	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 43.7	W46 37 22.6	2013
23	EV-10-2	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 43.7	W46 37 22.7	2013
24	EV-1-2	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 50.2	W46 37 30.2	2013
25	EV-2	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 50.2	W46 37 29.7	2013
26	EV-2-2	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 50.2	W46 37 29.8	2013
27	EV-3	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 49.1	W46 37 28.9	2013
28	EV-3-2	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 49.1	W46 37 28.10	2013
29	EV-4	Paracatú	Engenho Velho	S17 10 9.26	W46 37 57.12	2013
30	EV-4-2	Paracatú	Engenho Velho	S17 10 9.26	W46 37 57.12	2013
31	EV-4-3	Paracatú	Engenho Velho	S17 10 9.26	W46 37 57.12	2013
32	EV-5	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 47.7	W46 37 27.5	2013
33	EV-6-1	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 46.2	W46 37 25.6	2013
34	EV-7-2	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 45.6	W46 37 24.9	2013
35	EV-8	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 45.4	W46 37 24.6	2013
36	EV-8-3	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 45.4	W46 37 24.7	2013

37	EV-9	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 44.4 W46 37 23.4	2013
38	EV-9-2	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 44.4 W46 37 23.5	2013
39	EV-9-3	Paracatú	Engenho Velho	S17 09 44.4 W46 37 23.6	2013
40	NH-1	Paracatú	Nova holanda	S17 01 01.9 W47 02 09.8	2013
41	NH-12	Paracatú	Nova holanda	S17 01 19.3 W47 02 02.2	2013
42	NH-2	Paracatú	Nova holanda	S17 01 12.1 W47 02 29.3	2013
43	NH-3	Paracatú	Nova holanda	S17 01 02.9 W47 02 09.3	2013
44	NH-5	Paracatú	Nova holanda	S17 01 03.7 W47 02 09.0	2013
45	NH-6	Paracatú	Nova holanda	S17 01 06.6 W47 02 07.7	2013
46	NH-7	Paracatú	Nova holanda	S17 01 08.5 W47 02 07.1	2013
47	NH-8	Paracatú	Nova holanda	S17 01 10.9 W47 02 06.1	2013
48	NH-9	Paracatú	Nova holanda	S17 01 13.2 W47 02 05.2	2013
49	2NH-1	Paracatú	Nova holanda	S17 00 52.8 W47 01 45.6	2013
50	2NH-12	Paracatú	Nova holanda	S17 00 52.8 W47 01 45.6	2013
51	2NH-2	Paracatú	Nova holanda	S17 00 50.1 W47 01 46.5	2013
52	2NH-2-2	Paracatú	Nova holanda	S17 00 50.1 W47 01 46.6	2013
53	2NH-3	Paracatú	Nova holanda	S17 00 48.7 W47 01 47.0	2013
54	2NH-4	Paracatú	Nova holanda	S17 00 46.1 W47 01 47.9	2013
55	2NH-4-2	Paracatú	Nova holanda	S17 00 46.1 W47 01 47.10	2013
56	2NH-5	Paracatú	Nova holanda	S17 00 50.0 W47 01 33.7	2013
57	2NH-6	Paracatú	Nova holanda	S17 00 48.1 W47 01 34.3	2013
58	2NH-8	Paracatú	Nova holanda	S17 00 43.8 W47 01 35.8	2013
59	2NH-8-2	Paracatú	Nova holanda	S17 00 43.8 W47 01 35.9	2013
60	P1-2-2-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 58.6 W47 21 24.4	2013
61	P1-2-2-2	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 58.6 W47 21 24.5	2013
62	P1-2-3-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 58.6 W47 21 24.6	2013
63	P1-2-3-2	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 58.6 W47 21 24.7	2013
64	P1-3-2	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 00.2 W47 21 25.4	2013
65	P1-3-3-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 00.2 W47 21 25.5	2013
66	P1-4-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 59.7 W47 21 27.2	2013
67	P1-4-2	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 59.7 W47 21 27.3	2013
68	P1-4-3-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 59.7 W47 21 27.4	2013
69	P1-4-3-2	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 59.7 W47 21 27.5	2013
70	P1-4-4	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 38 59.7 W47 21 27.6	2013
71	P1-5-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 01.4 W47 21 26.5	2013
72	P1-5-4-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 01.4 W47 21 26.6	2013
73	P1-5-4-2	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 01.4 W47 21 26.7	2013
74	P1-6-2	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 02.5 W47 21 25.1	2013
75	P1-6-3	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 02.5 W47 21 25.2	2013
76	P1-6-4-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 02.5 W47 21 25.3	2013
77	P1-6-4-2	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 02.5 W47 21 25.4	2013

78	P1-7-2-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 04.0 W47 21 25.7	2013
79	P1-8-1	Planaltinha	Olhos d"àgua	S15 39 02.5 W47 21 25.2	2013

Tabela 2. Lista de primers microssatélites

Locus	Primers	Motivo	Marcação
Cromossomo 1 - Supercontig 2			
92-4	TCGCCTCAGAAGAATGTGC AGCGGGTTACAAGGAGATGG	(CT) <sub>12</sub>	FAM
Cromossomo 2 - Supercontig 5			
6-2	GGGGAAAGGATAAAGAAAAG CAGACAGGATTATAAGCTTGGTCAC	(TTTTTC) <sub>2</sub> (TTTTTG) <sub>2</sub> ( TTTTTC)	NED
Cromossomo 3 - Supercontig 1			
5-2	GTAACACCGAAATGACGGC GATCACATGTTTATCCCTGGC	(GT) <sub>8</sub>	FAM
20-3	GACGCCTTGAAGTTCTCTTCC CGAACAAGTATCCTCGTACCG	(GT) <sub>7</sub> GG(GT) <sub>5</sub>	VIC
Cromossomo 3 - Supercontig 24-			
9-2	GCCGATATGGACAATGTACACC TCTTCGCAGCTCGACAAGG	(CA) <sub>9</sub> (CT) <sub>9</sub>	NED
Cromossomo 4 - Supercontig 3			
7-2	TTTGCCTATTATGGTGGGC ATGGCGCAACTCTCAATAGG	(GA) <sub>14</sub>	FAM
114-4	GCTCCTGTATACCATGTCTTG GGACTTTCGGACATGATGAT	(AGAT) <sub>14</sub> (AAGC) <sub>4</sub>	VIC
17-3	TCATAGTGAGTGCATGATGCC CAGGGATGACTTTGGAATGG	(TTA) <sub>9</sub>	FAM
Cromossomo 5 - Supercontig 19			
12-2	CGATAATTTCCCCTCACTTGC GGAAGTCCTGATATCGTTGAGG	(CA) <sub>9</sub>	FAM
5-3	CAGACGAATGAGAAGCGAAC TTCAAACAACGCTCCTGG	[(GT) <sub>2</sub> GAT] <sub>3</sub> (GT) <sub>14</sub> GAT( GT) <sub>5</sub> [GAT(GT) <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> (GAT) <sub>3</sub>	FAM
Cromossomo 6 - Supercontig 9			
13-2	TCTACCCAAGCTTCAGTATTCC GAACTGGTTAATTGTCTCGG	(GTGGT) <sub>6</sub>	VIC
36-4	GAATCTCTGTCCCACCATCG AGCCCATGTTTGGTTGTACG	CA <sub>6</sub> (CGCA) <sub>2</sub> CAT <sub>2</sub>	VIC
Cromossomo 11 - Supercontig 20			
8-3	CACTCGCTTCTCCATCTCC GCTTGATTAGTTGGTTGGCA	CA <sub>12</sub>	FAM
Cromossomo 12 - Supercontig 8			
41-1	CCGAGCATAATATAATCC AAGGTTATATTTCCCTCGC	(TA) <sub>5</sub> e (CA) <sub>10</sub>	FAM

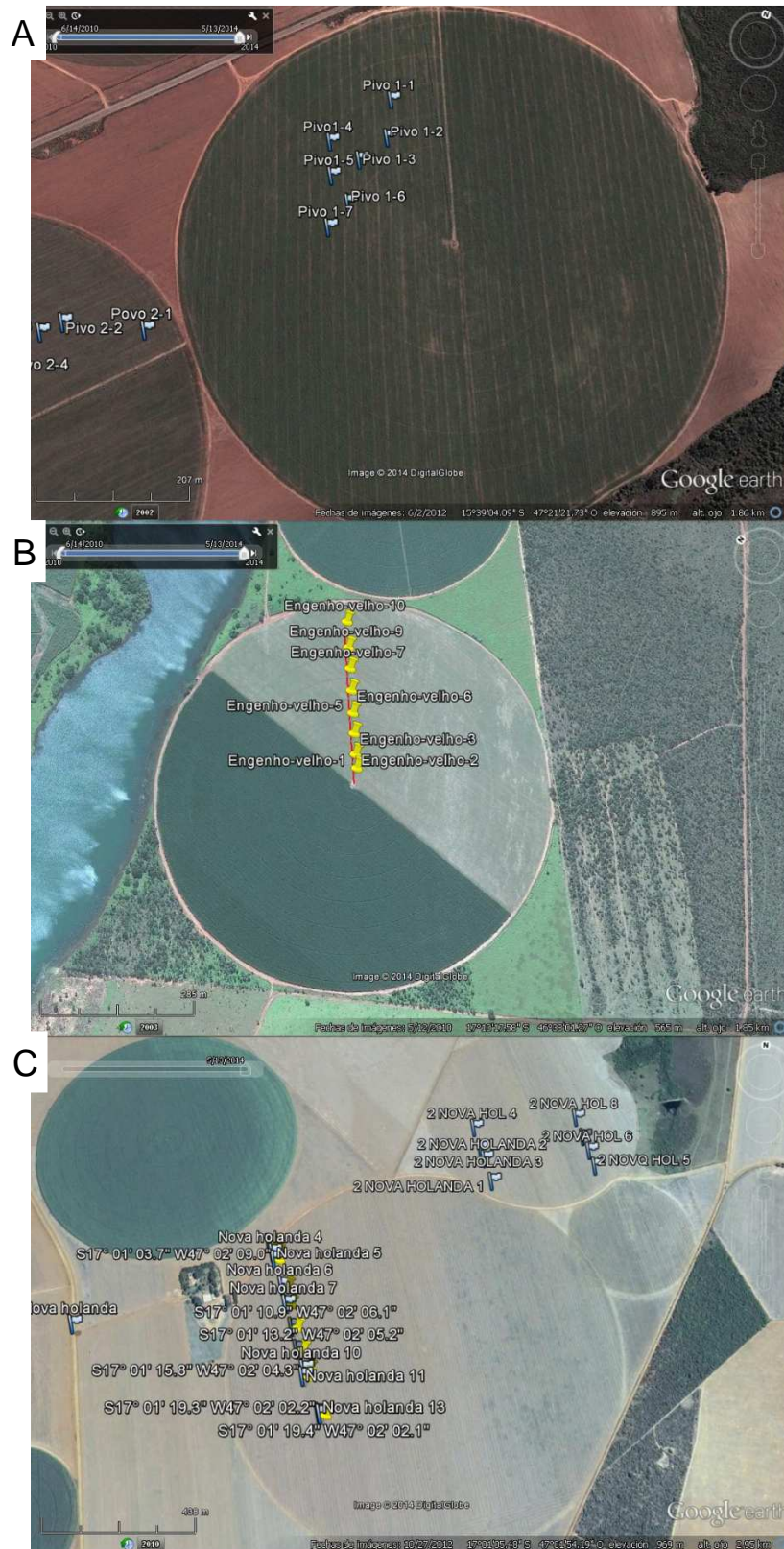


Figura 1. (A) Amostragem no pivô da fazenda Olhos d'água. (B) Amostragem no pivô da fazenda Engenho Velho. (C) Amostragem no pivô da fazenda Nova Holanda.